



HAL
open science

Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

T. Gustavsson, J.-C. Mialocq

► **To cite this version:**

T. Gustavsson, J.-C. Mialocq. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps. Gustavsson Thomas et Mostafavi Mehran. Réactions ultrarapides en solution Approches expérimentales et théoriques, CNRS Editions, pp.27, 2007. hal-00192677

HAL Id: hal-00192677

<https://hal.science/hal-00192677>

Submitted on 29 Nov 2007

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.

Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

Thomas Gustavsson

Laboratoire Francis Perrin, CEA/DSM/DRECAM/SPAM - CNRS URA 2453

Jean-Claude Mialocq

Laboratoire Claude Fréjacques, CEA/DSM/DRECAM/SCM - CNRS URA 331

CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

1 Introduction

Dans ce chapitre, nous traiterons de la fluorescence et plus précisément de l'évolution temporelle de la lumière émise par un système moléculaire après une photo-excitation brève. Pourquoi étudier la fluorescence résolue en temps? La fluorescence résolue en temps, en intensité, en spectre et en polarisation est un outil précieux pour caractériser un état moléculaire excité. Elle permet d'étudier et de suivre l'évolution temporelle d'une population excitée et ainsi de distinguer des processus radiatifs et non-radiatifs. Ainsi peuvent être observés des processus physico-chimiques, intra- ou inter-moléculaires, tels que le transfert de charge, le transfert d'énergie et la dynamique de solvation, des sujets traités en détails par ailleurs dans cette école. L'utilisation des lasers impulsionnels permet en effet une photoexcitation très bien contrôlée en termes d'énergie, de durée et de cadence. Un enjeu important est de profiter au mieux de la résolution temporelle potentiellement offerte par la brièveté des impulsions générées par les lasers femtoseconde actuels. Nous décrirons d'abord la fluorescence d'un point de vue photophysique. Nous expliquerons quelques notions de base concernant la caractérisation de la fluorescence (durée de vie, rendement quantique, etc..). Puis, nous présenterons les différentes méthodes et techniques expérimentales actuellement utilisées pour étudier la fluorescence résolue en temps. De nombreux exemples accompagnent les descriptions techniques.

1.1 Fluorescence

Ce chapitre traite des techniques et des méthodes qui permettent l'étude de la fluorescence résolue en temps. Pour en savoir plus sur les aspects historiques et généraux, sur la compréhension du phénomène qu'est la fluorescence ainsi que sur les nombreuses techniques et applications, il est vivement recommandé au lecteur de consulter le livre de B. Valeur [1].

Les ouvrages de Birks [2, 3] et Lakowicz [4, 5] sont également incontournables. L'étude de la fluorescence moléculaire implique bien entendu l'étude d'un état excité. Pour des généralités sur la photophysique moléculaire et la photochimie, nous renvoyons au chapitre de J. Delaire ainsi qu'aux références [6, 7].

La fluorescence correspond à la désactivation radiative spontanée d'un état électroniquement excité du soluté selon une transition "permise" entre un état singulet excité et l'état fondamental S_0 (contrairement à la phosphorescence qui correspond à une transition "interdite" entre le premier état triplet T_1 et l'état fondamental S_0). La fluorescence résolue en temps renseigne sur l'évolution temporelle de la population de l'état excité, son caractère électronique et surtout, ce qui peut paraître un peu paradoxal, les voies de désactivation non-radiatives qui le dépeuplent. Il subsiste ici un flou entre "état excité" et "population à l'état excité". Ceci est volontaire, car l'intensité de la fluorescence dépend d'une façon indissociable de la nature de l'état électroniquement excité, ou plus précisément du moment de transition et de la population excitée. Or, les deux peuvent varier dans le temps et il n'y a pas de moyen a priori de dire si la fluorescence diminue seulement à cause d'une dépopulation, ou si un changement de caractère électronique a également eu lieu.

1.2 Caractérisation de l'état excité

Pour mieux décrire l'état excité, il est souhaitable de se reporter au diagramme dit de "Perrin-Jablonsky". (Pour une discussion approfondie concernant l'histoire de ce diagramme, voir les articles de B. Nickel : EPA Newsletter 58 (1996) 9 et 61 (1997) 27). Sur la figure 1 sont illustrés les processus d'absorption (1), de relaxation non-radiative (2) à l'état excité et de fluorescence (3).

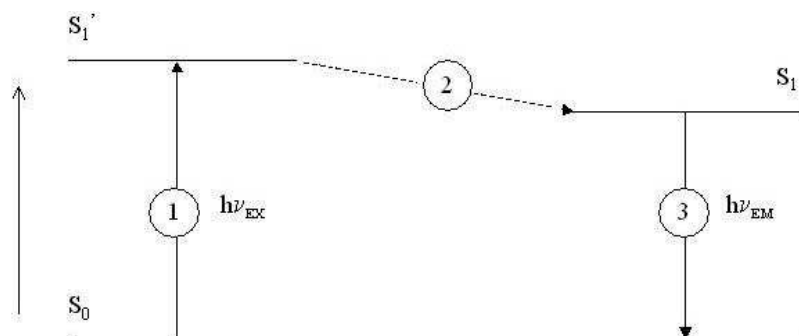


Figure 1. Diagramme de "Perrin-Jablonsky". La flèche 1 met en évidence le processus d'absorption, la flèche 2 celui de la relaxation non-radiative dans l'état excité et la flèche 3 indique la fluorescence.

Ce n'est pas le but de ce chapitre de traiter de l'origine de la relaxation non-radiative qui se déroule dans une molécule après la photoexcitation à partir de l'état fondamental S_0 vers l'état de Franck-Condon S'_1 . Cette relaxation $S'_1 \rightarrow S_1$ se manifeste par une stabilisation énergétique, liée à un déplacement vers le rouge du spectre de fluorescence. Les processus responsables de cette relaxation peuvent être intramoléculaires, comme la relaxation électronique (conversion interne) et/ou vibrationnelle (thermalisation), le transfert de charge et surtout le changement de conformation. Ils peuvent également être intermoléculaires, comme la dynamique de solvation (voir le chapitre de J-C. Mialocq), la formation et la rupture des liaisons hydrogène et le transfert de proton du soluté au solvant. Ces processus sont tous très rapides et ont lieu à l'échelle pico- voire femtoseconde, d'où la nécessité de développer des techniques appropriées.

On peut distinguer principalement deux techniques utilisées pour caractériser les états excités, la spectroscopie d'absorption transitoire (voir le chapitre de S. Pommeret), et la fluorescence résolue en temps. Bien entendu, ce chapitre traite seulement de la seconde, mais il est intéressant ici de faire une brève comparaison entre les deux.

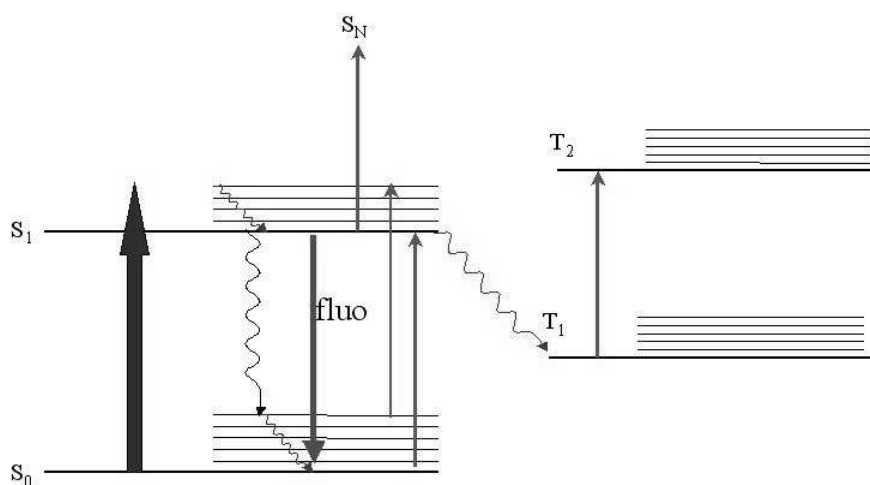


Figure 2. Comparaison entre absorption transitoire et fluorescence.

Des deux techniques, l'absorption transitoire est de loin la plus répandue. Or, le signal détecté dans une expérience d'absorption transitoire peut avoir plusieurs origines, ce qui rend l'interprétation parfois délicate. En effet, le signal d'absorption transitoire peut contenir les contributions du blanchiment, impliquant l'état fondamental, de l'absorption induite et de l'émission stimulée, toutes les deux impliquant des états excités. La fluorescence, ou l'émission spontanée, est à priori plus facile à interpréter, venant d'un état excité. En outre, la fluorescence est un outil passif pour sonder l'état excité sans l'altérer.

Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas si longtemps, il était généralement admis que la fluorescence venait seulement du premier état excité. Cet axiome est connu sous le nom de "la loi de Kasha" [7]. Aujourd'hui, avec des méthodes femtoseconde, il est possible d'observer la fluorescence des états électroniques S_N hautement excités [8].

Il est important de remarquer dès maintenant que la fluorescence moléculaire n'est pas monochromatique : elle se présente sous forme d'une large bande. Il est évident que la décroissance de l'intensité totale ne contient pas toute l'information sur l'état excité : le changement de forme et de position de la bande de fluorescence donne des informations supplémentaires sur l'état excité. Des expériences de fluorescence résolue en temps peuvent être conduites à longueur d'onde fixe ou sous forme de spectres résolus en temps. Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux mesures polychromatiques.

1.3 Déclins de fluorescence et durées de vie de fluorescence

Supposons que la nature de l'état électroniquement excité ne change pas au cours du temps. Pour être plus précis, nous supposons que le moment de transition d'émission ne change ni d'amplitude, ni d'orientation. Une réorientation du moment de transition provoquera effectivement un changement de la polarisation (ou l'anisotropie) de la fluorescence, ce qui ne sera pas traité ici. Nous supposons que tous les mesures sont effectuées à l'angle magique ($54,7^\circ$ entre excitation et observation). Ainsi, l'intensité de la fluorescence est une mesure de la population excitée seule. Dans le cas le plus simple, la fluorescence est émise d'un seul état excité. La désactivation de cet état peut être décrite par l'équation

$$\frac{dn(t)}{dt} = -kn(t) \quad (1)$$

où k est la constante de vitesse de désactivation de l'état excité et $n(t)$ sa population. La résolution de cette équation différentielle donne la population $n(t)$, donc l'intensité $I(t)$ de la fluorescence qui lui est proportionnelle :

$$I(t) \propto -\frac{dn(t)}{dt} \Rightarrow I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (2)$$

où τ est la durée de vie de fluorescence, égale à l'inverse de k . Ici, $I(t)$ correspond à l'intensité totale sur toute la bande spectrale. Or, en réalité les mesures sont souvent faites à une longueur d'onde fixe. Comment donc obtenir des spectres résolus en temps à partir des cinétiques?

Dans le cas général, plusieurs états ou espèces peuvent contribuer à la fluorescence totale, chacun étant caractérisé par sa propre durée de vie. Si les différentes contributions ne sont pas couplées, l'utilisation d'une somme de fonctions monoexponentielles est légitime :

$$I(t) = \sum_i (1/\tau_i) a_i \exp(-t/\tau_i) \quad (3)$$

Une fonction modèle est souvent utilisée d'une façon phénoménologique quand le déclin de fluorescence observé n'est pas mono-exponentiel. C'est un choix simple mais pas forcément correct. La fluorescence peut être le résultat d'un système réactif (plusieurs espèces couplées) ou d'une cascade non-radiative (plusieurs états couplés).

Prenons le système très simple à trois niveaux, l'état fondamental, S_0 , et deux états couplés, S_1 et S_2 de populations n_0 , n_1 et n_2 . Nous supposons l'excitation instantanée (de forme Dirac) d'une population n_2 dans l'état S_2 . Il s'ensuit une désactivation non-radiative en cascade $n_2 \rightarrow n_1 \rightarrow n_0$ et par transition directe $n_2 \rightarrow n_0$. On obtient donc les solutions analytiques pour les populations en fonction du temps:

$$n_2(t) = N e^{-(k_{20}+k_{21})t} \quad (4)$$

$$n_1(t) = \frac{N k_{21}}{k_{20} + k_{21} - k_{10}} \left(e^{-k_{10}t} - e^{-(k_{20}+k_{21})t} \right) \quad (5)$$

$$n_0(t) = N \left(1 - \frac{k_{20} - k_{10}}{k_{20} + k_{21} - k_{10}} e^{-(k_{20}+k_{21})t} - \frac{k_{21}}{k_{20} + k_{21} - k_{10}} e^{-k_{10}t} \right) \quad (6)$$

où N est la population initiale de l'état excité S_2 à $t = 0$). A noter que pour bien modéliser la fluorescence émise à une longueur d'onde donnée, les expressions utilisées ici sont souvent insuffisantes, soit à cause de la complexité du système, soit par des effets de diffusion spectrale. La bande de fluorescence peut effectivement se déplacer dans le temps, par exemple à cause de la dynamique de solvation (voir Chapitre de J.-C. Mialocq), ce qui rend l'application d'équations simples de type multi-exponentiel impossible. Il est évident que l'enregistrement des spectres de fluorescence résolus en temps présente un grand avantage. Ceci sera discuté pour chacune des techniques présentées ci-dessous.

1.4 Durée de vie radiative et rendement quantique de fluorescence

Lors d'une expérience de fluorescence résolue en temps, on mesure principalement la durée de vie de la fluorescence. D'autres phénomènes peuvent être observés, tels que l'anisotropie de fluorescence, mais ils ne seront pas traités ici. La durée de vie de fluorescence observée ne

reflète pas seulement les propriétés radiatives du système moléculaire excité, mais elle reflète aussi tous les processus de désactivation non-radiatifs. Ceci est exprimé dans l'équation :

$$\tau_F = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_{rad} + \sum k_{nrad}} \quad (7)$$

où $\frac{1}{k_{rad}} = \tau_{rad}$ est la durée de vie radiative (en l'absence de processus non-radiatifs),

caractérisée par la nature de la molécule et la transition radiative en question. $\sum k_{nrad}$ prend en compte toutes les voies de désactivation non radiatives (conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$, passage inter-système $S_1 \rightarrow T_1, \dots$).

Le rendement quantique de fluorescence Φ_F est défini comme le rapport entre le nombre total de photons émis et le nombre total de photons absorbés

$$\Phi_F = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} \quad (8)$$

La durée de vie radiative ne peut pas être mesurée directement, mais peut être évaluée à partir de la durée de vie de fluorescence τ_F et du rendement quantique de fluorescence Φ_F . Il s'écrit

$$\Phi_F = \frac{k_{rad}}{k} = \frac{\tau_F}{\tau_{rad}} \quad (9)$$

$$\tau_{rad} = \frac{\tau_F}{\Phi_F} \quad (10)$$

Mesurer le rendement quantique de fluorescence Φ_F avec une bonne précision n'est pas trivial, mais pour une discussion sur ce sujet, dépassant largement le cadre de ce chapitre, le lecteur est invité à consulter les références [9, 10].

Strickler et Berg ont dérivé une expression qui permet le calcul de la durée de vie radiative à partir des spectres d'absorption et d'émission [11].

$$\begin{aligned} \frac{1}{\tau_{rad}} &= \frac{1}{N_A} 8\pi n^2 c \left(2303 \langle \nu_F^{-3} \rangle^{-1} \right) \int \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu = \\ &= 2.883 \times 10^{-9} n^2 \langle \nu_F^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu \end{aligned} \quad (11)$$

On peut noter que la durée de vie radiative est d'autant plus courte que l'absorption est forte (ϵ_{max} grand, transition permise) et que la longueur d'onde de fluorescence est courte (ν_F grand, transition UV). La comparaison de la valeur de la durée de vie radiative obtenue par l'équation

10 avec la valeur prédite par l'équation 11 renseigne sur la nature commune ou non de l'état excité Franck-Condon et l'état fluorescent.

2 Comment étudier la fluorescence résolue en temps ?

Il y a presque 20 ans, G. R. Fleming a publié une revue très complète des méthodes de spectroscopie résolue en temps [12]. Cette revue est toujours valable, mais on peut remarquer que la sensibilité, la stabilité et la résolution temporelle ont été améliorées, surtout grâce aux technologies laser solide (saphir dopé au titane). Pour étudier la fluorescence résolue en temps, il faut dans tous les cas de figures, définir une échelle de temps et un temps zéro à partir duquel la fluorescence est créée (par une excitation lumineuse ultra-brève) et son évolution temporelle mesurée.

Nous allons ici faire une distinction entre des méthodes "conventionnelles" utilisant une détection partiellement optique, partiellement électronique et des méthodes "tout optique", utilisant une détection purement optique, type pompe-sonde. Bien entendu ces définitions portent seulement sur la détection de la fluorescence proprement dite, pas sur le stockage et le traitement du signal, qui restent électroniques. Cette distinction peut être plus précise. Dans les méthodes conventionnelles, l'échelle de temps est définie par des moyens électroniques tandis que dans les méthodes tout optique, l'échelle de temps est définie par une distance Δl parcourue par la lumière. Comme la vitesse de la lumière c est connue, cette distance se traduit facilement en temps, $\Delta t = \Delta l / c$. Par exemple, 30 μm correspondent à 100 femtosecondes (1 femtoseconde = 10^{-15} s), 300 μm correspondent à 1 picoseconde (1 picoseconde = 10^{-12} s), 300 mm correspondent à 1 nanoseconde (1 ns = 10^{-9} s), etc.

Par méthodes "conventionnelles", nous entendons l'utilisation d'un détecteur à porte électronique (Gated CCD en anglais), de photomultiplicateurs ou de photodiodes et d'un oscilloscope rapide, la technique de modulation de phase, la caméra à balayage de fente et la technique du comptage de photons uniques. Par méthodes "tout optique", nous entendons l'effet Kerr optique et la technique de génération de somme de fréquences.

2.1 Résolution temporelle et fonction d'appareil

Le déclin observé de l'intensité de la fluorescence correspond à un signal qui évolue dans le temps d'une façon plus ou moins complexe. Nous le représenterons par une courbe $I(t)$. Cette courbe $I(t)$ n'est pas le vrai déclin de fluorescence $G(t)$. Celui-ci est déformé par la réponse de toute la chaîne de détection (électronique et optique). $I(t)$ est le produit de convolution de $G(t)$ par la fonction d'appareil $R(t)$

$$I(t) = G(t) \otimes R(t) = \int_0^{\infty} G(t) \bullet R(t-t') dt' \quad (12)$$

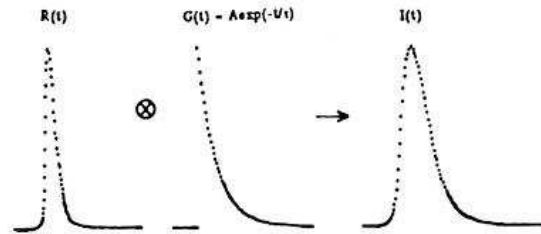


Figure 3. Le déclin observé de fluorescence est la convolution du "vrai" déclin et de la fonction d'appareil.

Nous ne dirons pas plus sur ce sujet qui dépasse largement l'objectif de ce chapitre mais nous renvoyons le lecteur au chapitre de P. Pernot.

2.2 Reconstruction spectrale

Nous avons déjà souligné l'intérêt d'obtenir des spectres de fluorescence résolus en temps. Si l'enregistrement direct des spectres résolus en temps n'est pas possible, on peut recourir à une reconstruction spectrale. La méthode "standard" pour obtenir des spectres résolus en temps est la reconstruction spectrale à partir de plusieurs cinétiques à différentes longueurs d'onde. Cette procédure a été décrite entre autres par Easter et al. [13] et Maroncelli et Fleming [14]. Ces auteurs ont en outre traité la déconvolution temporelle des cinétiques (voir 2.1 ci-dessus). A noter que la déconvolution temporelle impliquant la modélisation des cinétiques n'est pas nécessaire pour obtenir des spectres résolus en temps. Dans le cas général, chaque cinétique est ajustée par une fonction modèle spécifique (multi-exponentielle, voir éq. 3 ci-dessus). Plus intéressant, un ajustement global peut être effectué, dans lequel les durées de vie τ_i sont communes aux cinétiques enregistrées aux différentes longueurs d'onde. Seuls les facteurs pré-exponentiels $a_i(\lambda)$ sont propres à chaque cinétique. En portant ces facteurs en fonction de la longueur d'onde, on obtient les spectres de fluorescence associés aux déclins ("Decay Associated Spectra" (DAS) en anglais) [15, 16]. Alternativement, un système d'équations différentielles, tel qu'indiqué ci-dessus, peut être utilisé. Si on attribue à chaque espèce (état), une bande d'émission propre, on obtient les spectres de fluorescence associés aux espèces (Species Associated Spectra (SAS) en anglais) [17].

2.3 Méthodes conventionnelles

Les méthodes "conventionnelles" mentionnées plus haut comportant les caméras CCD (Charged-coupled device) intensifiées, les photomultiplicateurs ou photodiodes associées à un oscilloscope rapide, la technique de modulation de phase, la caméra à balayage de fente et la technique du comptage de photons uniques. Nous présenterons brièvement les trois premières méthodes.

L'utilisation des caméras à matrice CCD intensifiées est répandue en imagerie, en spectroscopie de phosphorescence et en spectroscopie Raman. En général, la résolution temporelle est de quelques nanosecondes. L'utilisation d'un détecteur CCD en combinaison avec une porte électronique ultra-rapide a été décrite, entre autres, par van der Zwan et coll. [18] et Geipel et al. [19]. Van der Zwan et coll. ont notamment enregistré les spectres de fluorescence du tryptophane avec une caméra CCD intensifiée avec un temps d'ouverture de 200 picosecondes. Ils mettent en avant la grande rapidité d'acquisition des spectres, même si la résolution temporelle est relativement limitée.

Le couplage d'un détecteur rapide avec un oscilloscope à grande bande passante est un outil de routine dans tout laboratoire effectuant des mesures photophysiques (en physique, chimie, biologie ou en médecine). Une revue très instructive sur différents détecteurs rapides a été donnée par Hungerford et Birch [20].

Il est aujourd'hui facile de se procurer des photodiodes rapides avec un temps de montée bien inférieur à 100 picosecondes, couvrant toute la gamme spectrale visible ainsi que l'UV et l'IR proches. Le développement des photodiodes est poussé par les technologies des télécommunications [21], mais la sensibilité n'est pas toujours suffisante pour des applications spectroscopiques. La sensibilité des photodiodes dépend de la surface active : plus grande est la surface, plus grande est la sensibilité. Or, le temps de réponse augmente avec la surface. Les photodiodes les plus rapides ont de faibles surfaces de photocathode, elles sont donc peu sensibles. Notamment, des photodiodes à avalanche (APD) permettent aujourd'hui d'atteindre des fréquences de transmission de signal de 10 THz [22]. Il est aujourd'hui possible d'acquérir un oscilloscope numérique avec une bande passante de 10 GHz à un prix tout à fait abordable. La mesure directe des durées de vie de fluorescence sub-nanoseconde en utilisant un photomultiplicateur à galette de microcanaux (multi-channel plate, MCP, en anglais) couplé à un oscilloscope numérique est facile et la méthode est de grande sensibilité, comme l'ont rapporté Nishimura et Tamura [23].

Pour la technique de modulation de phase, qui permet d'obtenir une excellente résolution temporelle de quelques picosecondes, nous renvoyons au livre de Bernard Valeur [1].

2.4 Comptage de photons uniques

La technique du comptage de photons uniques est appelée en anglais "Time-Correlated Single Photon Counting" (abréviation "TCSPC"). C'est une technique bien établie et d'excellents ouvrages, dont le livre de O'Connor et Philips [24] et l'article de Birch et Imhof [25], en donnent des descriptions détaillées. Cette technique est utilisée le plus souvent à un longueur d'onde monochromatique avec un photomultiplicateur. On peut couvrir toute la gamme UV/VIS/IR en choisissant le photomultiplicateur (plus précisément le matériau de la photocathode). Très récemment, des détecteurs matriciels ont été utilisés, permettant de combiner dispersion spectrale ou imagerie (résolution spatiale) avec une détection résolue en temps. La résolution temporelle est dans les deux cas limitée à quelques dizaines de picosecondes (largeur fwhm).

2.4.1 Principe

L'excitation d'un échantillon par une source laser donne lieu à une émission de photons que l'on recueille par l'intermédiaire d'un détecteur rapide. L'expérience consiste à "chronométrer" le temps entre l'impulsion d'excitation et l'émission du photon unique de fluorescence. Un dispositif électronique rapide permet de mesurer le temps écoulé entre l'émission de l'impulsion laser et l'unique photon de fluorescence qui est détecté. Pour obtenir un déclin, il faut accumuler un grand nombre de mesures et procéder par une reconstitution statistique. La probabilité de réception d'un photon unique étant proportionnelle à l'intensité de l'émission de fluorescence, elle-même proportionnelle à la concentration d'espèces excitées, on obtient la reconstitution statistique du déclin de fluorescence ou un spectre d'émission de fluorescence résolue dans le temps. Il est important de noter qu'une condition nécessaire est qu'un seul photon en émission au plus soit pris en compte par le photomultiplicateur pour tous les 100 impulsions d'excitation (Loi de Poisson). Le signal de synchronisation avec l'impulsion laser est obtenu avec une photodiode rapide. Le détecteur de fluorescence est le plus souvent un photomultiplicateur classique ou équipé d'une galette de microcanaux, mais des photodiodes à avalanche ont également été utilisées avec succès [26, 27]. Le choix entre les deux types de photomultiplicateur dépend de la sensibilité et de la résolution temporelle souhaitées. La sensibilité spectrale dépend de la photocathode; elle va de l'UV proche à l'IR proche selon le matériau (alcalin, multi-alcalins) choisi.

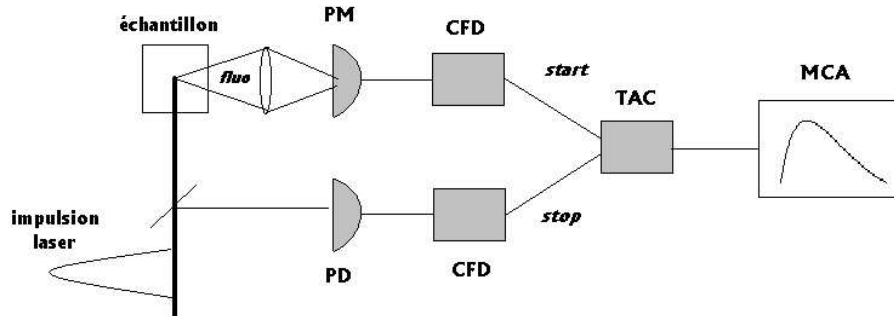


Figure 4. Dispositif du comptage de photons. PM – photomultiplicateur, PD – photodiode, CFD - discriminateur à fraction constante, TAC - convertisseur temps amplitude, MCA - analyseur multicanal.

Un photomultiplicateur conventionnel a un gain plus important qu'un photomultiplicateur à galette de microcanaux au détriment de la résolution temporelle [28]. Typiquement, l'impulsion générée par le premier a une durée de quelques nanosecondes à mi-hauteur tandis que celle délivré par le second est de quelques centaines de picosecondes.

La galette de micro-canaux (MCP) est une mince galette de tubes capillaires de verre dont la surface interne est recouverte d'un matériau émetteur d'électrons secondaires [29]. L'amplification s'effectue par génération d'électrons à l'intérieur même des tubes, le gain dépendant de la tension appliquée entre l'entrée et la sortie des tubes.

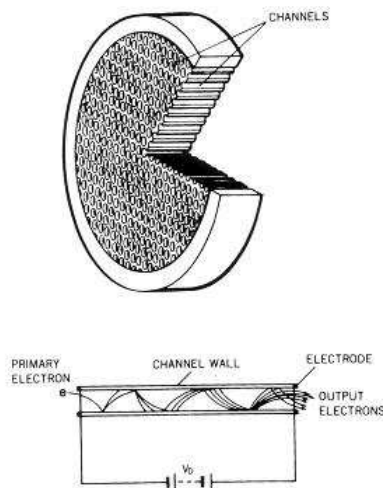


Figure 5. Dessin schématique d'une galette de microcanaux. (Autorisation de...)

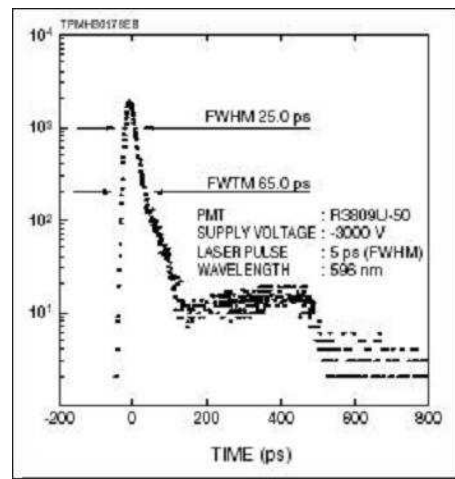


Figure 6. Fonction d'appareil obtenue avec une galette de microcanaux. Largeur temporelle 25 picosecondes fwhm. (Autorisation de...)

La détermination du temps séparant les deux signaux de départ et de fin est accomplie dans le convertisseur temps amplitude (TAC). Le signal de départ (l'excitation) déclenche la charge d'un condensateur et le signal de fin, l'arrêt de la charge. La tension ainsi fournie est proportionnelle au temps entre les deux évènements. Or, pour obtenir un fonctionnement

optimal, un soin particulier est donné au traitement de la forme temporelle des signaux venant de la photodiode et du photomultiplicateur. L'utilisation d'un discriminateur à fraction constante (CFD) permet d'obtenir une impulsion nette et stable en amplitude qui servira de référence temporelle. En mode normal de fonctionnement, le signal de la photodiode sert de départ et le signal du photomultiplicateur de fin. L'inconvénient de ce mode de fonctionnement est qu'il s'effectue à une fréquence de répétition égale à celle de l'excitation, qui peut être très élevée, jusqu'à plusieurs dizaines de MHz. On lui préfère le mode inverse dans lequel on permute l'origine des signaux départ et fin du TAC, ce qui permet de diminuer cette fréquence de (au moins) deux ordres de grandeur. A noter que les systèmes modernes fonctionnent à des fréquences de répétition pouvant atteindre la centaine de MHz.

2.4.2 Exemples d'applications

De très nombreux exemples de l'utilisation de cette technique existent dans la littérature. Nous nous contenterons, ici, de citer les travaux de Karolczak et al. qui ont cherché à définir la limite de résolution temporelle possible avec la technique de comptage [30]. En particulier, ils ont mesuré la courte durée de vie de la fluorescence émise par l'état S_2 de la xanthone. Une déconvolution précise combinée à des simulations leur a permis d'établir la durée de vie du déclin de fluorescence $\tau_F = (8,0 \pm 0,5)$ picosecondes, c'est-à-dire avec une résolution temporelle sub-picoseconde.

2.4.3 Imagerie en durée de vie de fluorescence

La technique d'imagerie en durée de vie de fluorescence permet de visualiser le microenvironnement des sondes fluorescentes (FLIM). La durée de vie de l'état excité est effectivement sensible à l'environnement microscopique et renseigne sur des paramètres physiques (polarité, viscosité, encombrement, etc.) et chimiques (pH, ions, réactivité, etc.). Tramier et al. ont rapporté l'utilisation d'un dispositif basé sur deux galettes de microcanaux, qui permet d'appliquer une porte temporelle, et une anode en mode "quadrant", qui fournit un signal qui dépend de la position [31]. Ce détecteur permet une résolution temporelle et spatiale qui, utilisée avec un microscope, permet l'imagerie résolue en temps de la fluorescence émise d'une cellule.

2.5 Caméra à balayage de fente

L'utilisation d'une caméra à balayage de fente permet en principe une détection polychromatique couvrant toute la gamme UV/VIS/IR. C'est également une technique bien établie et de nombreux et excellents ouvrages en donnent des descriptions détaillées, entre

autres de Nordlund [32] et Davis et Parigger [33]. La résolution temporelle de cette technique est dans la plupart des cas limitée à quelques picosecondes (largeur fwhm), mais des mesures avec une résolution sub-picoseconde ont été rapportés dans la littérature [34].

Les caméras à balayage de fente ont en effet trouvé une grande utilisation pour le diagnostic des lasers impulsions, même si la résolution temporelle est aujourd'hui insuffisante pour caractériser des impulsions femtoseconde. Nous allons ici nous intéresser à leur utilisation comme outil pour mesurer l'évolution temporelle de la fluorescence émise par un échantillon après une photo-excitation ultrarapide.

2.5.1 Principe

La caméra à balayage de fente peut être représentée comme une sorte d'oscilloscope cathodique. La fluorescence est collectée et focalisée sur la fente d'entrée de la caméra dont l'image est faite sur la photocathode du tube convertisseur d'image. Les photoélectrons émis sont défléchis par une tension de balayage avant d'arriver sur un écran phosphorescent amplifié associé à une caméra CCD. La modulation temporelle de la fluorescence est ainsi traduite à une modulation spatiale de l'image.

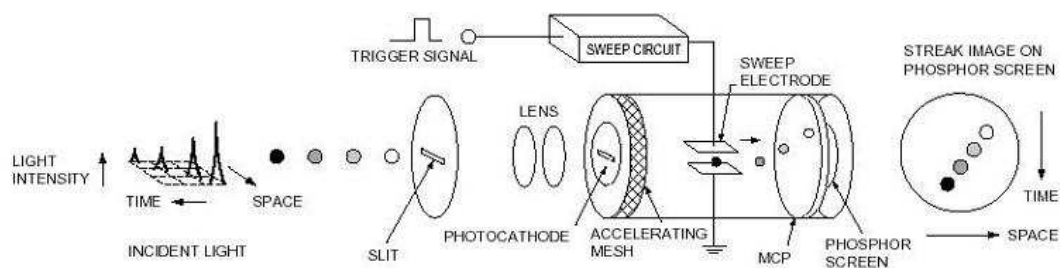


Figure 7. Caméra à balayage de fente. (Autorisation de...)

Souvent, la fluorescence est résolue spectralement par un spectrographe avant d'être focalisée sur la fente d'entrée de la caméra. Ainsi, une double dispersion spectrale et temporelle est obtenue et l'information est enregistrée sous forme d'images 2D.

2.5.2 Exemples d'applications

Comme pour le comptage, de très nombreuses applications peuvent être trouvées dans la littérature. Nous nous contenterons de donner deux exemples particulièrement intéressants à nos yeux.

Plessow et coll. ont utilisé une caméra à balayage de fente avec une résolution temporelle de quelques picosecondes pour étudier la fluorescence UV très faible des oligomères synthétiques de l'ADN [35]. Les résolutions spectrale et temporelle leur ont permis d'observer

des différences importantes selon la séquence des bases nucléiques. Notamment, pour l'oligomère (AT)₈, ils observent une fluorescence de très longue durée de vie (1.9 ns), attribuée à un exciplexe. Pour l'oligomère (CG)₈ en revanche, ils observent une importante baisse d'intensité de fluorescence par rapport à la guanine ou à la cytosine monomérique, interprétée comme due à une inhibition de la fluorescence.

Kennis et coll. ont utilisé une caméra à balayage de fente avec une résolution temporelle de quelques picosecondes pour étudier la fluorescence du Photosystème I [36]. Ce qui rend cette étude intéressante est qu'ils ont juxtaposé les cinétiques picoseconde obtenues avec la caméra avec des cinétiques femtoseconde obtenues par génération de somme des fréquences (voir ci-dessous). Ainsi, ils ont pu couvrir une gamme temporelle très large avec une excellente résolution aux temps courts. Ils ont pu distinguer différentes étapes dans le transfert et la relaxation d'énergie, allant de 360 femtosecondes à 9,8 picosecondes, jusqu'au piégeage final après 38 picosecondes.

2.6 Méthodes optiques

Nous allons maintenant aborder les deux techniques de fluorescence résolue en temps qui permettent actuellement d'obtenir la meilleure résolution temporelle.

- l'effet Kerr optique
- la génération de somme de fréquences

Les deux techniques utilisent une "porte optique" dans un milieu optique non-linéaire pour échantillonner la fluorescence dans le temps. Cette porte est générée par une impulsion laser qui traverse le milieu et coïncide avec la fluorescence dans l'espace et dans le temps. Dans le cas de l'effet Kerr optique, le milieu non-linéaire fonctionne comme un "obturateur". Dans le cas de la somme de fréquences, un processus non-linéaire permet l'interaction directe entre l'impulsion "porte" et la fluorescence générant une lumière à une longueur d'onde différente qui peut être filtrée spectralement et détectée. Dans les deux cas, la résolution temporelle est en principe seulement limitée par la largeur temporelle de l'impulsion laser.

2.7 Effet Kerr optique

L'effet Kerr optique a été utilisé pour la première fois, en 1969, par Duguay et Hansen [37]. Ils ont utilisé la réponse non-linéaire ultrarapide de différents liquides, dont CS₂, pour étudier la fluorescence moléculaire avec une résolution temporelle seulement limitée par la durée de l'impulsion laser de quelques dizaines de picosecondes à l'époque [38]. Aujourd'hui,

l'utilisation de lasers femtoseconde et d'autres milieux non-linéaires, tels que des verres, permet d'atteindre une résolution temporelle de quelques centaines de femtosecondes [39-41]. La détection peut être polychromatique et la bande passante spectrale dépend du milieu utilisé. Dans les premiers montages basés sur le CS₂, la longueur d'onde la plus basse était de 380 nm. L'utilisation des verres ou des silices permet d'étendre la détection dans l'UV proche. Une excellente présentation sur ce sujet a été donnée par Arzhantev et Maroncelli [42].

2.7.1 Principe

La technique de l'effet Kerr optique utilise la réponse non-linéaire d'un milieu (liquide dans une cellule ou un cristal/verre) placé entre deux polariseurs croisés. En l'absence de champ électrique induit par l'impulsion laser polarisée, la fluorescence ne peut pas traverser le prisme analyseur.

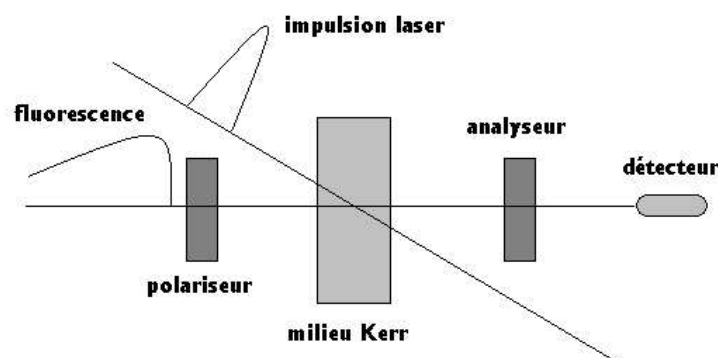


Figure 8. Montage d'un "obturateur" basé sur l'effet Kerr optique.

L'impulsion laser "porte" induit une anisotropie (biréfringence) instantanée dans le milieu, ce qui rend le système polariseur – milieu à effet Kerr – analyseur momentanément transparent. En effet, le champ électrique de l'impulsion "porte" oriente les molécules dans le milieu. Dans un liquide, cette orientation a une partie électronique et une partie orientationnelle, ce qui rend la réponse plus lente que dans un verre où la polarisation orientationnelle est interdite. L'inconvénient de cette technique est le niveau de bruit lumineux relativement élevé, soit de la lumière laser diffusée, soit de la luminescence générée par l'impulsion "porte" dans le milieu à effet Kerr.

2.7.2 Exemples d'applications

En utilisant une cellule de benzène de 1 mm d'épaisseur, Arzhantev et Maroncelli ont obtenu une résolution spectrale de 4 nm entre 400 et 650 nm et une résolution temporelle de 450 fs (fwhm) [42].

Zinth et coll. ont conçu un obturateur à effet Kerr optique en régime femtoseconde en utilisant une lame de silice (Suprasil 1 mm) comme milieu à effet Kerr. Ils ont utilisé des impulsions laser "porte" à 1100 nm, ce qui a permis de réduire considérablement le bruit lumineux venant du milieu à effet Kerr. Ils ont ainsi enregistré les spectres de fluorescence résolus en temps, avec une fonction d'appareil de 135 femtosecondes (fwhm), de deux chromophores, le β -carotène et un composé azobenzénique, tous les deux en solution dans le toluène [41]. Ces spectres de fluorescence sont résolus en temps entre 500 et 850 nm. Les deux composés montrent un déclin de fluorescence extrêmement rapide et biexponentiel, 103 et 415 femtosecondes pour le β -carotène, 80 et 620 femtosecondes pour le composé azobenzénique. Tandis que le spectre du β -carotène ne change pas de forme dans le temps, le spectre du composé azobenzénique, qui initialement a un pic prononcé à 550 nm, se transforme en un large continuum après 200 femtosecondes seulement. La possibilité de mesurer rapidement des transformations spectrales avec une résolution femtoseconde est indéniablement un point fort de cette technique.

2.8 Génération de somme de fréquences

La technique de génération de somme de fréquences est en anglais plus connue sous le nom de "fluorescence upconversion". La détection est en principe monochromatique mais des montages permettant une détection polychromatique ont été utilisés (voir ci-dessous). La résolution temporelle est seulement limitée par la largeur de l'impulsion laser, ce qui dans la pratique permet une résolution d'une centaine de femtosecondes. Les conditions intrinsèques de polarisation (accord de phase) permettent les mesures d'anisotropie de fluorescence.

La première étude "physicochimique" avec cette technique signée a été réalisée par Mahr et Hirsch 1975 [43]. Depuis, le nombre d'articles ne cesse pas de croître de façon quasi-exponentielle. A ce jour (avril 2005), on peut compter environ 350 articles qui présentent des études de fluorescence en solution basées sur cette technique. On peut y ajouter de nombreux autres articles qui présentent des études de photoluminescence dans l'état solide utilisant cette technique.

2.8.1 Principe et considération théoriques

Une description détaillée de cette technique ainsi que des conseils pratiques ont été donnés dès 1988 par Shah [44], et Kahlow et al. [45]. Un article de revue est paru récemment [46].

La technique de génération de la somme de fréquences est basée sur une expérience pompe-sonde. Une première impulsion laser ultra-brève porte le soluté dans un état excité

fluorescent. Une deuxième impulsion laser permet de sonder l'évolution temporelle de la fluorescence dans un cristal non-linéaire.

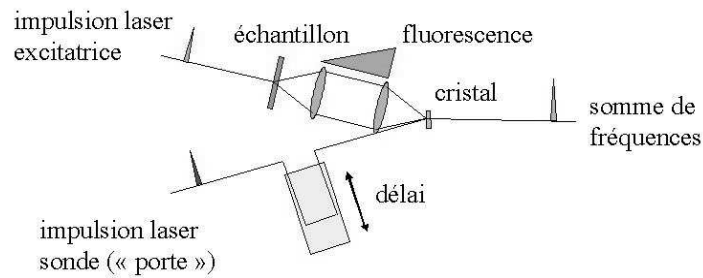


Figure 9. Dispositif "typique" de génération de somme des fréquences.

2.8.1.1 Accord de phase

La génération de la somme de fréquences respecte deux lois de la physique [44].

- La conservation d'énergie

$$\nu_S = \nu_F + \nu_L \quad (14)$$

où ν_S , ν_F et ν_L sont respectivement les fréquences de la lumière somme, de la fluorescence et de l'impulsion laser sonde.

- La conservation de la quantité de mouvement

$$\bar{\kappa}_S = \bar{\kappa}_F + \bar{\kappa}_L \quad (15)$$

où $\bar{\kappa}_S$, $\bar{\kappa}_F$ et $\bar{\kappa}_L$ sont respectivement les vecteurs d'onde de la lumière somme, de la fluorescence et de l'impulsion laser sonde. Cette expression

$$\frac{n_S}{\lambda_S} \hat{\mathbf{e}}_S = \frac{n_F}{\lambda_F} \hat{\mathbf{e}}_F + \frac{n_L}{\lambda_L} \hat{\mathbf{e}}_L \quad (16)$$

où les $\hat{\mathbf{e}}_i$ ($i=S,F,L$) sont les vecteurs unité dans les directions de propagation de la lumière somme, de la fluorescence et de l'impulsion laser sonde respectivement, est une relation vectorielle qui en mode colinéaire se réduit à

$$\frac{n_S}{\lambda_S} = \frac{n_F}{\lambda_F} + \frac{n_L}{\lambda_L} \quad (17)$$

Dans ce qui suit, nous traiterons seulement le cas colinéaire. En réalité, dans une vraie expérience, ce n'est jamais le cas mais cette condition simplifie le formalisme. Nous

remarquons ici que sous certaines conditions, le cas non-colinéaire peut être plus favorable pour optimiser la résolution temporelle [47, 48]. Pour respecter les deux lois de conservation données ci-dessus, un milieu anisotrope est nécessaire.

2.8.1.2 Cristaux optiques non-linéaire

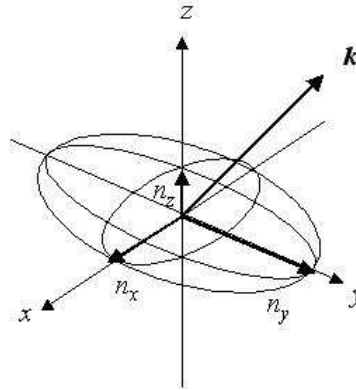


Figure 10. Indices de réfraction en fonction de direction de propagation dans un cristal anisotrope.

Un cristal anisotrope est caractérisé par son indice de réfraction qui varie en fonction de la polarisation et la direction de propagation à travers le cristal (voir Fig. 10).

Un cristal anisotrope peut être uniaxe ou biaxe

$$\text{uniaxe : } n_x = n_y \neq n_z \qquad \text{biaxe : } n_x \neq n_y \neq n_z$$

Nous limiterons la discussion aux cristaux uniaxes, dont il existe deux types :

$$\begin{aligned} \text{uniaxe positif :} \quad & n_x = n_y = n_o \\ & n_z = n_e \qquad n_o < n_e \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{uniaxe négatif :} \quad & n_x = n_y = n_o \\ & n_z = n_e \qquad n_o > n_e \end{aligned}$$

L'accord de phase dans un cristal uniaxe peut se faire de deux façons : type I ou type II

$$\text{type I :} \quad o + o \rightarrow e \text{ ou } e + e \rightarrow o$$

$$\text{type II :} \quad o + e \rightarrow e \text{ ou } e + o \rightarrow e$$

$$o + e \rightarrow o \text{ ou } e + o \rightarrow o$$

où o et e représentent les vibrations ordinaire et extraordinaire. Pour un cristal uniaxe positif (urée), toute combinaison produisant la somme selon e est impossible. Pour un cristal uniaxe négatif (BBO, LiIO₃), toute combinaison produisant la somme selon o est impossible. Dans un cristal de type I ($o + o \rightarrow e$), la fluorescence et le laser ont des polarisations parallèles. Dans un cristal de type II ($o + e \rightarrow e$) ou ($e + o \rightarrow e$), la fluorescence et le laser ont des polarisations perpendiculaires.

Pour un cristal de type I, l'angle d'accord de phase est donné par (P =porte, F =fluo, S =somme)

$$\sin^2 \theta_m = \frac{(1/n_S^2(\theta_m)) - (1/n_{o,S}^2)}{(1/n_{e,S}^2) - (1/n_{o,S}^2)} \quad (18)$$

où $n_S(\theta_m)$ est donné par

$$n_S(\theta_m) = n_{o,F} \frac{\lambda_S}{\lambda_F} + n_{o,P} \frac{\lambda_S}{\lambda_P}. \quad (19)$$

Le désaccord de phase est donné par

$$\Delta k = k_S - k_F - k_P = (1/c)(n_S \omega_S - n_F \omega_F - n_P \omega_P) \quad (20)$$

où c est la vitesse de la lumière et ω_i est la vitesse angulaire ($\omega_i = 2\pi c / n \lambda_i$).

Dans le cas réel, il faut tenir compte de l'épaisseur du cristal qui influence fortement la génération de la somme de fréquences.

L'efficacité quantique est donné par

$$\eta_q(\Delta k) = \frac{8\pi^2 d_{eff}^2 L^2 (P_P / A)}{c \epsilon_0^3 \lambda_F \lambda_S n_F n_S n_P(\theta_m)} \text{sinc}^2(|\Delta k|L/2) \quad (21)$$

où d_{eff} est le coefficient non-linéaire "effectif" du cristal (en m/V dans le système SI), L la longueur du cristal et P_P la puissance de l'impulsion laser [44]. (certains n peuvent dépendre du θ_m si polarisation e)

A noter que l'efficacité quantique η_q est proportionnelle au carré de la longueur L du cristal, la largeur temporelle Δt à L et la bande passante spectrale $\Delta \lambda$ à $1/L$. Le choix de la longueur du cristal est donc un compromis entre efficacité quantique, largeur temporelle et bande spectrale.

Il existe une multitude de cristaux optique non-linéaire avec des propriétés différentes. Les cristaux les plus souvent utilisés pour la somme des fréquences sont le LiIO₃, le KDP et surtout le BBO. Les caractéristiques d'un grand nombre de cristaux optique non-linéaire ont été rassemblées par Dmitriev, Gurzadyan et Nikogosyan en 1999 dans le livre "Handbook of nonlinear optical crystals" [49]. Or, la recherche de nouveaux matériaux et cristaux pour des applications d'optique non-linéaire se poursuit constamment, en particulier pour étendre leur utilisation dans l'UV [50]. Des cristaux à base de borate semblent être de bons candidats [51] et certains cristaux organiques montrent des caractéristiques tout à fait intéressantes [52]. Il reste, bien entendu, à voir leur intérêt pour la génération de somme de fréquences.

Les paramètres importants à considérer en choisissant un cristal sont l'efficacité relative η_q , la longueur d'onde de transmission la plus basse λ_{min} et le seuil de dommage I_d . La longueur d'onde de transmission la plus basse λ_{min} est déterminante pour la longueur d'onde la plus faible de fluorescence $\lambda_{fluo,min}$ pouvant être convertie. Dans le tableau ci-dessous, en prenant $\lambda_{laser} = 800$ nm, nous avons calculé les efficacités relatives de génération de la somme de fréquences pour une fluorescence à 600 nm dans divers cristaux [53].

| | d_{eff} | d_{eff} (pm/V) 800+600 | η (rel) 800+600 | I_d (GW/cm ²) | λ_{min} (nm) | $\lambda_{fluo,min}$ (nm) |
|-------------------------|---|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------------|
| KDP (ooe) | $d_{36} \sin \theta \sin 2\varphi$ | 0,3440 | 1,0 | 30 (532 nm/30 ps) | 240 | 343 |
| CLBO (ooe) | $d_{36} \sin \theta \sin 2\varphi$ | 0,5630 | 2,8 | 25 (1064 nm/1 ns) | 216 | 296 |
| LBO (ooe) | $d_{32} \cos \theta$ | 0,6420 | 2,8 | >80 (800 nm/1 ps) | 261 | 388 |
| BBO (ooe) | $d_{31} \sin \theta - d_{22} \cos \theta \sin 3\varphi$ | 1,9700 | 24,6 | 10 (694 nm/20 ps) | 189 | 247 |
| LiIO ₃ (ooe) | $d_{31} \sin \theta$ | 4,5300 | 77,0 | 12 (532 nm/32 ps) | 300 | 481 |

Tableau 1. Paramètres à considérer en choisissant un cristal optique non-linéaire.

2.8.2 Exemples d'applications

Parmi les quelques centaines d'articles qui présentent des résultats obtenus avec la technique de la génération de la somme de fréquences, il est impossible de choisir seulement un ou plusieurs articles qui sont plus représentatifs que les autres. Une revue assez vaste des exemples d'applications portant sur les études de la dynamique de solvation et des processus de relaxation configurationnelle avec cette technique a été faite par Glasbeek et Zhang [54]. La technique de la génération de la somme de fréquences est relativement difficile à bien maîtriser et pratiquement tous ces travaux contiennent des solutions techniques et/ou des astuces qui méritent une attention particulière. Nous présenterons d'une façon générale des exemples de la génération de la somme de fréquences pour l'obtention des spectres de fluorescence résolus en temps.

2.8.2.1 Génération de somme de fréquences avec détection polychromatique

La méthode prédominante est la reconstruction spectrale, décrite ci-dessus. Or, plusieurs groupes ont développé des méthodes qui permettent d'obtenir le spectre de fluorescence résolu en temps par acquisition directe. Un des handicaps majeurs avec la technique de génération de la somme de fréquences est la largeur limitée de la fluorescence convertie, surtout si on utilise

un cristal épais, ce qui est souvent nécessaire pour augmenter la sensibilité. Un autre handicap est la différence des vitesses de groupe pour différentes composantes spectrales de la fluorescence. Le rouge va plus vite que le bleu, ce qui va distordre le spectre temporellement. Dans notre laboratoire, nous avons réalisé un dispositif de somme de fréquences qui permet l'acquisition de spectres entiers de fluorescence (= émission spontanée), résolus spectralement et temporellement [55]. Contrairement à la plupart des autres dispositifs existants, qui enregistrent la cinétique de déclin à chaque longueur d'onde fixe et effectuent une reconstruction spectrale, nous faisons varier la longueur d'onde à un délai fixe.

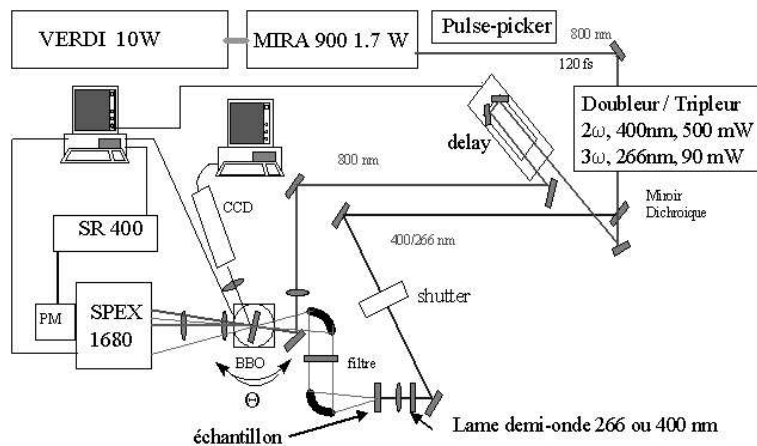


Figure 11. Le montage de somme de fréquences [55].

L'angle d'accord de phase est optimisé en fonction de la longueur d'onde. Pour tenir compte de la différence des vitesses de groupe, on minimise le nombre et les trajets dans les optiques réfractives utilisés pour la collection de la fluorescence en utilisant des miroirs paraboliques et on calcule la différence des vitesses de groupe dans les optiques réfractives restants avec une grande précision. La différence des parcours optiques pour deux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 de la fluorescence est

$$\Delta X = X_2 - X_1 = x(n_g(\lambda_1) - n_g(\lambda_2)) \quad (22)$$

où x est l'épaisseur du milieu réfractif traversé et n_g l'indice de réfraction. Le délai optique est corrigé par ΔX en fonction de la longueur d'onde. Ainsi, l'acquisition de spectres de fluorescence résolus en temps est faite "en direct".

Une méthode qui permet la conversion effective de la quasi-totalité de la bande de fluorescence a été présentée par Haacke et collaborateurs [56]. Ils ont conçu un système de génération de la somme de fréquences avec détection polychromatique sur un matrice CCD. Le point important de leur montage est la rotation continue du cristal pendant la mesure à un délai donné. Ainsi, tous les angles d'accord de phase sont effectivement réalisés si le temps d'acquisition est beaucoup plus long que le temps de rotation. La bande passante obtenue est

plus grande que 100 nm et ne montre pas de dépendance $(\sin(\Delta k)/\Delta k)^2$ (voir éq. 21) à cause de la divergence du laser et de la fluorescence.

Ernsting et collaborateurs ont proposé une autre méthode pour augmenter la bande spectrale convertie par le cristal [57]. Une imagerie de 10:1 donne un angle solide d'incidence de seulement 0.18 sr. Avec un cristal de KDP de 0.1 mm d'épaisseur, ils obtiennent ainsi une bande passante de plusieurs dizaines de nanomètres. La détection est effectuée avec une caméra CCD.

3 Bibliographie

- [1] B. Valeur: *Molecular Fluorescence*, Wiley, Weinheim, 2002.
- [2] J. B. Birks: *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley monographs in chemical physics, Wiley -Interscience, London, 1970.
- [3] J. B. Birks (Ed.), *Organic molecular photophysics*. Vol. 2, Vol. John Wiley & sons, London, 1973.
- [4] J. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1983.
- [5] J. Lakowicz (Ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1-4, Plenum Press, New York, 1991.
- [6] N. J. Turro: *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Mill Valley, California, 1991.
- [7] A. Gilbert, J. Baggott: *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991.
- [8] G. G. Gurzadyan, T. H. Tran-Thi, T. Gustavsson, *J. Chem. Phys.* 108 (1998) 385.
- [9] J. B. Birks, *J. Res. Nat. Bureau of Standard* 80A (1976) 389.
- [10] Jobin Yvon Horiba : A guide to recording fluorescence quantum yields, <http://www.jobinyvon.co.uk/ukdivisions/applications.htm>.
- [11] S. J. Strickler, R. A. Berg, *J. Chem. Phys.* 37 (1962) 814.
- [12] G. R. Fleming: *Chemical Applications of Ultrafast Spectroscopy*, Oxford University Press, 1986.
- [13] J. H. Easter, R. P. DeToma, L. Brand, *Biophys. J.* 16 (1976) 571.
- [14] M. Maroncelli, G. R. Fleming, *J. Chem. Phys.* 86 (1987) 6221.
- [15] J. R. Knutson, D. G. Walbridge, L. Brand, *Biochem.* 21 (1982) 4671
- [16] J. E. Loeffroth, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 1160.
- [17] L. Van Dommelen, N. Boens, M. Ameloot, F. C. De Schryver, A. Kowalczyk, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 11738.
- [18] A. Stortelder, J. B. Buijs, J. Bulthuis, C. Gooijer, G. v. d. Zwan, *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 705.
- [19] G. Geipel, M. Acker, D. Vulpius, G. Bernhard, H. Nitsche, T. Fanghanel, *Spectrochimica Acta Part A* 60 (2004) 417.
- [20] G. Hungerford, D. J. S. Birch, *Measurement Science and Technology* 7 (1996) 121.
- [21] K. S. Mobharan, R. Hartmayer, J. Valdmánis, *Laser Focus World* August (1999) 145.
- [22] E. J. Lerner, *Laser Focus World* April (2001) 147.
- [23] G. Nishimura, M. Tamura, *Physics in Medicine and Biology* 48 (2003) N283.
- [24] D. V. O'Connor, V. Phillips: *Time-correlated Single Photon Counting*, Academic Press, 1984.
- [25] D. J. S. Birch, R. E. Imhof, in: *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1. Techniques, J.R. Lakowicz (Ed.), Plenum Press, New-York, 1991, p. 1.

- [26] S. Cova, A. Lacaita, M. Ghioni, G. Ripamonti, T. A. Louis, *Review of Scientific Instruments* 60 (1989) 1104.
- [27] Y. Zhang, S. A. Soper, L. R. Middendorf, J. A. Wurm, R. Erdmann, M. Wahl, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 497.
- [28] E. J. Lerner, *Laser Focus World* June (2001) 151.
- [29] E. W. Small, in: *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1. Techniques, J.R. Lakowicz (Ed.), Plenum Press, New-York, 1991, p. 97.
- [30] J. Karolczak, D. Komar, J. Kubicki, T. Wrózowa, K. Dobek, B. Ciesielska, A. Maciejewski, *Chem. Phys. Lett.* 344 (2001) 154.
- [31] M. Tramier, K. Kemnitz, C. Durieux, J. Coppey, P. Denjean, R. B. Pansu, M. Coppey-Moisan, *Biophys. Chem.* 78 (2000) 2614.
- [32] T. M. Nordlund, in: *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1. Techniques, J.R. Lakowicz (Ed.), Plenum Press, New-York, 1991, p. 183.
- [33] L. M. Davis, C. Parigger, *Measurement Science and Technology* 3 (1992) 85.
- [34] K. Kinoshita, M. Ito, Y. Suzuki, *Review of Scientific Instruments* 58 (1987) 932.
- [35] R. Plessow, A. Brockhinke, W. Eimer, K. Kohse-Höinghaus, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 3695.
- [36] J. T. M. Kennis, B. Gobets, I. H. M. van Stokkum, J. P. Dekker, R. van Grondelle, G. R. Fleming, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 4485.
- [37] M. A. Duguay, J. W. Hansen, *Appl. Phys. Lett.* 15 (1969) 192.
- [38] M. A. Duguay, J. W. Hansen, *Optics Comm.* 1 (1969) 254.
- [39] J. Takeda, K. Nakajima, S. Kurita, S. Tomimoto, S. Saito, T. Suemoto, *Phys. Rev. B* 62 (2000) 10083.
- [40] R. Nakamura, Y. Kanematsu, *Review of Scientific Instruments* 75 (2004) 636.
- [41] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, P. Gilch, *Appl. Phys. B* 76 (2003) 809.
- [42] S. Arzhantsev, M. Maroncelli, *Appl. Spectrosc.* 59 (2005) 206.
- [43] H. Mahr, M. D. Hirsch, *Optics Comm.* 13 (1975) 96.
- [44] J. Shah, *IEEE J. Quant. Electron.* 24 (1988) 276.
- [45] M. A. Kahlow, W. Jarzeba, T. P. DuBruil, P. F. Barbara, *Rev. Sci. Instrum.* 59 (1988) 1098.
- [46] J.-C. Mialocq, T. Gustavsson, in: *New trends in fluorescence spectroscopy*, Vol. B. Valeur, J.-C. Brochon (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 2001.
- [47] H. Rhee, T. Joo, *Opt. Lett.* 30 (2005) 96.
- [48] L. Zhao, J. L. P. Lustres, V. Farztdinov, N. P. Ernsting, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7 (2005) 1716
- [49] V. G. Dmitriev, G. G. Gurzadyan, D. N. Nikogosyan: *Handbook of nonlinear optical crystals*, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin, 1999.
- [50] S. J. Matthews, *Laser Focus World* March (2003) 49.
- [51] C. Chen, *Laser Focus World* February (2004) 91.
- [52] J. O. White, D. Hulin, M. Joffre, A. Migus, A. Antonetti, E. Toussaere, R. Hierle, J. Zyss, *Appl. Phys. Lett.* 64 (1994) 264.
- [53] A. V. Smith, SNLO nonlinear optics code, National Laboratories, Albuquerque, NM 87185-1423, USA
- [54] M. Glasbeek, H. Zhang, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1929.
- [55] T. Gustavsson, L. Cassara, V. Gulbinas, G. Gurzadyan, J.-C. Mialocq, S. Pommeret, M. Sorgius, P. van der Meulen, *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 4229.
- [56] S. Haacke, R. A. Taylor, I. Bar-Joseph, M. J. S. P. Brasil, M. Hartig, B. Deveau, *J. Opt. Soc. Am. B* 15 (1998) 1410.
- [57] R. Schanz, S. A. Kovalenko, V. Kharlanov, N. P. Ernsting, *Appl. Phys. Lett.* 79 (2001) 566.

