



HAL
open science

Étude photodynamique de nanoparticules de BODIPY et développements méthodologiques pour l'imagerie de fluorescence super-résolue

Romain Bernex

► **To cite this version:**

Romain Bernex. Étude photodynamique de nanoparticules de BODIPY et développements méthodologiques pour l'imagerie de fluorescence super-résolue. Chimie théorique et/ou physique. Université Lille1 - Sciences et Technologies, 2016. Français. NNT: . tel-01581782

HAL Id: tel-01581782

<https://hal.science/tel-01581782v1>

Submitted on 5 Sep 2017

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.

Copyright

Université de Lille 1 – Sciences et Technologies

Ecole Doctorale de Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse de Doctorat

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lille 1

Discipline :

Optique, Lasers, Physico-Chimie et Atmosphère

Romain BERNEX

Etude photodynamique de nanoparticules de BODIPY et
développements méthodologiques pour l'imagerie de fluorescence
super-résolue

Soutenue le 13 décembre 2016 devant le jury :

Rapporteurs

Rémi METIVIER

Chargé de recherche, HDR, ENS Cachan

Pascal DIDIER

Maître de Conférences, HDR, Université de
Strasbourg

Examineurs

Rachel MEALLET RENAULT

Professeur, Université Paris-Saclay

Douglas RUTLEDGE

Professeur, AgroParisTech

Hervé VEZIN

Directeur de recherche, Université de Lille 1

Cyril RUCKEBUSCH (Directeur de thèse)

Professeur, Université de Lille 1

Michel SLIWA (Co-encadrant)

Chargé de recherche, Université de Lille 1

Remerciements

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont été effectués au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman de l'Université de Lille 1 (LASIR, UMR 8516). Je souhaite tout d'abord remercier Monsieur Guy BUNTINX et Hervé VEZIN, ancien et actuel Directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli pendant ces trois années de thèse. Je souhaite également remercier le Centre National de la Recherche Scientifique pour son financement sans lequel la réalisation de ces travaux n'aurait pas été possible.

Ces travaux ont été réalisés sous la direction de Monsieur Cyril RUCKEBUSCH, Professeur à l'école d'ingénieurs Polytech'Lille de l'Université de Lille 1. Cette thèse a été également co-encadrée par Monsieur Michel SLIWA, Chargé de recherche CNRS au LASIR. Je tiens à leur adresser mes plus sincères remerciements à tous les deux pour m'avoir fait profiter de leurs connaissances et de leurs expertises ainsi que pour m'avoir permis de donner des enseignements dans le cadre de ma thèse. Je les remercie également pour m'avoir offert une atmosphère et des conditions de travail plus qu'agréables au quotidien. Cyril, plus particulièrement pour son humour et sa pédagogie à toute épreuve, Michel pour s'être adapté à ma vision de la thèse, avoir pris du temps et j'espère du plaisir à me faire découvrir la photochimie, aussi bien la théorie que la pratique.

Que Rémi METIVIER, Chargé de recherche à l'Ecole Normale Supérieure de Cachan et Pascal DIDIER, Maître de Conférences à l'Université de Strasbourg, trouvent ici l'expression de ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont porté à la lecture de mon manuscrit de thèse et pour m'avoir fait l'honneur de le juger. J'adresse également tous mes remerciements à Madame Rachel MEALLET RENAULT, Professeur et Directrice adjointe du Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan et à Monsieur Douglas RUTLEDGE, Professeur à l'école d'ingénieur AgroParisTech, pour avoir accepté d'être dans mon jury de thèse en qualité de professeur invité. Je tiens à remercier fortement monsieur Hervé VEZIN,

Directeur de Recherche CNRS et Directeur du laboratoire LASIR de l'Université de Lille1, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant envers Monsieur Tsuyoshi FUKAMINATO, Professeur associé de l'Université de Kumamoto au Japon, pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait découvrir sa façon de vivre et de travailler avec une grande simplicité.

J'exprime ma gratitude envers Le Docteur Peter DEDECKER de l'université de Leuven, en Belgique, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et pour m'avoir aidé à la compréhension et la mise en œuvre d'un programme de simulation d'images.

Un grand merci également à Monsieur Olivier DEVOS, Maître de conférences à l'Université de Lille 1, pour avoir bien voulu me permettre d'enseigner dans son cours et pour m'avoir fait confiance dans la gestion et l'évaluation de mes enseignements.

Je tiens à saluer Les membres du LAISR qui m'ont soutenu lors de ces trois années, plus particulièrement les personnes qui ont un jour mis les pieds dans « l'aquarium » pour venir me parler de sciences, dessiner un « truc » au tableau ou me demander où est « passé » le Chef.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour ne jamais avoir douté de moi et pour m'avoir toujours encouragé et fait confiance dans mes choix. Ma sœur Caroline « Caro », son mari Philippe « Phiphi », mes deux neveux Paul « Polo » et Louis « Loulou » ainsi que mes parents Corine « Co » et Jean-Pierre « JP ».

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE.....	11
CHAPITRE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I.1 Introduction	17
I.2 La microscopie de fluorescence super-résolue.....	19
I.2.1 Principe de la fluorescence	19
I.2.2 Caractéristiques des sondes fluorescentes.....	20
I.2.3 Les sondes fluorescentes classiques pour l'imagerie.....	22
I.2.4 Processus photo-induits intermoléculaires.....	25
I.2.5 La microscopie de fluorescence	28
I.2.6 Limite de diffraction de la lumière	30
I.2.7 L'imagerie de super-résolution	33
I.2.7.1 Clignotement et photo-activation des sondes.....	33
I.2.7.1 L'imagerie de super-résolution en microscopie confocale	35
I.2.7.2 L'imagerie de super-résolution en champ large	37
I.2.7.3 L'importance des paramètres photo-physiques	39
I.2.8 Conclusion	40
I.3 Super-résolution de haute densité en champ large.....	42
I.3.1 Méthodes de multi-localisation	42
I.3.2 Méthodes de déconvolution.	43
I.3.3 Méthode couplant localisation et déconvolution.....	45
I.3.4 Quelle méthode choisir ?	46
I.3.5 Méthodes statistiques.....	48
I.3.6 Conclusion	50
I.4 Nanoparticules organiques pour la super-résolution	51

I.4.1	Nanoparticules organiques photo-commutables	51
I.4.2	Nanoparticules organiques avec clignotement	53
I.4.2.1	Extinction de fluorescence induite par agrégation	54
I.4.2.2	Emission de fluorescence induite par agrégation	54
I.4.2.3	Limitation de l'agrégation des molécules encapsulées.....	57
I.4.2.4	Clignotement par transfert d'exciton.....	61
I.5	Conclusion.....	65

CHAPITRE II CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE D'ENSEMBLE DE NANOPARTICULES POLYMERES A FORTE CONCENTRATION DE BODIPYS

II.1	Introduction	69
II.2	Conditions expérimentales	71
II.2.1	Structure des NPFs	71
II.2.2	Solvants	72
II.2.3	Spectroscopie d'absorption UV-visible stationnaire.....	72
II.2.4	Spectroscopie de fluorescence stationnaire	72
II.2.5	Spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde	73
II.2.6	TCSPC en solution.....	74
II.3	Résultats de l'étude des NPFs en solution	77
II.3.1	Détermination de la taille des NPFs	77
II.3.2	Spectres stationnaires UV-visible.....	77
II.3.3	Temps de vie de fluorescence	81
II.3.4	Anisotropie de fluorescence résolue dans le temps	85
II.3.5	Absorption transitoire femtoseconde.....	89
II.3.5.1	Comparaison BDPMA et NPF.....	89
II.3.5.1	Etude en fonction de l'énergie d'excitation (BDPMA)	91
II.3.5.1	Etude en fonction de l'énergie d'excitation (NPF)	94
II.4	Conclusion.....	102

CHAPITRE III CARACTERISATION DES NPFS PAR SPECTROSCOPIE DE PARTICULES UNIQUES

104

III.1	Introduction	106
III.2	Conditions expérimentales	107
III.2.1	Solvants	107
III.2.2	Préparation des échantillons.....	107
III.2.3	Source laser femtoseconde.....	107
III.2.4	Microscope de fluorescence résolue en temps	108
III.2.5	Caractérisation du microscope confocal	111
III.3	Etude par spectroscopie de particules uniques de l'émission des NPFs	113
III.3.1	Observation des NPFs uniques.....	113
III.3.2	Evolution de l'intensité en fonction du temps.....	114
III.3.3	Temps de vie.....	118
III.4	Conclusion.....	124
CHAPITRE IV	TRAITEMENT D'IMAGES FLUORESCENTES DE HAUTE DENSITE	126
IV.1	Introduction	128
IV.2	Simulations d'images	129
IV.2.1	Détail du programme	129
IV.2.2	Les simulations de données de haute densité	132
IV.3	MAPping PIXel dissimilarity (MAPPIX).....	134
IV.3.1	Principe.....	134
IV.3.2	Calcul de dissimilarité.....	135
IV.3.3	Discussion	136
IV.4	Etude sur données simulées.....	139
IV.4.1	Résultats	139
IV.4.2	Discussion	143
IV.5	Etude sur données réelles	145
IV.5.1	Préparation d'échantillons biologiques	145
IV.5.2	Conditions expérimentales	145

IV.5.3	Résultats	146
IV.6	Conclusion	149
	CONCLUSION GENERALE	151
	ANNEXE 1 : COMPTAGE DE PHOTONS UNIQUES CORRELES EN TEMPS	155
	ANNEXE 2 : CODE MATLAB	159
	ANNEXE 3 : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	167
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169

Liste des abréviations

ACQ	Aggregation-Caused Quenching
AIE	Aggregation-Induced Emission
APD	Avalanche PhotoDiode
BDPMA	BODIPY MethAcrylate
CCD	Charge Coupled Device
DAOSTORM	Dominion Astrophysical Observatory STochastic Optical Resolution Microscopy
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNQDI	dinaphthoquaterrylene diimide
DSPE-PEG	Distearoyl-Sn-glycero-3-PhosphoEthanol-amine-Poly(Ethylene Glicol)
EET	Excitation Energy Transfer
EMCCD	Electron-Multiplied Charge Coupled Device
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
FWHM	Full Width at Half Maximum
GFP	Green Fluorescent Protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IRF	Instrumental Response Function
ISM	Image Scanning Microscopy
ISMO	Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay
MAPPPIX	MAPping PIXel dissimilarity
MCP-PMT	Multichannel Plate - PhotoMultiplier Tube
ON	Ouverture Numérique
NPO	NanoParticule Organique
PAA	Poly(Acrylic Acid)
PA-GFP	PhotoActivable - Green Fluorescent Protein
PALM	Photo-Activation Localization Microscopy
pcSOFI	PhotoChromic Stochastic Optical Fluctuation Imaging
PEO	Poly(Ethylene glycol)
PLGA	Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)
PMMA	Poly(Methyl MethAcrylate)
PMT	PhotoMultiplier Tube

PS	PolyStyrène
PSF	Point Spread Function
QDs	Quantum Dots
RESOLFT	REverSible Optically Linear Fluorescence Transitions microscopy
SHG	Second Harmonic Generator
SIM	Structured Illumination Microscopy
SOFI	Super-resolution Optical Fluctuation Imaging
SPIDER	SParse deconvolution of high-DEnsity super-Resolution images
SPS	Semiconductor Production Systems
SRA	Stimulated Raman Amplification
STED	STimulated Emission Depletion
STORM	STochastic Optical Resolution Microscopy
STICS	Spatio-Temporal Image Correlation Spectroscopy
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence

Introduction générale

La microscopie de fluorescence est une technique de microscopie optique qui, au fil des années, est devenue un outil puissant pour l'observation de systèmes biologiques. L'emploi de sondes fluorescentes couplées à une séquence d'adressage (ARN) ou directement encodée génétiquement, permet l'observation spécifique de chaque composant d'une cellule biologique.

La microscopie de fluorescence s'est fortement développée suite à la première étude de molécule unique en phase condensée, réalisée en spectroscopie d'absorption par W. Moerner en 1989 [1] et récompensée par le prix Nobel de chimie en 2014. Cette étude a montré la possibilité de localiser et de suivre le déplacement d'une molécule unique fluorescente. En revanche, l'imagerie de fluorescence conventionnelle reste limitée par la diffraction de la lumière. L'image de chaque sonde fluorescente observée au travers d'un instrument optique limitant la propagation transversale de l'onde lumineuse est une tache de quelques centaines de nanomètres.

En 1994, la microscopie STED (*STimulated Emission Depletion*) [2], développée par Stefan Hell, également récompensé par le prix Nobel de 2014, est la première technique d'imagerie de fluorescence utilisant un microscope confocal permettant d'atteindre des résolutions inférieures à la limite de diffraction de la lumière. Les images produites sont qualifiées de super-résolues. Cette technique utilise le principe d'émission stimulée pour réduire la taille de la tache de fluorescence observée pour chaque sonde à quelques dizaines de nanomètres. En 2006, Eric Betzig développe la microscopie PALM (*Photo-Activation Localization Microscopy*), la première méthode de super-résolution en champ large, et est la troisième personne récompensée par le prix Nobel de 2014. Cette méthode contourne la limite de diffraction en utilisant la propriété qu'ont certaines sondes fluorescentes de pouvoir passer, sous irradiation, d'un état fluorescent (ON) à un état non fluorescent (OFF) au cours du temps. Grâce à cette propriété, les sondes vont pouvoir être isolées spatialement sur différentes images, pour y être localisées avec une précision de quelques dizaines de nanomètres. L'accumulation des différentes positions ainsi trouvées permet la construction d'une image super-résolue. Enfin, il faut mentionner la microscopie STORM

(*Stochastic Optical Resolution Microscopy*), une méthode dérivée de PALM, qui utilise cette fois-ci la propriété intrinsèque de clignotement de certaines sondes fluorescentes en spectroscopie de molécules uniques, c'est-à-dire la commutation réversible ON-OFF plusieurs fois au cours du temps. Contrairement à la microscopie PALM, la microscopie STORM utilise un seul laser pour obtenir les images et la photo-commutation. Cette méthode fait aujourd'hui référence dans les études de super-résolution en champ large en deux ou trois dimensions.

Les méthodes d'imagerie de fluorescence de molécules uniques en champ large présentent cependant des limitations. Tout d'abord, elles sont limitées par les propriétés de la sonde utilisée lors des expériences. Par exemple, la résolution de l'image finale dépend de la quantité de fluorescence émise par la sonde (brillance) et le nombre d'images qu'il est possible d'accumuler dépend de la durée de vie de la sonde (photo-stabilité). D'autre part, ces méthodes ne peuvent traiter que des images pour lesquelles une seule sonde est active par volume de diffraction, afin de pouvoir localiser les molécules une à une. En d'autres termes, elles ne peuvent pas traiter des images de haute densité, c'est-à-dire constituées d'un grand nombre de sondes simultanément actives, ce qui rend impossible la localisation individuelle des sondes. Pourtant, il existe de nombreuses études biologiques produisant des données de haute densité comme, par exemple, les études utilisant une protéine fluorescente encodée génétiquement, conduisant à son expression massive au sein de la cellule observée [3].

Le développement de la microscopie de fluorescence de molécules uniques en champ large se fait selon deux axes principaux. Le premier est le développement de nouvelles sondes fluorescentes dans le but d'atteindre des propriétés (biocompatibilité, brillance, photostabilité, etc.) toujours plus performantes [4]. Les recherches se sont notamment tournées vers la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes contenant un grand nombre de molécules fluorescentes [5]. Actuellement, la fabrication de nanoparticules dont la fluorescence peut-être photo-commutée ou présentant un clignotement intrinsèque, reste un « challenge » [6].

La deuxième voie possible est le développement de méthodes de super-résolution en haute densité. Actuellement, les méthodes de traitement statistique des données, telle que SOFI (*Super-resolution Optical Fluctuation Imaging*) [7], sont les moins limitées par la densité de sondes. Plus récemment, se sont développées des méthodes de déconvolution du signal,

tel que CSSTORM (*Compressed Sensing STochastic Optical Resolution Microscopy*) [8], FALCON (*FAst LOcalization algorithm based on CONtinuous-spaced formulation*) [9] ou encore SPIDER (*SParse deconvolution of high-DEnsity super-Resolution images*) [10], qui permettent également l'analyse d'images en haute densité.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans chacune de ces deux voies de développement de la microscopie de fluorescence super-résolue en champ large. La première partie de ce travail a été l'étude d'une nanoparticule organique fluorescente (NPF) composée de plus de 5000 molécules de BODIPY encapsulées et possédant une brillance environ 100 fois plus élevée que celle des sondes fluorescentes classiques. L'objectif était de comprendre les phénomènes de transferts d'énergie entre les molécules encapsulées (migration d'énergie par homo-FRET, quenching de fluorescence par annihilation singulet-singulet, formation d'espèces non fluorescentes), pour optimiser leurs propriétés de clignotement, dans le but de rendre ces NPFs potentiellement utilisables en imagerie de fluorescence super-résolue.

La deuxième partie de mon travail de thèse s'est intéressée à l'amélioration des techniques d'analyse d'images en haute densité. J'ai participé au développement d'une méthode d'amélioration de contraste en super-résolution, MAPPIX (MAPping Pixel dissimilarity) [11]. Cette méthode a pour but de traiter des données de très haute densité. Afin de valider cette approche, j'ai développé un programme de simulation d'images et une comparaison avec une méthode similaire (SOFI) a été réalisée.

Le **Chapitre I** est une étude bibliographique. Il expose les principes de la fluorescence ainsi que les différentes sondes fluorescentes utilisées en imagerie biologique. Ensuite, les différentes méthodes de super-résolution sont présentées et plus particulièrement les méthodes permettant l'analyse d'images en haute densité. Enfin, un intérêt tout particulier est porté aux nanoparticules organiques (NPOs) composées d'un grand nombre de molécules fluorescentes et aux différents transferts d'énergie interne possibles au sein de ces NPOs. Le **Chapitre II** présente les résultats obtenus lors de l'étude spectroscopique d'ensemble de nanoparticules organiques fluorescentes (NPFs) à base de BODIPY en solution. Des expériences en spectroscopie stationnaire UV-visible et en spectroscopie de fluorescence résolue en temps à l'échelle de la nanoseconde permettent d'étudier les phénomènes se produisant au sein des NPFs suite à l'excitation d'une molécule de BODIPY par NPF, à l'échelle de la nanoseconde. D'autre part, des expériences en spectroscopie

d'absorption transitoire à l'échelle de la picoseconde rendent possible l'observation des transferts d'énergie ayant lieu suite à l'excitation de plusieurs molécules (d'une dizaine à plus de 1500) de BODIPY par NPF, à l'échelle de la picoseconde. Le **Chapitre III** s'intéresse à la réalisation d'un montage de spectroscopie de fluorescence résolue en temps de molécules uniques ainsi qu'à l'étude des NPFs par spectroscopie de particules uniques. Cette expérience a pour but d'observer l'influence des différents transferts d'énergie et processus photo-induits, décrits lors du chapitre II, sur l'émission de fluorescence d'une NPF. Enfin, je présenterai dans le **Chapitre IV** le développement de MAPPIX, effectué pour l'analyse d'images et le traitement des données d'imagerie de haute densité de molécules uniques.

Chapitre I Etude bibliographique

I.1 Introduction

Les premières observations de petits objets à l'aide d'un système à deux lentilles datent du début du XVII^{ème} siècle [12]. Le mot *microscopium* est proposé à l'accademia dei Lincei de Rome en 1625. Il faut attendre 1665 pour voir véritablement référencé le premier microscope de l'histoire, le microscope de Hooke [13] (**Figure 1**).



Figure 1 : Image du microscope de Hooke, adaptée de [14].

Depuis son invention, le microscope a connu de nombreux développements visant à améliorer le grossissement ainsi que la quantité de lumière collectée. Les microscopes optiques actuels sont des systèmes beaucoup plus complexes, où les optiques se sont multipliées. Un microscope optique peut être utilisé en transmission, on parle de « diascopie » (du grec 'dia-', à travers). C'est-à-dire que l'échantillon est éclairé à l'aide d'un condenseur (**Figure 1**) du côté opposé à l'objectif et que l'image observée provient de la lumière transmise à travers l'échantillon (la plupart du temps transparent). Mais il peut également être utilisé en réflexion, on parle alors « d'épiscopie » (du grec 'épi-', par-dessus). Dans ce cas, la lumière incidente va passer au travers de l'objectif comme la lumière de collection, l'objectif joue aussi le rôle de condenseur.

La microscopie de fluorescence utilise le principe « d'épiscopie » ou « microscopie à épifluorescence ». Cela signifie que la lumière collectée à travers l'objectif provient de la fluorescence émise par l'échantillon. Cette technique est réalisable grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes, généralement des petites molécules ou des protéines, localisées dans la structure à étudier. L'utilisation de sondes fluorescentes directement attachées sur une cible d'intérêt permet l'observation spécifique.

Dans ce chapitre, je rappellerai brièvement les grands principes de la fluorescence, puis j'aborderai les bases de la microscopie de fluorescence de molécules uniques ainsi que les sondes et méthodes permettant d'accéder à la super-résolution. Ensuite, je me focaliserai sur le développement des méthodes super-résolution en champ large adaptées aux images de haute densité. Enfin, je présenterai certaines NPOs contenant un grand nombre de molécules fluorescentes et présentant des propriétés de photo-commutation, nécessaires à l'imagerie de super-résolution.

I.2 La microscopie de fluorescence super-résolue

I.2.1 Principe de la fluorescence

Une molécule qui absorbe un photon (lumière) passe de l'état fondamental S_0 à un état excité S_n (avec $n \geq 1$) (Figure 2).

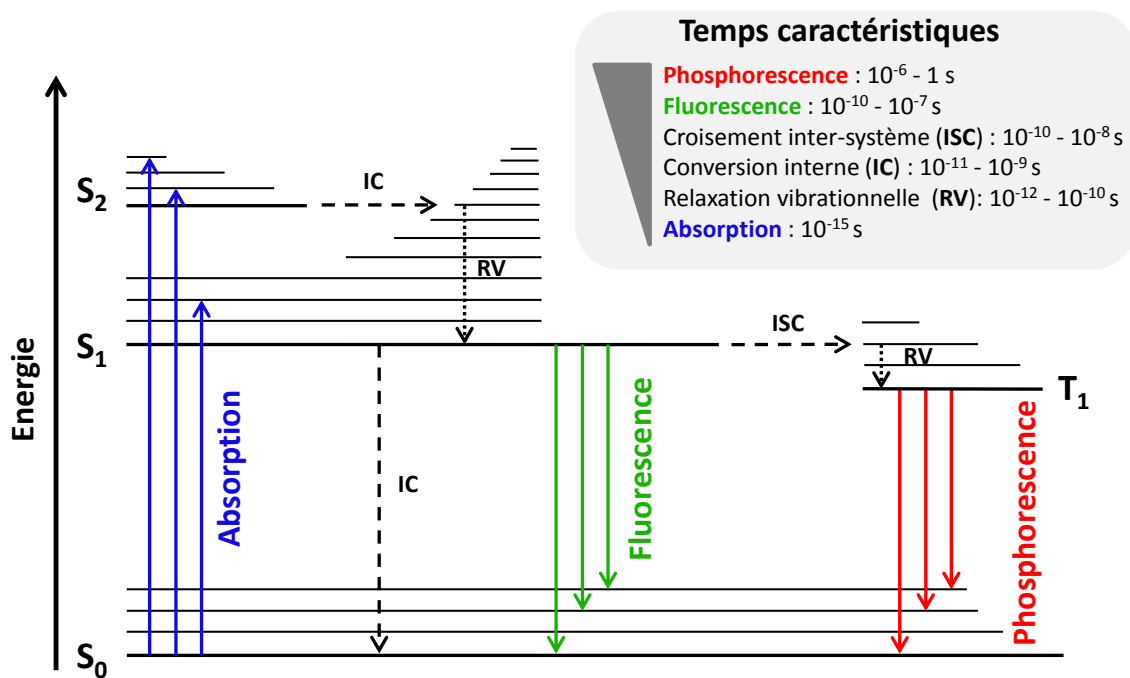


Figure 2 : Adaptation du diagramme de Perrin-Jablonski [15].

En quelques picosecondes, cette absorption est généralement suivie de processus de relaxation non radiatifs très rapides (conversions internes et relaxations vibrationnelles). La molécule se retrouve dans l'état excité de plus basse énergie (S_1). Il existe alors 2 voies possibles de désexcitation de l'état S_1 avec 2 constantes cinétiques k_r et k_{nr} , respectivement de façon radiative et non radiative. La fluorescence représente la voie radiative, les transitions de type conversion interne (S_1 vers S_0) et de type croisement inter-systèmes (S_1 vers T_1) constituent la voie non radiative. Ces 2 voies sont associées à des constantes de vitesse nommées k_r (fluorescence), k_{ic} (conversion interne) et k_{isc} (croisement inter-système) qui sont liées selon les relations écrites en équation (1).

$$k = k_r + k_{nr} \quad \text{avec} \quad k_{nr} = k_{ic} + k_{isc} \quad (1)$$

I.2.2 Caractéristiques des sondes fluorescentes

Il existe différentes caractéristiques importantes pour une sonde fluorescente. Elles vont régir le choix des paramètres d'une expérience de microscopie de fluorescence. Tout d'abord, la gamme spectrale de la sonde [16], généralement caractérisée par son maximum d'absorption (λ_{abs}) et son maximum d'émission de fluorescence (λ_{em}), séparés par le déplacement de Stokes [4] ou « Stokes shift » (**Figure 3**).

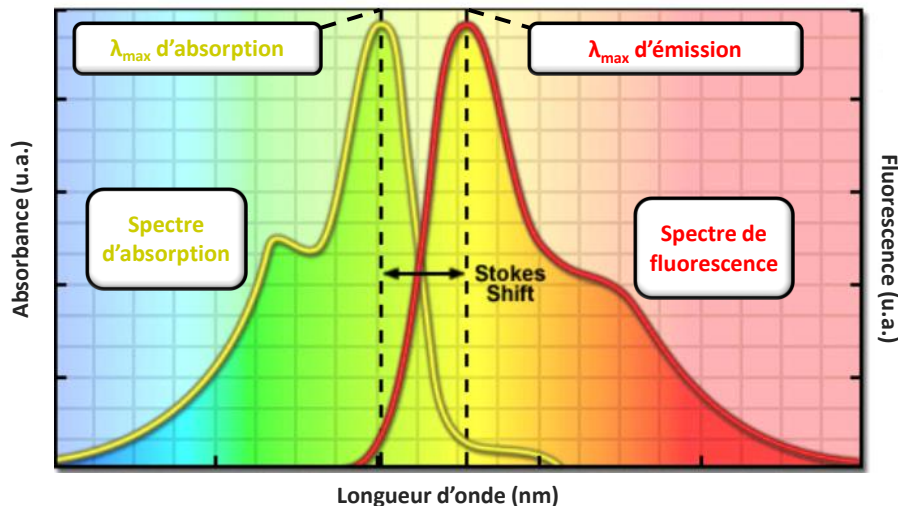


Figure 3 : Stokes Shift entre les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence. Adaptée de [17]

Le coefficient d'absorption molaire (ϵ_{λ} en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) dépend de la longueur d'onde d'excitation et caractérise la probabilité qu'un photon soit absorbé par une molécule. Il est le plus souvent défini par la loi de Beer-Lambert, où A_{λ} représente l'absorbance, l le trajet optique (en cm) et C la concentration (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de l'échantillon, voir équation (2). Il permet de définir la section efficace (σ , « cross section »), qui représente une surface d'absorption (en cm^2), voir équation (2).

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times l \times C \quad \text{et} \quad \sigma_{\lambda} = 3,82 \cdot 10^{-21} \times \epsilon_{\lambda} \quad (2)$$

Le rendement quantique de fluorescence (ϕ_{F}), caractéristique de l'efficacité du phénomène de fluorescence [18], correspond au nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés. Il indique le ratio entre la relaxation par voie radiative et la relaxation par voie non radiative de l'état S_1 . Il peut être défini suivant l'équation (3).

$$\phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (3)$$

La dépopulation de l'état excité S_1 suit une loi exponentielle décroissante. Le temps de vie de fluorescence (τ) décrit le temps moyen passé par les molécules à l'état excité S_1 [19]. Cette durée peut être définie à partir des constantes cinétiques radiative et non radiative. On obtient les relations de l'équation (4), avec $[S_1]$ la concentration de molécules à l'état S_1 .

$$[S_1] = [S_1]_0 \times e^{\frac{-t}{\tau}} \quad \text{et} \quad \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (4)$$

En imagerie, la quantité de lumière que l'on peut collecter va dépendre de la brillance [20] d'une sonde à une longueur d'onde donnée (B_λ). Elle dépend du nombre de photons absorbés par la molécule et du rendement quantique de fluorescence, selon la relation de l'équation (5). La brillance est additive, c'est-à-dire que la brillance totale d'un composé est égale à la somme des brillances des éléments qui le composent. Ce paramètre est très important en imagerie car il détermine la visibilité de la sonde.

$$B_\lambda = \varepsilon_\lambda \times \phi_F \quad (5)$$

Un autre paramètre important en imagerie est la photostabilité [21]. Elle correspond au nombre moyen d'excitations successives que peut subir une molécule depuis l'état fondamental avant d'être dégradée, ce qui limite le temps d'illumination d'un composé lors d'une expérience. En effet, les excitations successives d'une même sonde vont à terme conduire à sa dégradation, aussi appelé photo-blanchiment ou « bleaching ». Cette dégradation va maintenir la sonde dans un état non fluorescent permanent.

Enfin, la biocompatibilité [22], est un paramètre essentiel lors d'expériences réalisées sur des échantillons biologiques. Elle caractérise le degré avec lequel une sonde peut être placée dans un milieu biologique sans provoquer une réponse cellulaire ou engendrer un dysfonctionnement voir une destruction du milieu.

1.2.3 Les sondes fluorescentes classiques pour l'imagerie

De nombreuses sondes fluorescentes sont utilisées dans le domaine de l'imagerie biologique. Elles peuvent prendre la forme de protéines, de petites molécules organiques ou de nanocristaux inorganiques (QDs).

La GFP (*Green Fluorescent Protein*) [23] est la protéine fluorescente la plus connue dans le domaine de la bio-imagerie. Elle émet de la fluorescence dans le vert et possède une brillance (**Tableau 1**) d'environ $39\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Les protéines fluorescentes sont parfaitement biocompatibles, généralement de faibles poids moléculaires (26,9 kDa pour la GFP) et de tailles de quelques nanomètres, ce qui en fait de très bons candidats pour imager de petites structures (ex. pores nucléaires de 150 nm) sans dénaturer le milieu cellulaire. De plus, elles peuvent être encodées génétiquement, notamment via des méthodes de transfection cellulaire [3]. Associées à une séquence d'adressage spécifique, elles vont pouvoir être dirigées au travers de la cellule étudiée, sans être limitées par le passage au travers des membranes biologiques. En revanche, leur fonctionnalisation reste un problème en raison de leur complexité structurale et de leurs longueurs d'ondes d'excitation dans l'UV et le bleu, qui favorisent l'autofluorescence des structures biologiques [24]. De plus, un marquage génétique de la cellule ciblée génère une expression massive de la protéine fluorescente, ce qui conduit à de l'imagerie de haute densité et peut rendre très difficile des études de quantification.

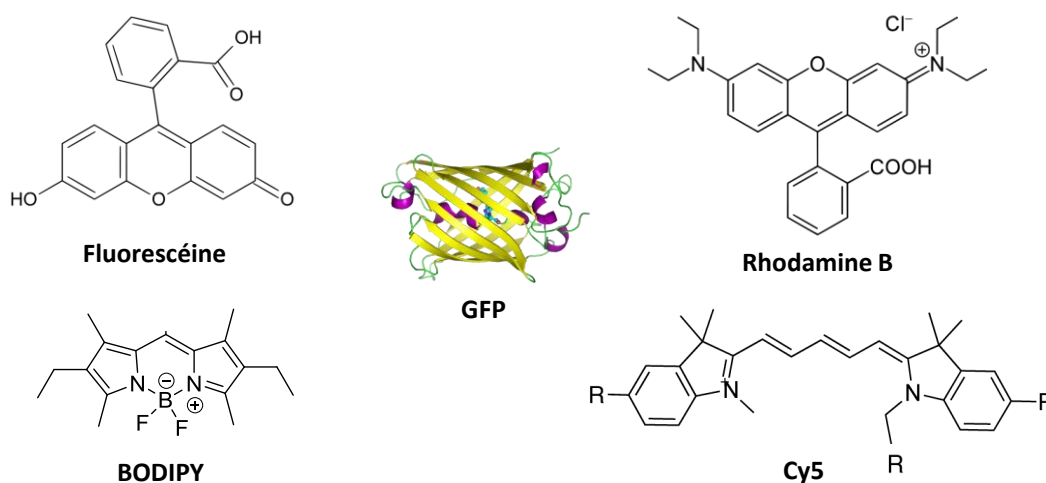


Figure 4 : Structures de sondes fluorescentes connues.

Les molécules organiques fluorescentes sont classées selon plusieurs familles. Les molécules organiques comme les Cyanines, les Rhodamines ou les BODIPYs sont très utilisées en ingénierie moléculaire pour le développement de nouvelles sondes aux propriétés spécifiques.

Les molécules de la famille des Xanthènes [25] possèdent de bonnes propriétés spectroscopiques (**Tableau 1**). Les principaux représentants de cette famille sont les rhodamines (RhB et Rh6G) qui émettent une fluorescence dans le vert-jaune. Elles possèdent des rendements quantiques de fluorescence proches de 1 et sont hydrosolubles ce qui les rend compatibles avec les milieux biologiques. De plus, leur émission de fluorescence est fonction du pH, c'est pourquoi ces sondes sont principalement utilisées dans les études *in vitro*.

Les molécules de la famille des Polyméthines sont également très utilisées dans le domaine de la microscopie de fluorescence. Les Cyanines (Cy3 et Cy5) sont les sondes fluorescentes les plus connues. Elles sont hydrosolubles et, contrairement aux Xanthènes, elles fluorescent à une longueur d'onde plus proche du rouge, mieux adaptée aux études *in vivo*.

Les BODIPYs (Bore-dipyrométhène) [26] forment une famille de molécules possédant un rendement quantique de fluorescence proche de 1, ce qui leur confèrent une forte brillance (**Tableau 1**). Ces molécules sont peu sensibles à la polarité et au pH de leur environnement. De plus, elles présentent une gamme d'émission de fluorescence modulable [27], ce qui les rend très adaptables au matériel expérimental (optiques et filtres) et permet de faire de l'imagerie multicolore, en combinant différents BODIPYs.

Sonde solvant	$\lambda_{\text{abs}} \text{ max}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}} \text{ max}$ (nm)	Φ_F (nm)	ϵ ($10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	B ($10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	τ (ns)
BODIPY méthanol	516	531	0,91	86	81	6,10
Rhodamine B éthanol	542	564	0,7	106	74,2	2,9
Cy5 PBS	650	667	0,27	250	67,5	1
Fluorescéine éthanol basique	500	540	0,97	92,3	89,5	3,6
GFP eau	487	509	0,68	57,5	39,1	3,2

Tableau 1 : Propriétés spectroscopiques de différentes sondes fluorescentes, utilisées dans l'imagerie. Rhodamine B [28], BODIPY [27], Cy5 [29], Fluorescéine [30], GFP [31, 32].

Enfin, les QDs sont des nanocristaux inorganiques semi-conducteurs (de taille 2 - 10 nm). Les plus connus sont composés d'un cœur de séléniure de cadmium (CdSe) et d'une coquille de sulfate de zinc (ZnS) [33]. Ils possèdent des temps de vie de fluorescence de plusieurs dizaines de nanosecondes et sont généralement employés pour leur grande photostabilité (plusieurs minutes) [34]. Ils présentent de bons rendements quantiques de fluorescence (0.5 à 1) et de fortes brillances ($60\,000$ à $600\,000 \text{ L.mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$), qui varient en fonction de leurs tailles [33, 35]. Leurs gammes d'émission de fluorescence peuvent être modulées, de 400 à 1400 nm, en faisant varier la nature de leurs composés de cœur et de surface [36, 37]. De plus, ils possèdent la propriété intrinsèque de clignoter. En revanche, afin de compenser leur hydrophobicité et de limiter leur cytotoxicité, il est nécessaire d'effectuer des modifications de surface via des polymères [38] qui conduisent à des nanoparticules de tailles finales de l'ordre de 15 - 25 nm [39]. Les QDs sont donc des nanoparticules possédant des propriétés très attractives dans le domaine de l'imagerie biologique. Cependant, leur cytotoxicité, causée par les molécules de cœur [40], constitue un inconvénient majeur lors d'études répétées ou prolongées.

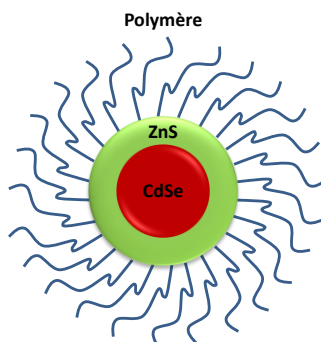


Figure 5 : Schéma représentant un quantum dot fonctionnalisé de type CdSe/ZnS.

Cette diversité de sondes fluorescentes permet notamment de pouvoir s'adapter à une multitude de conditions expérimentales. Elles tendent à être remplacées par des nanoparticules organiques, qui présentent une forte biocompatibilité et de grandes possibilités de fonctionnalisation [5]. De plus, l'utilisation simultanée de sondes possédant des gammes spectrales d'émission de fluorescence différentes, permet de réaliser des images multicolores.

1.2.4 Processus photo-induits intermoléculaires

Un transfert d'énergie entre une molécule à l'état excité et une molécule à l'état fondamental peut se produire soit de façon radiative via l'émission d'un photon par le donneur (D) et son absorption par l'accepteur (A), soit de façon non radiative. Dans ce dernier cas, deux processus différents peuvent avoir lieu : un échange d'électrons (mécanisme de Dexter) ou une interaction dipôle-dipôle (mécanisme de Förster) (**Figure 6**), aussi appelée FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) [41, 42]. Quand le FRET est possible entre deux molécules identiques on parle alors d'homo-FRET ou « *hopping* ».

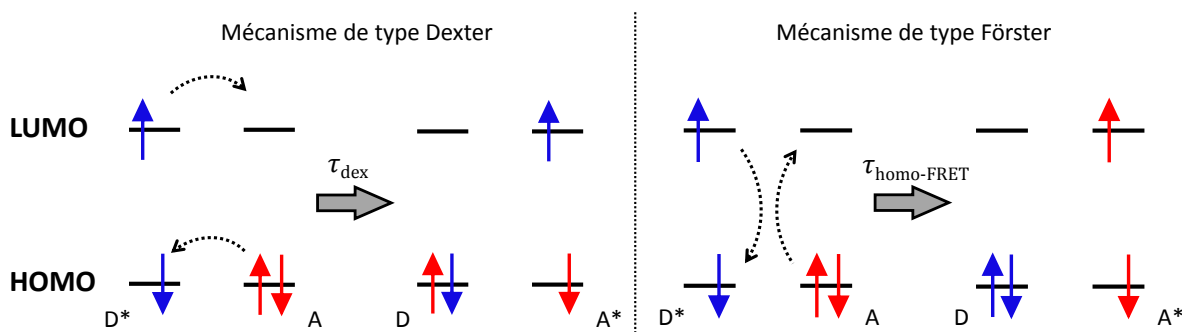


Figure 6 : Transfert d'énergie de type D*-A.

Le mécanisme de Dexter implique un recouvrement des orbitales moléculaires des deux molécules, son efficacité diminue de façon exponentielle avec la distance D-A. Il se produit donc majoritairement à très faible distance (< 2 nm). Le mécanisme de Förster dépend du recouvrement entre le spectre de fluorescence du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. Son efficacité (E) est également fonction de la distance entre les sondes D-A (voir équation (6)), où R (en Å) correspond à la distance D-A et R₀ (en Å) au « rayon de Förster ». Le « rayon de Förster » est la distance caractéristique pour deux sondes fluorescentes données dans un environnement donné pour laquelle la probabilité de transfert d'énergie est égale à 50 % (E = 0,5).

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (6)$$

La distance R₀ dépend du rendement quantique de fluorescence du donneur en absence de l'accepteur, de l'indice de réfraction (n) du milieu intersonde, de l'intégrale du recouvrement (J) entre les spectres de fluorescence du donneur et d'absorption de l'accepteur (en L.mol⁻¹.cm⁻¹.nm⁴) et du facteur d'orientation (κ²), voir équation (7). Les distances R₀ sont généralement comprises entre 3 et 7 nm.

$$R_0^6 = 8,79 \times 10^5 \times \phi_F \times \kappa^2 \times n^{-4} \times J \quad (7)$$

avec

$$J = \frac{\int_0^\infty I_D(\lambda) \times \varepsilon(\lambda) \times \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty I_D(\lambda) d\lambda}$$

Il existe également des transferts d'énergie de type Förster ayant lieu entre deux molécules excitées. Ces phénomènes vont dépendre de la puissance d'excitation de l'échantillon, afin d'avoir une forte probabilité de trouver deux molécules excitées suffisamment proches spatialement (entre 2 et 8 nm). On observe alors des effets d'annihilation [43, 44], qui peuvent être singulet-singulet, singulet-triplet ou triplet-triplet. Ces phénomènes vont faire passer un des deux électrons de l'orbitale LUMO vers une orbitale de plus haute énergie tandis que l'autre électron retombe à l'état fondamental. Cela

engendre une diminution de l'intensité et du temps de vie de l'émission de fluorescence (Figure 7).

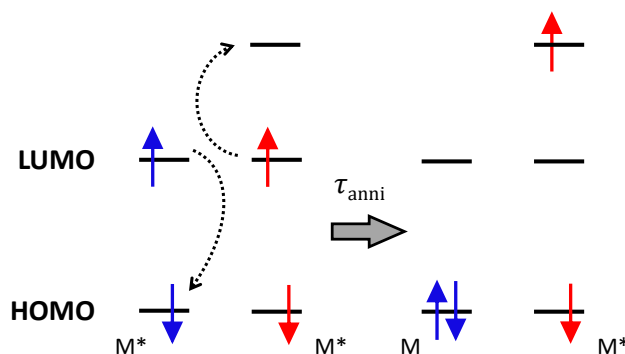


Figure 7 : Transfert d'énergie de type annihilation singulet-singulet ($M^* - M^*$).

Les processus photo-induits intermoléculaires peuvent également conduire à la formation d'espèces chimiques appelées excimères. Le mot excimère provient du terme anglais « *excimer* » qui est la contraction de « *excited dimer* », désignant un dimère à l'état excité. Ils sont formés par collision d'une molécule excitée M^* et d'une molécule de même type non excitée M (Figure 8). Leurs longueurs d'ondes d'émission de fluorescence sont déplacées vers le rouge, parfois de plusieurs centaines de nanomètres, comparé au monomère [45] (Figure 8). Leurs temps de vie de fluorescence diffèrent de ceux de la molécule d'origine et peut parfois être plus courts [46]. Il a également été montré que l'agrégation moléculaire, ou « π -stacking », favorise la formation d'excimères [47].

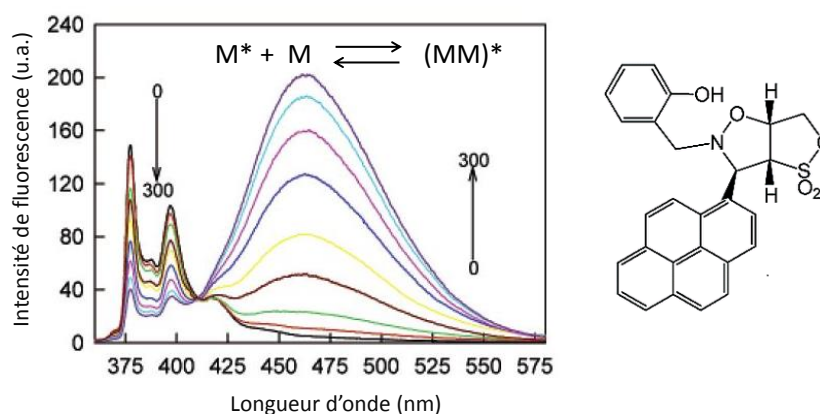


Figure 8 : Spectres d'émission de fluorescence d'un dérivé de pyrène (à 0,8 mM) en présence de différentes concentrations en ion argent (0, 0.4, 10, 15, 20, 40, 75, 150, 300 μ M). Bandes du monomère 375 et 400 nm et bande de l'excimère centrée vers 460 nm. Excitation à 344 nm. Adaptée de [45].

1.2.5 La microscopie de fluorescence

Les microscopes actuels sont adaptés pour être couplés à de nombreux appareils électroniques, pour la détection (caméra CCD, « *Charge Coupled Device* ») ou pour le déplacement automatique de l'échantillon (table piézoélectrique). La microscopie optique reste l'une des techniques les plus efficaces pour l'observation de systèmes ou de structures biologiques (**Figure 9**).

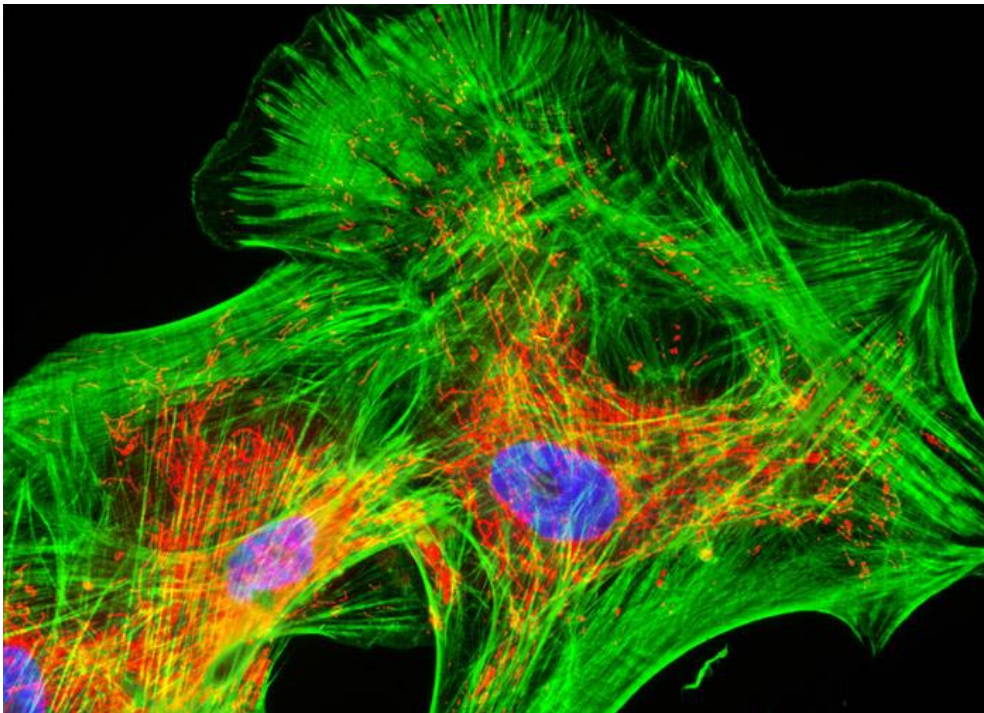


Figure 9 : Image de fluorescence de cellules neuronales du cortex cérébral humain [48]. Les mitochondries sont marquées par MitoTracker Red CMXRos (en rouge), les fibres d'actine du cytosquelette par Alexa Fluor 488 (en vert) et l'ADN du noyau cellulaire par Hoechst 33258 (en bleu).

En microscopie de fluorescence, la lumière blanche incidente est filtrée à l'aide d'un filtre d'excitation afin d'obtenir des longueurs d'ondes spécifiques correspondant à l'absorption de la sonde fluorescente. De plus, afin d'observer sélectivement la fluorescence émise par la sonde, un miroir dichroïque et un filtre d'émission vont permettre de ne collecter que les longueurs d'ondes supérieures à la longueur d'onde du laser utilisé.

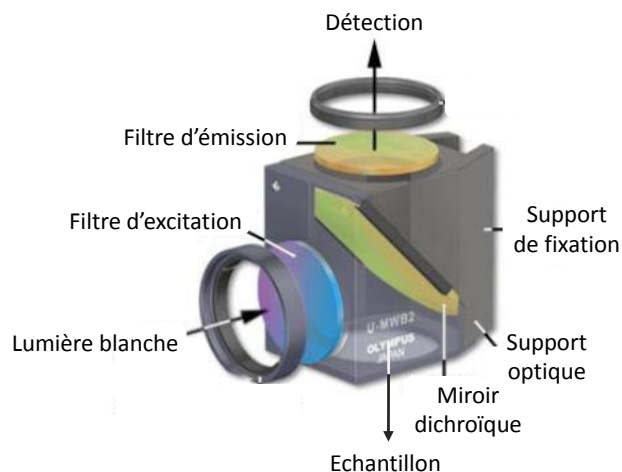


Figure 10 : Schéma d'un miroir dichroïque. Adaptée de [49]

Pour limiter l'émission collectée à celle provenant de l'objet que l'on observe, on peut utiliser un microscope confocal. Pour ce faire, l'excitation est focalisée et on ne collecte que la fluorescence provenant des sondes dans le plan focal de l'objectif en utilisant un diaphragme (diamètre d'une dizaine de nanomètre) placé devant le détecteur et dans un plan focal conjugué à celui de l'objectif. En microscopie champ large, il est possible de s'affranchir de la fluorescence de fonds en utilisant la microscopie par réflexion totale interne ou TIRF (« *Total Internal Reflexion Fluorescence* »), ou microscopie à champ évanescent. Dans ce cas la lumière d'excitation est confinée à une zone de quelques dizaines de nanomètres au-dessus de la lamelle en verre. En imagerie biologique [50], elle a notamment pour avantage de faciliter l'étude de structures proches de la surface de l'échantillon (ex. membrane plasmique).

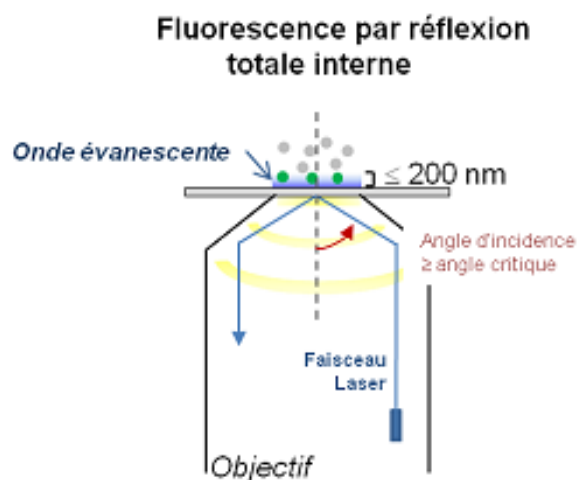


Figure 11 : Schéma de l'illumination d'un échantillon par microscopie TIRF. Adaptée de [51].

Il est également possible d'observer la localisation ou le déplacement d'une molécule unique, si celle-ci fluoresce. La première étude de molécules uniques en phase condensée a été réalisée par W. Moerner en 1989 [1]. Cette découverte fut récompensée par le prix Nobel de l'année 2014. En 1990, la fluorescence fut utilisée afin de détecter une molécule unique de pentacène [52]. L'étude de fluorescence de molécules uniques a été possible, en grande partie, grâce au développement des technologies de comptage de photons uniques associées au matériel de détection, photodiode à avalanche (APD, « *Avalanche PhotoDiode* ») et photomultiplicateur (PMT, « *PhotoMultiplier tube* »). Plus récemment, les études de fluorescence de molécules uniques sont devenues très importantes pour l'imagerie biologique, notamment au travers du marquage via des protéines fluorescentes qui a permis la compréhension de nombreux systèmes, comme l'action du couple myosine/actine dans les tissus musculaires [53].

1.2.6 Limite de diffraction de la lumière

La microscopie de fluorescence est limitée par la diffraction de la lumière. La grande majorité des molécules fluorescentes ont des tailles n'excédant pas quelques nanomètres alors que l'image de leur émission de fluorescence est une tache d'Airy [54] de quelques centaines de nanomètres, ce qui limite la résolution spatiale. C'est un problème majeur car il existe un grand nombre de structures biologiques possédant des tailles inférieures à la centaine de nanomètres.

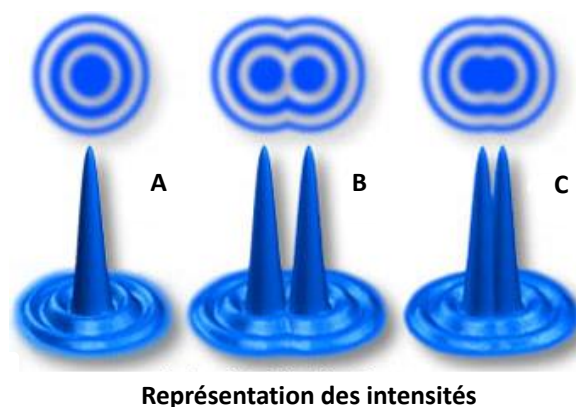


Figure 12 : Représentation d'une tache d'Airy. (A) Emission d'une molécule isolée. (B) Emission de deux molécules spatialement discriminables. (C) Emission de deux molécules séparées par la distance minimale permettant leur discrimination. Adaptée de [55].

La tache d'Airy est caractérisée par une fonction d'étalement du point ou « PSF » (*Point Spread Function*). La PSF est une distribution volumique d'énergie décrivant la réponse d'un système d'imagerie à une source ponctuelle. Cette réponse est décrite par une fonction de Bessel et est généralement approximée par une fonction gaussienne avec σ l'écart-type et μ l'espérance mathématique, voir équation (8). Cette PSF est caractéristique de l'instrumentation utilisée lors d'une expérience de microscopie de fluorescence.

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \times e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (8)$$

La PSF gaussienne est caractérisée par sa largeur à mi-hauteur (FWHM, *Full Width at Half Maximum*) (**Figure 13**) pouvant être déterminée suivant l'équation (9), avec FWHM et σ en nanomètre. Elle est également caractérisée par sa largeur à la base notée $1/e^2$ car elle se calcule à $1/e^2$ fois l'intensité maximum de la gaussienne, voir équation (10).

$$FWHM = 2\sigma\sqrt{2\ln(2)} \approx 2,35\sigma \quad (9)$$

$$\frac{1}{e^2} = 1,69 \times FWHM \quad (10)$$

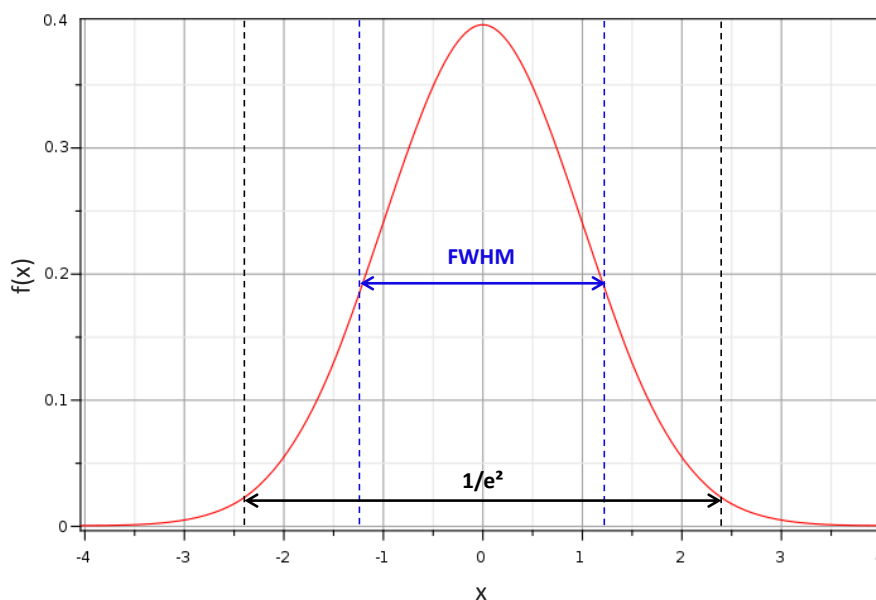


Figure 13 : Fonction gaussienne, avec $\mu = 0$ et $\sigma = 1$.

Le pouvoir de résolution, ou pouvoir de séparation, est la distance minimale qui doit exister entre deux points contigus pour qu'ils soient correctement discernés par un système de mesure ou d'observation, voir **Figure 12C**. Selon le critère de Rayleigh, deux pics sont séparables pour une configuration où le premier zéro du premier pic correspond au maximum du second. Donc, plus la largeur de la PSF est faible et plus la résolution spatiale de l'image est élevée. Dans le cas d'un microscope, la distance minimale (u) pour que deux pics soit séparés (en nm) est déterminée suivant l'équation (11) et dépend de l'ouverture numérique de l'instrument ($ON_{\text{objectif}} + ON_{\text{condenseur}}$, en nm).

$$u = \frac{1,22 \times \lambda_{em}}{ON_{\text{objectif}} + ON_{\text{condenseur}}} \quad (11)$$

Si l'ON du condenseur est égale à celle de l'objectif (microscopie d'épifluorescence), le pouvoir de résolution est donné par l'équation (12) :

$$u = \frac{0,61 \times \lambda_{em}}{ON_{\text{objectif}}} \quad (12)$$

L'ouverture numérique des objectifs actuels peut atteindre 1,5. D'après l'équation (12), on constate qu'avec une émission de fluorescence dans le domaine du visible (500 nm), la limite de résolution est d'environ 230 nm.

I.2.7 L'imagerie de super-résolution

I.2.7.1 Clignotement et photo-activation des sondes

Le clignotement, ou « *blinking* », est un phénomène stochastique intrinsèque d'une molécule [56] qui caractérise le passage réversible d'un état fluorescent (ON) à un état non fluorescent (OFF) sous irradiation continue. Le photo-clignotement est généralement considéré comme un inconvénient en spectroscopie de molécules uniques car celui-ci interfère avec le phénomène à imager. Différentes études ont montré que l'origine de ce photo-clignotement peut être assignée à une dynamique de l'état triplet [57], un changement de conformation [58], une ré-orientation moléculaire [59], un transfert d'électron intramoléculaire [60], ou encore à un transfert d'électron intermoléculaire entre la molécule excitée (formation d'un radical anion) et des pièges provenant de l'environnement qui l'entoure [61]. En fonction du mécanisme associé au clignotement les statistiques de distribution des temps ON et OFF d'une molécule suivent une loi de puissance [62, 63] ou une loi exponentielle [68]. Une molécule donnée peut clignoter rapidement ou rester dans un des deux états la quasi-totalité de l'expérience. Par exemple, la GFP, les Cyanines et les BODIPYs possèdent cette propriété photo-physique [64].

Il existe également des sondes photo-activables, c'est-à-dire des sondes qui vont passer irréversiblement d'une forme non fluorescente à une forme fluorescente sous irradiation. La PA-GFP (*PhotoActivable-Green Fluorescent Protein*) [65], un dérivé de la GFP, passe sous une forme fluorescente sous irradiation dans l'UV (390-405 nm), une excitation à 488 nm permet ensuite une émission de fluorescence constante. La stabilité de l'émission de fluorescence des sondes photo-activables les rend attractives pour des études de suivi de particule (« *tracking* ») [66].

Enfin, les sondes fluorescentes peuvent être photo-commutables, c'est-à-dire photo-activables et réversibles. Par exemple, la protéine Dronpa [3, 67] (**Figure 14**) passe sous une forme fluorescente sous irradiation UV (405 nm) et s'éteint par irradiation dans le bleu (488 nm). De plus, elle montre une photostabilité correspondant à plus de 100 excitations successives lors d'étude de molécules uniques.

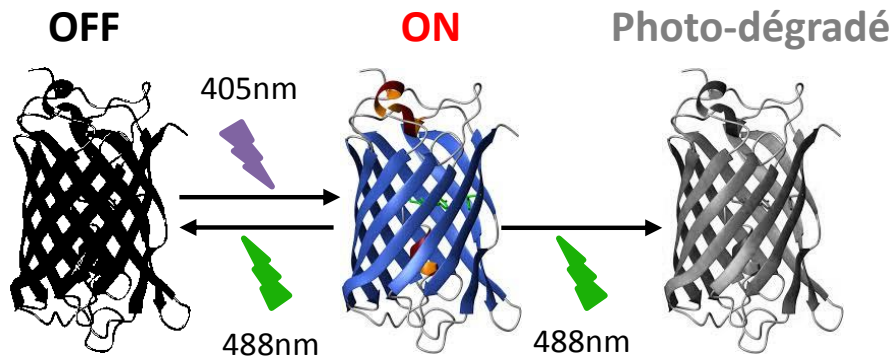


Figure 14 : Schéma de photo-commutation de la protéine fluorescente Dronpa.

Les paramètres de photo-commutation τ_{ON} et τ_{OFF} correspondent aux temps moyens durant lesquels la sonde va rester dans l'état ON et dans l'état OFF. Le rendement quantique de photo-conversion ϕ_{pc} détermine la facilité de passage de la forme OFF à ON. Dans le cas de Dronpa [68], une loi exponentielle a été mesurée expérimentalement pour les statistiques de distributions des commutations avec un τ_{ON} de 52 ms et des τ_{OFF} de 65 ms et 1,3 ms. L'expérience a été réalisée sous double irradiation, l'une continue à 488 nm et l'autre périodique (1 Hz) à 405 nm. Le τ_{OFF} de 65 ms a été associé au temps passé dans un isomère conformationnel et le τ_{OFF} de 1,3 ms a été associé au temps passé dans un état triplet. Ce temps de vie de l'état triplet a également été montré pour l'allophycocyanine, une protéine fluorescente [69].

1.2.7.1 L'imagerie de super-résolution en microscopie confocale

Les premières techniques ayant permis d'obtenir des images super-résolues en champ proche sont le STED en 1994 (*STimulated Emission Depletion*) [2], qui a valu le prix Nobel de 2014 à Stefan Hell, et le SIM en 2000 (*Structured Illumination Microscopy*) [70, 71].

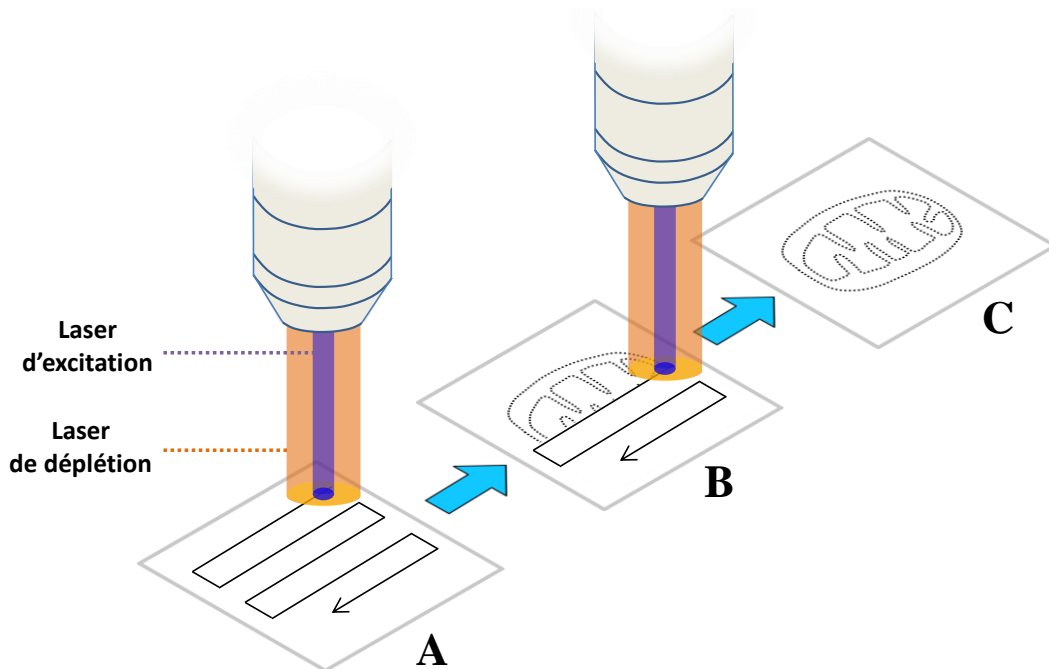


Figure 15 : Principe du STED, utilisant la microscopie confocale. (A) Balayage d'un duo de laser sur tout l'échantillon, un pour faire fluorescer les sondes (bleu) et un pour éteindre la fluorescence des sondes (orange). (B) La forme de cercle du laser orange, permet la conservation d'un volume nanométrique de fluorescence. (C) A la fin du balayage, une image super-résolue est obtenue. La résolution dépend de la taille du volume de fluorescence laissée par le cercle. Adaptée de [72].

Le STED nécessite un système de balayage avec un microscope confocal (**Figure 15**). Pour cette technique, 2 faisceaux superposés sont utilisés, le premier pour faire fluorescer les sondes (faisceau d'excitation) et le deuxième en forme de donut pour éteindre cette fluorescence par émission stimulée (faisceau de déplétion). La forme en donut du faisceau de déplétion permet l'extinction de l'émission de fluorescence des sondes en périphérie tout en conservant un volume nanométrique de fluorescence dont la taille est inférieure aux PSF observées (**Figure 16**). La réduction de la taille des PSF des émetteurs individuels formant l'image permet donc l'augmentation de résolution spatiale.

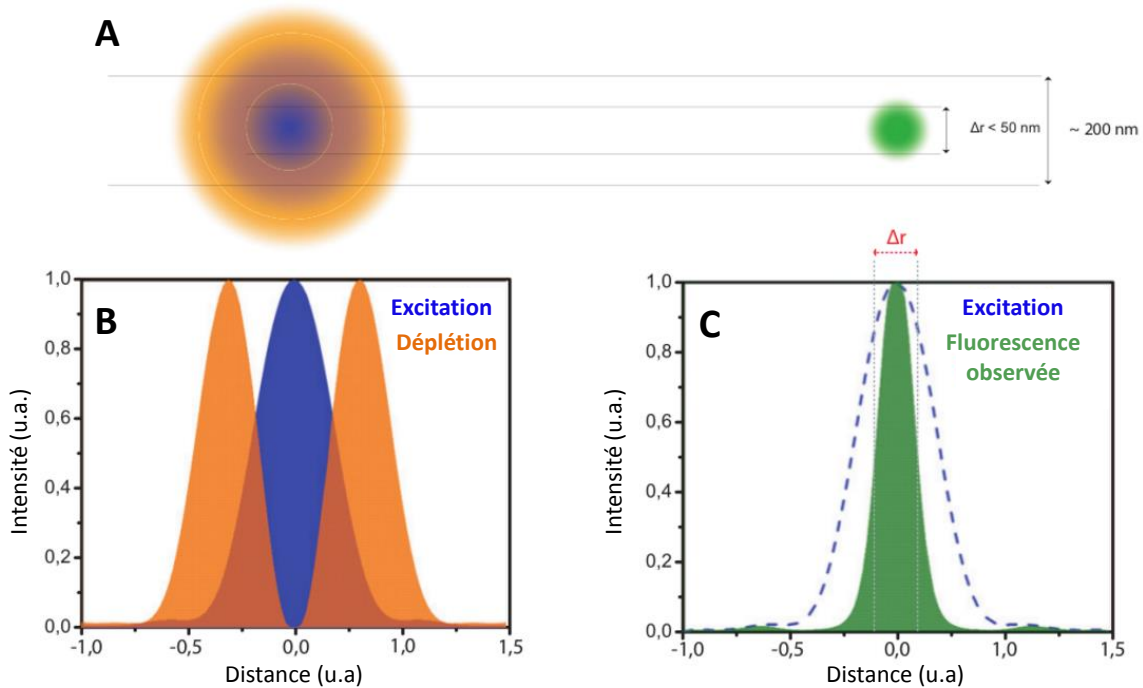


Figure 16 : (A) faisceaux laser utilisés pour la technique STED. Le faisceau d'excitation en bleu, de déplétion en orange et la fluorescence observée en vert. (B) Schéma représentatif d'une coupe transversale des deux faisceaux laser. (C) Schéma représentatif d'une coupe transversale du faisceau laser d'excitation et de la fluorescence observée après saturation de la fluorescence. Adaptée de [73].

La résolution obtenue par la technique STED dépend de l'intensité du faisceau STED (I) et de l'intensité de saturation (I_{sat}) pour laquelle la fluorescence de la sonde est réduite d'un facteur $1/e$. Elle peut s'écrire sous une forme dérivée de l'équation d'Abbe, voir l'équation (13).

$$u = \frac{\lambda_{\text{em}}}{2 \times \text{ON} \times \sqrt{1 + \frac{I}{I_{\text{sat}}}}} \quad (13)$$

Le STED est une technique beaucoup utilisée dans le domaine de l'imagerie biologique [74]. Une étude réalisée sur une cellule de drosophile, utilisant la molécule fluorescente DNQDI (*dinaphthoquaterrylene diimide*), a montré une résolution latérale d'environ 50 nm [75]. Des techniques dérivées ont par la suite vu le jour telles que RESOLFT

(*REversible Optically Linear Fluorescence Transitions microscopy*) [76, 77] ou ISM (*Image Scanning Microscopy*) [78].

1.2.7.2 L'imagerie de super-résolution en champ large

Il est également possible de faire de la super-résolution en microscopie de fluorescence en champ large. Les méthodes de super-résolution en champ large, méthodes SMLM (« *Single Molécule Localisation Methods* »), ont pour objectif de localiser les sondes présentes dans l'échantillon une à une. L'addition de toutes ces positions sur une même image permet de reconstruire une image super-résolue [13-18].

Les méthodes SMLM se basent sur la séparation temporelle de l'émission de fluorescence des sondes lors d'expériences d'imagerie par microscopie, afin qu'elles soient isolées dans un volume de diffraction par image (**Figure 17A**). Les images brutes sont ensuite segmentées afin de pouvoir localiser les sondes fluorescentes une à une (**Figure 17B**), c'est-à-dire que la position des molécules est déterminée avec précision par l'ajustement d'une fonction gaussienne en deux dimensions sur la tache de fluorescence. L'accumulation de ces différentes positions permet la reconstruction de l'image super-résolue (**Figure 17C et D**). Typiquement, les images obtenues lors de l'expérience ne doivent pas contenir une densité de sondes à l'état ON supérieure à 1 molécule. μm^{-2} pour que la localisation soit possible.

Il existe plusieurs méthodes permettant d'avoir une molécule unique active par volume de diffraction. PALM (*Photo-Activation Localization Microscopy*) [79, 80], une méthode développée en 2006 par Eric Betzig, a été récompensée par le prix Nobel 2014. Elle utilise des sondes photo-activables, comme la PA-GFP. Son principe repose sur la photo-activation unique des sondes fluorescentes, à différents temps, permettant leur localisation une à une au cours de l'expérience de microscopie. Cette méthode nécessite donc l'utilisation de deux lasers, le premier permet de faire passer la sonde vers une forme fluorescente (photo-activation) et le deuxième (dans le spectre d'absorption de la forme fluorescente) permet de la faire fluorescer. Actuellement, cette méthode est également réalisable avec des sondes photo-commutables (ex. Dronpa [68]) en utilisant un troisième laser permettant le retour à la forme non fluorescente.

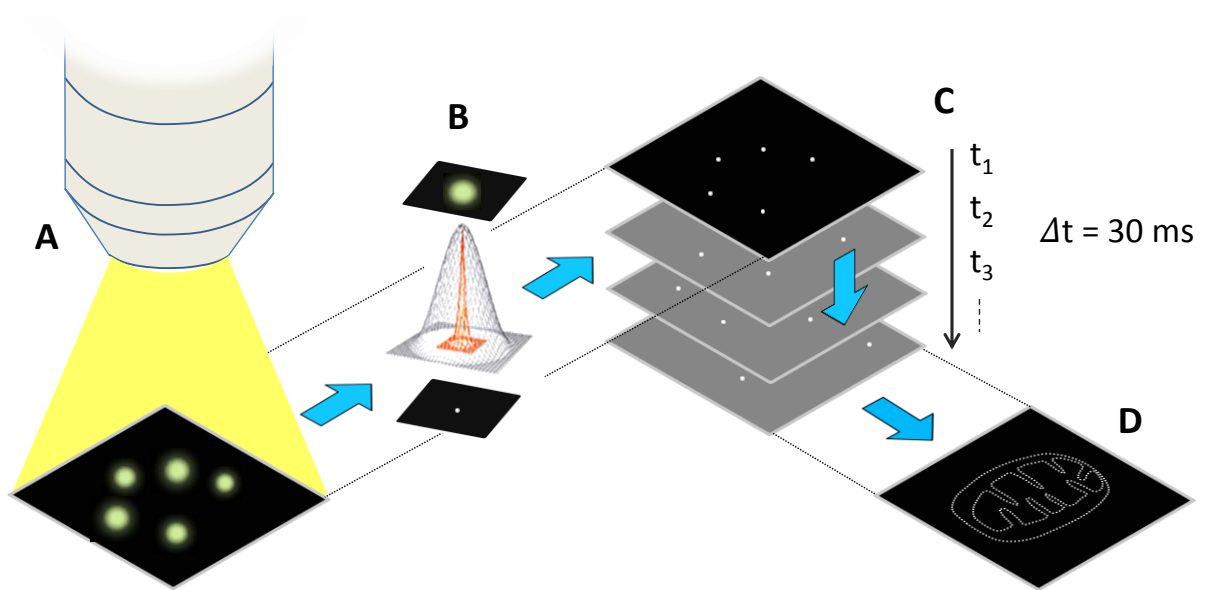


Figure 17 : Principe des SMLM, basé sur la localisation de sondes fluorescentes isolées. (A) Excitation laser en champ large, certaines sondes fluorescent. (B) Les sondes isolées spatialement sont localisées afin d'obtenir leurs positions, représentées ici par des points blancs. (C) La localisation se fait indépendamment sur chaque image. (D) La somme de toutes les localisations permet la reconstruction de l'image super-résolue. Adaptée de [72].

STORM (*STochastic Optical Resolution Microscopy*) utilise des sondes possédant des propriétés de clignotement, comme les Cy3 et Cy5. Dans ce cas, toutes les sondes clignent en même temps. La propriété stochastique du clignotement induit la possibilité d'isoler des sondes sur les différentes images, permettant ainsi leur localisation. Depuis, plusieurs améliorations de cette technique ont vu le jour [81-83].

L'utilisation des SMLM permet d'obtenir une très grande précision quant à la position des sondes dans l'image et permet d'atteindre des résolutions de quelques dizaines de nanomètres. Par exemple, une étude réalisée sur des cellules cancéreuses de foie humain a mis en évidence les microtubules cytoplasmiques à l'aide des QDs 705 et 565, avec une résolution de 24 nm. La précision (p) est fonction du nombre de photons collectés (N), de la taille des pixels de l'image (a), du bruit (b) et de l'écart-type de la fonction PSF (σ_i) suivant l'équation (14):

$$p = \sqrt{\left(\frac{\sigma_i^2 + \frac{a^2}{12}}{N}\right) \times \left(\frac{16}{9} + \frac{4\pi\sigma_i^2 b^2}{a^2 N}\right)} \quad (14)$$

La résolution de l'image obtenue est également à prendre en compte. D'après le critère de Nyquist [84], la distance D entre les sondes présentes dans l'image doit être inférieure à la moitié de la résolution désirée. Donc, plus la résolution recherchée est grande, plus le nombre de sondes dans l'échantillon doit être important. Cela requiert un grand nombre d'images. Le temps d'acquisition d'une image ainsi que le nombre d'images acquises vont déterminer le temps total d'une expérience en microscopie de fluorescence champ large. Ils dépendent des propriétés intrinsèques (physiques et biologiques) de la sonde fluorescente utilisée [85-88]. La durée de l'expérience et le nombre important d'images à analyser sont les principaux inconvénients des méthodes SMLM. En effet, plus l'expérience est longue, plus les sondes sont susceptibles d'être photodégradées (bleaching).

1.2.7.3 L'importance des paramètres photo-physiques

Afin d'isoler spatialement des sondes en imagerie de microscopie de fluorescence, le temps passé par les sondes dans les états ON et OFF doit être contrôlé (**Figure 18**). Le temps d'acquisition d'une image doit donc être choisi en fonction de la photo-physique (ON-OFF) de la sonde fluorescente utilisée. Un paramètre r peut être défini en fonction des propriétés photo-physiques τ_{ON} et τ_{OFF} en suivant l'équation (15).

$$r = \frac{\tau_{OFF}}{\tau_{ON}} \quad (15)$$

Ce paramètre doit être adapté en fonction de la quantité de sondes fluorescentes présentes dans la structure à étudier. Pour donner un ordre de grandeur, un ratio $r = 1000$ est nécessaire pour la séparation de 2 filaments adjacents, séparés de 30 nm et composés d'une sonde fluorescente tous les 8,5 nm, en utilisant la procédure de localisation STORM [89].

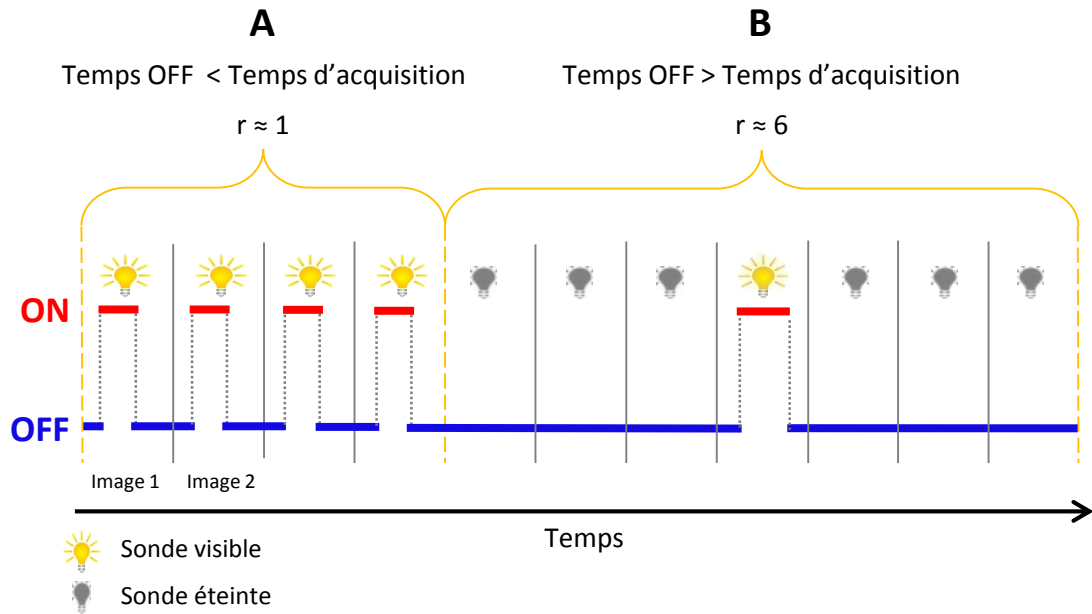


Figure 18 : Schéma de la photo-physique d'une sonde entre les états fluorescents (ON) et non fluorescents (OFF) au cours du temps. (A) Le temps effectif passé à l'état OFF par la sonde est plus court que le temps d'acquisition d'une image, rendant la sonde visible sur chaque image. (B) Le temps effectif passé à l'état OFF par la sonde est beaucoup plus long que le temps d'acquisition d'une image, rendant la sonde visible sur peu d'images, ici 1 sur 7.

Il existe des situations, comme l'expression cellulaire généralisée d'une protéine fluorescente, dans lesquelles l'obtention d'un ratio r adapté à la quantité de sondes présentes dans l'image est impossible. Pour reprendre l'exemple précédent, les caractéristiques de la protéine fluorescente Dronpa correspondent à un ratio r de 1,25 avec un τ_{OFF} relativement comparable au temps d'acquisition minimum (≈ 30 ms) des caméras actuelles. C'est pourquoi une partie des recherches de ce domaine s'est tournée vers le développement de techniques de multi-localisation, de déconvolution et de traitement statistique des données, permettant l'analyse d'images en plus haute densité de sondes actives par image.

1.2.8 Conclusion

La microscopie de fluorescence est un outil puissant lorsqu'il s'agit de visualiser en détail une structure ou un processus biologique. En effet, l'utilisation de sondes fluorescentes attachées à une structure d'intérêt va permettre une observation sélective. En

revanche, la résolution des images obtenues est limitée par la diffraction de la lumière. Des méthodes de localisation de molécules uniques (méthodes SMLM) ont été développées afin d'atteindre des résolutions d'images inférieures à cette limite de diffraction de la lumière (super-résolution). Elles utilisent les propriétés de clignotement ou de photo-commutation qu'ont certaines sondes fluorescentes. Ces propriétés permettent d'isoler les sondes dans le temps ce qui permet leurs localisations spatiales, une à une, et la détermination de leur position avec une précision de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Ceci permet la visualisation de nombreux systèmes biologiques mettant en jeu des structures de tailles inférieures à cette limite de diffraction (membranes, pores nucléaire, ...) [90].

En revanche, les méthodes SMLM ne peuvent pas traiter des images comportant typiquement plus d'une sonde allumée par μm^2 , correspondant environ à la surface limitée par la diffraction. Une image super-résolue se composant généralement de plusieurs milliers de sondes, ces méthodes impliquent l'acquisition d'un grand nombre d'images, limitant ainsi l'analyse de dynamiques cellulaires rapides. Il existe plusieurs façons de s'affranchir de cette contrainte. Tout d'abord, le développement de nouvelles méthodes de traitement d'images de haute densité (multi-localisation, déconvolution ou traitement du signal). Ces méthodes peuvent traiter des images qui présentent d'importants recouvrements de fluorescence, rendant impossible la localisation une à une des sondes. Elles vont donc nécessiter moins d'images que les méthodes SMLM pour l'identification d'un même nombre de sonde.

D'autre part, le développement de nouvelles sondes fluorescentes, afin d'améliorer leurs propriétés (clignotement, photo-stabilité, cytotoxicité, brillance) et de les rendre observables dans des conditions de forte densité de sonde ou pour des temps d'acquisition faible (< 50 ms). Des études ont notamment été effectuées sur la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes [91] permettant de s'affranchir des problèmes liés à l'utilisation de molécules fluorescentes classiques qui se photodégradent rapidement. Certaines nanoparticules apportent également la possibilité d'obtenir une photo-commutation ou un clignotement par transfert d'énergie interne vers un piège (espèce noire), permettant leur utilisation en super-résolution [6].

I.3 Super-résolution de haute densité en champ large

Le but des méthodes de super-résolution en haute densité n'est pas de concurrencer les méthodes SMLM, qui s'appuient sur une grande précision de localisation, mais de permettre le traitement d'images jusque-là inexploitable. La multi-localisation, la déconvolution et le traitement statistique du signal sont les méthodes permettant l'analyse d'images de fluorescence en haute densité.

I.3.1 Méthodes de multi-localisation

Les méthodes de multi-localisation ont pour objectif de pouvoir discriminer plusieurs sondes fluorescentes dont les PSF se recouvrent. Une des premières techniques est DAOSTORM (*Dominion Astrophysical Observatory Stochastic Optical Resolution Microscopy*) [92, 93]. Elle a été inspirée par DAOPHOT, un logiciel utilisé dans l'astronomie permettant de déconvoluer des sources ayant des PSF qui se recouvrent spatialement.

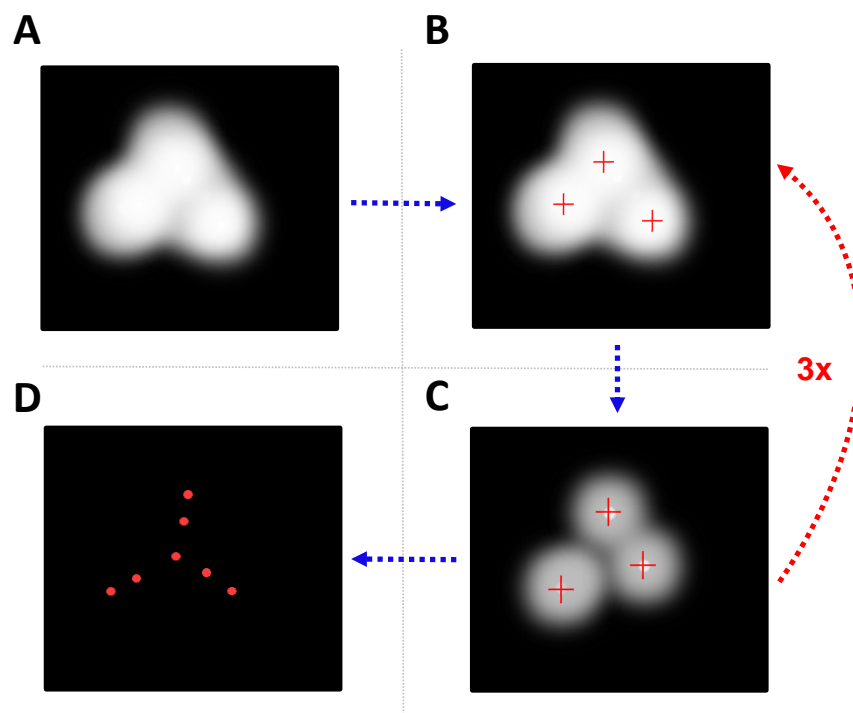


Figure 19 : Principe de DAOSTORM, exemple du traitement d'une image d'un jeu de données. (A) Une image brute d'un jeu de données. (B) localisations initiales provenant des maximums d'intensités. (C) localisations sur l'image résiduelle, afin de détecter les sondes manquées lors de l'étape B. (D) Somme des localisations trouvées aux étapes B et C.

La première étape de DAOSTORM est de localiser sur une image les maximums d'intensité (**Figure 19B**) pour reconstruire l'image en utilisant des PSF centrées sur ces positions. L'image reconstruite est ensuite soustraite à l'image originale, générant ainsi une image résiduelle. La deuxième étape consiste à analyser l'image résiduelle, permettant la localisation de sondes qui auraient été manquées précédemment (**Figure 19C**). Ces étapes sont répétées 3 fois afin d'optimiser le nombre total et les positions des sondes détectées. DAOSTORM donne des résultats satisfaisants pour des densités allant jusqu'à 3 molécules. μm^{-2} .

Il existe également des méthodes basées sur des approches Bayésiennes, telles que SSM-BIC [94] (*Structured Sparse Model with Bayesian Information Criterion*) ou PALMER [95]. Dans le cas de PALMER, des maximums d'intensité sont localisés dans des petites zones de l'image (9 x 9 pixels), permettant d'estimer le nombre total de sondes. Ensuite, basée sur ces estimations, la localisation des sondes est réalisée en suivant un critère Bayésien. La taille des zones utilisées lors de la localisation est généralement plus grande (ex : 13 x 13) et détermine en grande partie les temps de calcul.

1.3.2 Méthodes de déconvolution.

DeconSTORM (*Deconvolution STochastic Optical Resolution Microscopy*) [96], CSSTORM (*Compressed Sensing STochastic Optical Resolution Microscopy*) [8] et SPIDER (*SParse deconvolution of high-Density super-Resolution images*) [10] utilisent un calcul mathématique de déconvolution pour retrouver le signal original de l'image. L'objectif d'une méthode de déconvolution est de trouver les solutions du calcul suivant :

$$y = Cx \tag{16}$$

Où x est un vecteur contenant les estimations des intensités des sondes fluorescentes, y correspond à l'image réelle observée et C à une matrice de convolution définie par la PSF de l'instrument utilisé lors des analyses. L'image finale est ensuite reconstruite sur une grille de pixels en plaçant les éléments x trouvés lors de la résolution du calcul. La résolution spatiale d'une méthode de déconvolution est donc dépendante de la taille des pixels de la grille.

L'équation (16) ne peut être résolue directement par la méthode des moindres carrés (équation (17)) qui consisterait à minimiser S .

$$S = \|y - Cx\|^2 \quad (17)$$

Dans le cas de CSSTORM, le calcul (équation (18)) est donc pénalisés en suivant une norme L_1 . Avec $\sum|x|$ correspondant à la somme des valeurs absolues de x et β la valeur déterminant l'importance de la pénalité.

$$S = \|y - Cx\|^2 + \beta \sum |x| \quad (18)$$

Une approche de régression par moindres carrés pénalisée permet de traiter des données de microscopie de fluorescence possédant des densités de sondes élevées, et donne de meilleurs résultats que les techniques de localisation et multi-localisation pour des densités supérieures à 2 molécules. μm^{-2} [10]. CSSTORM permet une détection correcte des sondes jusqu'à des densités de 8 molécules. μm^{-2} . Cependant, cette méthode est très longue en temps de calcul. En 2013 P.Babcock et al [97], modifient l'algorithme en implémentant L1H (L_1 -Homotopy). Après comparaison des temps de calculs de CSSTORM et L1H, la méthode L1H apparait 300 fois plus rapide que l'original CSSTORM, ce qui la rend applicable en routine.

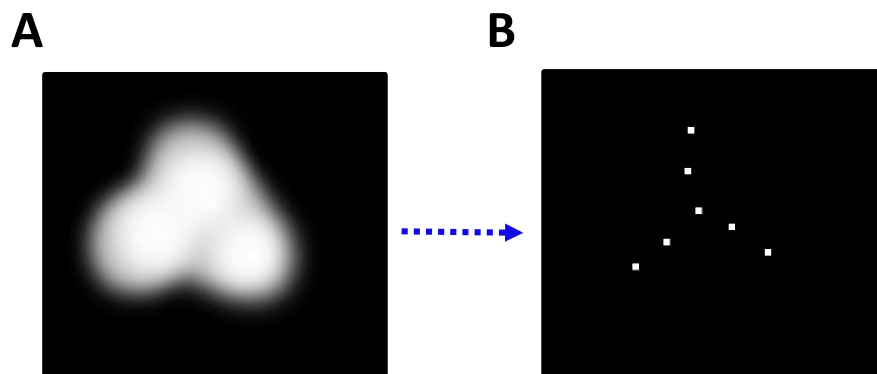


Figure 20 : Principe de SPIDER, basé sur la détection de sondes fluorescentes en haute densité par déconvolution. (A) Image originale. (B) Déconvolution de l'image originale.

SPIDER adapte le calcul de déconvolution de l'équation (17) en introduisant une norme L_0 . La norme L_0 applique une pénalité ($\sum |x|^0$) sur le nombre d'éléments utilisés pour le recouvrement d'un signal, c'est-à-dire qu'elle tend à minimiser le nombre d'éléments x différents de zéro, voir équation (19).

$$S = \|y - Cx\|^2 + \beta \sum |x|^0 \quad (19)$$

La pénalité introduite par SPIDER a pour effet de produire des solutions parcimonieuses, composées de peu de sondes. En pratique, cela réduit le nombre de faux-positifs et donc la présence d'artefacts dans l'image super-résolue. SPIDER permet le traitement d'images à des densités allant jusqu'à 15 molécules. μm^{-2} .

1.3.3 Méthode couplant localisation et déconvolution

FALCON [9] (*FAst LOcalization algorithm based on CONtinuous-spaced formulation*), est une méthode couplant la déconvolution avec la localisation. Elle se compose en 3 étapes distinctes (**Figure 21**). La première sert à générer une image déconvoluée en utilisant une approche de type de celle décrite par l'équation (18). La deuxième étape permet de déterminer des positions initiales (sur une grille de déconvolution) à partir des maximums d'intensités de l'image déconvoluée. Enfin la troisième étape consiste à appliquer un algorithme de localisation (fournissant les coordonnées associées aux positions des émetteurs) en partant de la solution initiale obtenue à l'étape 2 et en tenant compte lors de l'optimisation du nombre de photons émis par chaque sonde. Cela se traduit par de meilleurs résultats pour des densités allant jusqu'à 10 molécules/ μm^2 . Les auteurs se sont également intéressés à étudier la justesse de la localisation en se comparant à CSSTORM [9]. Ils ont mis en avant l'apparition d'un biais lors de l'étape de déconvolution, commune entre les deux méthodes, qui est corrigé par la troisième étape de l'algorithme de FALCON.

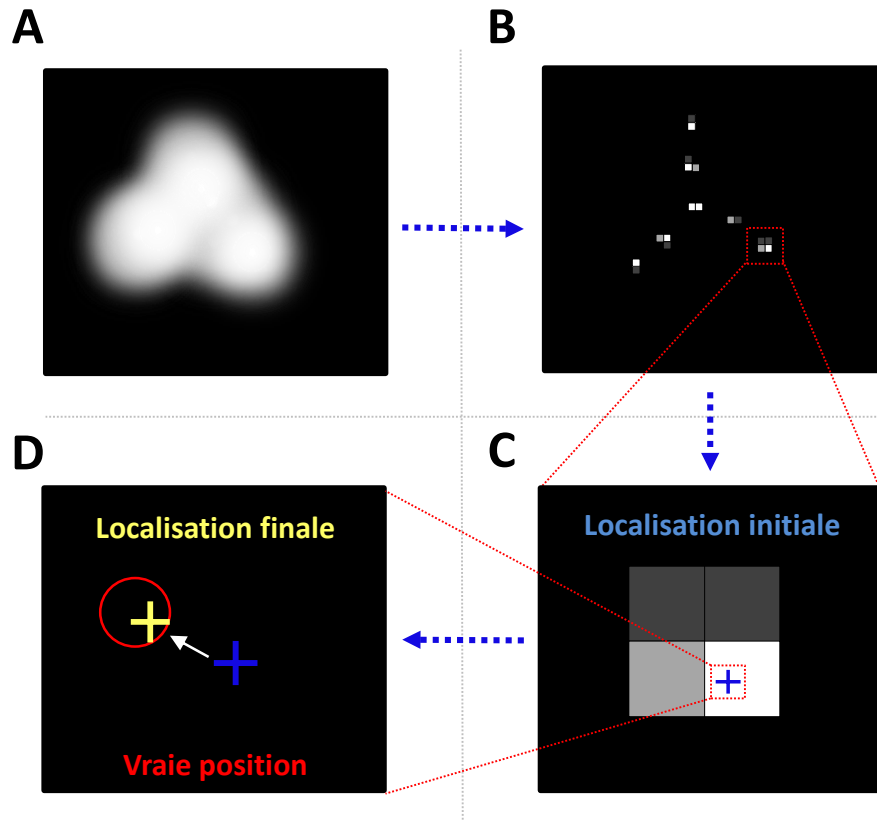


Figure 21 : Principe de FALCON, exemple du traitement d'une image. (A) Image originale. (B) Déconvolution de l'image originale. (C) Localisation initiale provenant du maximum d'intensité. (D) Ajustement de la position et de l'intensité de la localisation initiale.

1.3.4 Quelle méthode choisir ?

L'efficacité des SMLM est déterminée par la précision des localisations et le nombre de sondes efficacement détectées. Ces deux paramètres sont suffisants pour juger de la performance d'une technique en faible densité de sondes. Les techniques de déconvolution, qui traitent globalement l'ensemble des émetteurs de l'image, nécessitent une prise en main de leurs calculs ainsi que de bonnes connaissances en prétraitements d'images, pour la gestion du bruit, de l'autofluorescence, des artefacts, etc... Les méthodes de haute densité ne doivent donc pas être prises comme des méthodes « presse bouton ». Le choix d'une méthode de haute densité sera le résultat d'un compromis entre la densité de sonde de l'échantillon et la précision recherchée, voir **Tableau 2**.

Une comparaison de différentes méthodes, mise en place depuis 2013, est maintenant publiée [98]. Sous forme de challenge [99], cette comparaison de méthodes est appelée à être enrichie le plus possible afin de pouvoir obtenir facilement les performances relatives des différentes techniques utilisables à l'heure actuelle. Afin d'y participer, différents jeux de données de microscopie de fluorescence, réels ou simulés, sont en libre accès sur le site web de l'EPFL.

	Méthode	Ordre de densité pour un recall de 80% (molécule/ μm^2)	Ordre de précision de localisation pour un recall de 80% (nm)
3D-DAOSTORM	Localisation	0.6	15 (xy) 25 (z)
DAOSTORM	Localisation	3	50 (xy)
PALMER	Localisation	4	20 (xy)
L1H	Déconvolution	7	65 (xy)
CSSTORM	Déconvolution	8	60 (xy)
FALCON	Déconvolution / Localisation	9	50 (xy)
SPIDER	Déconvolution	12	50 (xy)

Tableau 2 : Résumé des différentes méthodes de localisation/déconvolution de microscopie de fluorescence en haute densité rapportées dans la littérature. 3D-DAOSTORM [93], DAOSTORM[9], PALMER [95], L1H [97], CSSTORM [10], FALCON [9], SPIDER [10].

I.3.5 Méthodes statistiques

Les méthodes de haute densité sont inutilisables pour des densités de sondes fluorescentes supérieures à $20 \text{ molécules} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ et pour des conditions de bruit et d'auto fluorescence importantes. Ces conditions peuvent être celles d'une expression cellulaire généralisée d'une protéine fluorescente encodée génétiquement. Cela a conduit au développement de méthodes de super-résolution se basant sur l'étude statistique des fluctuations de fluorescence et de la photodégradation [100]. Ces méthodes ne parviennent pas à atteindre les mêmes résolutions spatiales que les méthodes de localisation et de déconvolution car elles sont limitées par la taille des pixels de l'image. En revanche, elles offrent une grande facilité d'utilisation, ce qui les place parmi les plus utilisées. De plus, l'analyse d'un millier d'images prend au maximum quelques minutes. STICS (*Spatio-Temporal Image Correlation Spectroscopy*) [101] et SOFI (*Super-resolution Optical Fluctuation Imaging*) [7, 102, 103] sont les méthodes les plus connues.

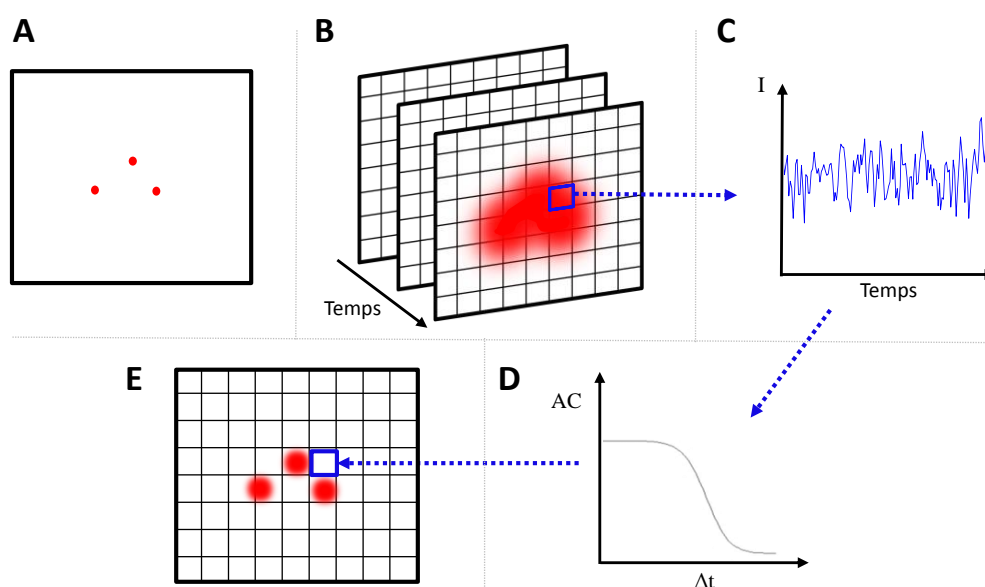


Figure 22 : Principe de SOFI, basé sur l'étude de la fluctuation de l'émission de fluorescence de différentes sondes. (A) Trois sondes dont l'émission de fluorescence se recouvre. (B) Chaque pixel contient un signal de fluctuation de fluorescence en fonction du temps. (C) Le signal pour un pixel, dû à la présence de fluorescence provenant de sondes situées à l'intérieur ou à l'extérieur de ce même pixel. (D) Calcul de la fonction de corrélation à l'ordre « n » sur le signal du pixel. (E) Calcul de l'intégrale sous cette fonction pour obtenir la valeur SOFI de l'image super résolution.

Le principe de la méthode SOFI est d'utiliser une analyse statistique de la fluctuation de l'intensité de fluorescence enregistrée au cours du temps pour chaque pixel d'une image (**Figure 22**) [7, 104]. La nature stochastique du clignotement des sondes permet de calculer des fonctions d'autocorrélation du signal sous chaque pixel, en tenant compte ou non des pixels adjacents. L'intégrale de cette fonction détermine ensuite la valeur de chaque pixel sur l'image finale super-résolue. Afin de décrire cette autocorrélation, un calcul de cumulants d'ordre supérieur est utilisé. Dans le cas d'un échantillon possédant N molécules, avec B_k la brillance de la sonde et $s_k(t)$ la fluctuation de fluorescence de la sonde en fonction du temps. L'intensité de fluorescence F à une position r , au temps t , décrit par une PSF $U(r)$, peut s'écrire suivant l'équation (20):

$$F(r, t) = \sum_{k=1}^N U(r - r_k) \times B_k \times s_k(t) \quad (20)$$

SOFI est basé sur un calcul d'autocorrélation du signal de fluorescence. L'autocorrélation du signal est représentée le plus simplement par le calcul de cumulants à l'ordre 2 (A_2), représentant la variance, suivant l'équation (21):

$$A_2(r, \tau) = \langle F(r, t) \times F(r, t + \tau) \rangle \quad (21)$$

$$A_2(r, \tau) = \sum_{k=1}^N U^2(r - r_k) \times B_k^2 \times \langle \Delta s_k(t) \times \Delta s_k(t + \tau) \rangle$$

Ici, $\Delta s_k(t)$ correspond à la différence entre la valeur du signal au temps t et la moyenne. Ce résultat est obtenu car le calcul de SOFI impose l'indépendance dans l'émission de fluorescence des sondes. Dans le cas contraire, le cumulants à l'ordre 2 (A_2) serait fonction des signaux de deux molécules différentes k et j .

On note alors que la PSF $U(r)$ est élevée au carré ce qui se traduit par une FWHM de la fonction gaussienne (équation (10)) divisée par $\sqrt{2}$. Ce résultat est généralisable. Un calcul à l'ordre n permet une amélioration de résolution de \sqrt{n} [105]. Des résolutions spatiales d'environ 80 nm pour l'ordre 3 et d'environ 60 nm pour l'ordre 4 ont déjà été réalisées [7].

Théoriquement, il n'existe pas de limite quant à l'ordre choisi pour ce calcul. Cependant, l'élévation au carré (au cube, etc.) de la brillance de chaque sonde B_k va engendrer une différence de poids entre les signaux de faibles et de fortes intensités. En pratique, on remarque que les signaux de fluorescence de faibles intensités sont écrasés par ceux de fortes intensités avec l'augmentation de l'ordre du calcul. C'est pourquoi, lors d'études en milieux biologiques, les utilisateurs de SOFI ne dépassent généralement pas l'ordre 3. Il est à noter que SOFI va permettre la suppression d'une partie du bruit de fond de l'image (background), car ces signaux possèdent une autocorrélation proche de 0.

En 2012, un dérivé de cette méthode appelé pcSOFI (*PhotoChromic Stochastic Optical Fluctuation Imaging*) utilise des sondes photo-commutables [106]. Une photo-commutation rapide et adaptée à la vitesse d'acquisition des images (quelques dizaines de millisecondes) permet alors d'obtenir une fluctuation de fluorescence rapide et suffisamment prononcée pour être discriminée. Plus récemment, afin de pouvoir étudier des dynamiques cellulaires, une amélioration de la méthode [107], a permis d'obtenir une image super-résolue représentant 1,25 secondes pour une FWHM de PSF de 98 nm [108] et une taille de pixel de 32,5 nm.

1.3.6 Conclusion

Les méthodes de super-résolution en haute densité sont donc de nature très diverses. Chacune possédant ses propres avantages et limites. Les méthodes de localisation restent à privilégier si l'on recherche une grande précision quant à la position des sondes. En revanche, elles perdent de leur efficacité pour des densités supérieures à 3 molécules par μm^2 . Au-delà et jusqu'à des densités de 15-20, les méthodes basées sur un calcul de déconvolution restent les plus adaptées. Afin de choisir la méthode la plus adaptée, un compromis entre densité et résolution spatiale est nécessaire.

Enfin, des méthodes de traitement statistique du signal permettent également de produire des images super-résolues. Ces méthodes ne fournissent aucune information sur le nombre ou la position de sondes. De plus, le gain de résolution est fixe, ne dépassant généralement pas $\sqrt{3}$. En revanche, elles sont beaucoup plus rapides, utilisables en très haute densité et requièrent seulement quelques centaines ou dizaines d'images. Ces avantages en font de bons outils pour l'analyse de dynamiques cellulaires.

I.4 Nanoparticules organiques pour la super-résolution

L'efficacité des méthodes de super-résolution dépend des caractéristiques photo-physiques des sondes fluorescentes utilisées. C'est pourquoi de nombreux développements ont été effectués afin d'obtenir des sondes plus adaptées aux méthodes de super-résolution employées, possédant l'ensemble des propriétés spectroscopiques évoquées précédemment (biocompatibilité, grande brillance, photo-physique à deux états (ON-OFF), gamme d'absorption spectrale et faible taille). Cette photo-commutation à deux états peut se faire avec les états ON et OFF mais également avec deux états de couleurs différentes. Lors d'une expérience utilisant deux couleurs, chaque couleur sera collectée sur un détecteur différent via l'utilisation de filtres spécifiques. Des études ont porté sur la synthèse de nanoparticules fluorescentes possédant des propriétés de photo-commutation, soit en utilisant des molécules photo-commutables, soit en contrôlant l'agrégation pour induire un photo-clignotement.

Le but est de concentrer un grand nombre de molécules fluorescentes classiques au sein d'une même structure (nanoparticule) tout en gardant une émission élevée (éviter l'extinction de fluorescence par « π -stacking », formation d'agrégats ou d'excimères). De cette façon, les NPOs peuvent atteindre de fortes brillances. En effet, la compaction de ces molécules s'accompagne de l'additivité de leurs coefficients d'absorption molaire. La possibilité de fonctionnaliser la surface des nanoparticules va permettre de contrôler leur biocompatibilité. Actuellement, il existe des méthodes de synthèse de nanoparticules par réprécipitation, mais également des méthodes d'encapsulation de molécules fluorescentes dans des matrices organiques (polymère) [5, 91, 109] ou inorganiques (silice) [110].

I.4.1 Nanoparticules organiques photo-commutables

Les nanoparticules organiques fluorescentes peuvent être synthétisées en solution par précipitation (auto-assemblage) ou par ablation laser (fragmentation) [111]. En effet, l'utilisation de molécules fluorescentes organiques hydrophobes modifiées par une chaîne de surface hydrophile permet la formation de NPs possédant un cœur hydrophobe et une surface hydrophile en interaction avec le solvant. Une étude a montré la possibilité de former des nanoparticules à base de spiropyrane modifié [112]. Ces NPs ont la propriété de

pouvoir passer d'une forme non fluorescente à une forme fluorescente sous excitation dans le bleu (420 nm). Sous excitation dans l'UV (365 nm), la molécule se transforme en merocyanine, une molécule qui émet de la fluorescence dans le rouge sous excitation à 560 nm. Dans cette étude, les changements d'état nécessaires à la super-résolution ne sont pas ON et OFF mais vert et rouge.

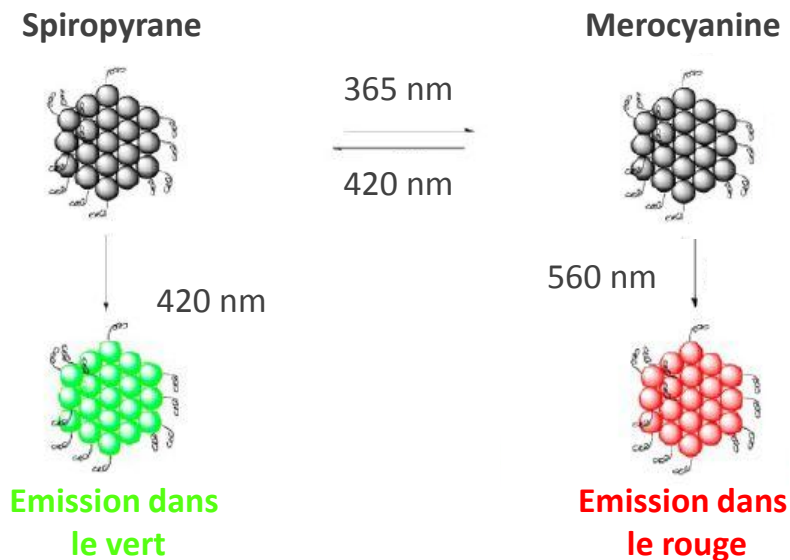


Figure 23 : Schéma de photo-commutation de la NP fluorescente spiropyrane/merocyanine. [112]

Il est également possible de créer une photo-commutation (ON-OFF) par l'intermédiaire d'une molécule photochrome, jouant le rôle d'un interrupteur [113]. Par exemple, une étude a montré la photo-commutation (ON-OFF) d'une NP fluorescente composée d'une molécule fluorescente de benzothiadiazole couplée à une molécule photochrome de diarylethène [114]. Une extinction de la fluorescence simultanée sur plus de 400 molécules a alors été observée, grâce à un transfert d'énergie efficace entre la sonde et le photochrome. La molécule photochrome, ici le diarylethène, passe d'une forme ouverte à une forme fermée sous excitation dans l'UV et le visible, dans le but de permettre ou non un transfert d'énergie de la sonde vers le diarylethène afin d'éteindre la fluorescence (état ON ou OFF).

I.4.2 Nanoparticules organiques avec clignotement

La photo-commutation contrôlée n'est pas le seul moyen permettant de passer d'un état ON à OFF. L'accumulation de molécules par encapsulation à l'aide de polymères comme le PMMA (Poly(Methyl MethAcrylate)), le PLGA (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)) ou le PS (PolyStyrène) peut leur conférer à l'ensemble de nouvelles propriétés de clignotement, résultant de transferts d'énergie interne de masse vers des espèces noires, permettant l'extinction de la fluorescence. Cependant, ces propriétés nécessitent un contrôle des phénomènes d'agrégaions moléculaires ayant lieu au sein des NPOs.

Les molécules fluorescentes classiques possèdent généralement un ou plusieurs cycles aromatiques dont la structure plane favorise l'agrégaion intermoléculaire. Cette agrégaion moléculaire au sein des NPOs engendre généralement une extinction de l'émission de fluorescence ou ACQ (*Aggregation-Caused Quenching*). De plus, pour des hautes densités de molécules, ce phénomène est amplifié par la présence de transferts d'énergie résonants dus à la faible distance entre les molécules composant les nanoparticules organiques (nanomètres). Cela implique une migration de l'énergie au sein de la nanoparticule jusqu'à une molécule dont la fluorescence est éteinte par un piège dans son environnement (transfert d'électron, ...). Ces deux processus tendent à réduire drastiquement le rendement quantique de fluorescence des nanoparticules organiques et limitent l'exploitation de leur forte brillance.

Pour réduire l'impact de ces processus au sein des nanoparticules organiques, deux solutions sont mises en avant dans la littérature. La première est d'utiliser des molécules pour lesquelles l'agrégaion des molécules favorise l'émission de fluorescence. Ce phénomène est appelé AIE (*Aggregation-Induced Emission*) [115]. La deuxième solution va, au contraire, faire en sorte d'éviter l'agrégaion des molécules au sein des nanoparticules organiques. Pour cela, des méthodes basées sur l'ajout de contre-ion [6] ou la synthèse de groupements externes liés de façon covalente aux molécules fluorescentes ont été développées [116].

I.4.2.1 Extinction de fluorescence induite par agrégation

Les cycles aromatiques étant plans, des interactions intermoléculaires non covalentes mettant en jeu des liaisons π peuvent engendrer une agrégation appelée « π -stacking », pour un taux d'encapsulation de molécules dépassant 0,5 % du poids total de la nanoparticule (**Tableau 3**). Cette agrégation est à l'origine du phénomène d'ACQ qui réduit de façon significative le rendement quantique de fluorescence des nanoparticules organiques. Ce phénomène d'empilement se produit pour une grande proximité spatiale (quelques nanomètres) entre les différentes molécules qui composent la nanoparticule. Les rendements quantiques de fluorescence mesurés en présence d'ACQ ne dépassent généralement pas les 25%.

Molécule encapsulée	Polymère organique	Taille des NPs (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	B ($10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Encapsulation (% massique)	Φ_F
Nile red	PS	100	570	635	70 000	0,05	~ 0,76
						0,8	0,22
Cyannine	PLGA	60-80	650	667	13 000	0,05	0,34
						0,7	0,1
Rhodamine 6G	PMMA	55	533	559	70	0,4	0,74
Bodipy	Styrène / Divinylbenzène	< 30	524	550	-	~ 0,5	~ 0,8

Tableau 3 : Comparaison de différentes NPOs présentant un bon rendement quantique de fluorescence pour un taux de molécules encapsulées inférieur à 0,5% en masse totale. Nile red [117], Cyannine[118], Rhodamine 6G [119], BODIPY [120].

I.4.2.2 Emission de fluorescence induite par agrégation

Il a été montré qu'il était possible pour certaines molécules d'avoir de meilleurs rendements quantiques de fluorescence en se trouvant à l'état d'agrégat [121]. Deux arrangements sont proposés dans la littérature. Ils font intervenir des liaisons intermoléculaires énergétiquement similaires aux liaisons de type van der Waals. Les agrégats de type J (pour Jelley), découvert par Edwin E. Jelley en 1936 [122] sont caractérisés par un déplacement bathochrome du spectre d'absorption par rapport à celui de la molécule

seule, c'est-à-dire un déplacement vers de plus grandes longueurs d'ondes. A l'inverse les agrégats de type H (pour hypsochrome) présentent un déplacement spectral hypsochrome, i.e. vers de plus faibles longueurs d'ondes (**Figure 24**).

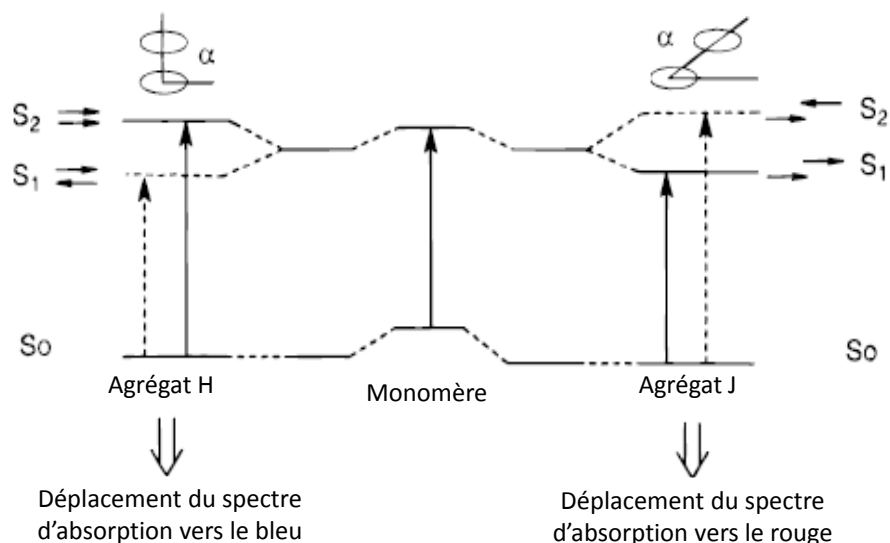


Figure 24 : Schéma de la relation entre les agrégats de type H et J et le monomère qui les compose, avec α l'angle entre les cycles aromatiques. Adaptée de [123].

Pour certaines molécules une agrégation de type J peut permettre d'augmenter le rendement quantique de fluorescence par rapport à la molécule qui le compose [124], contrairement au type H. Les agrégats de type J seront donc généralement à l'origine de l'effet AIE.

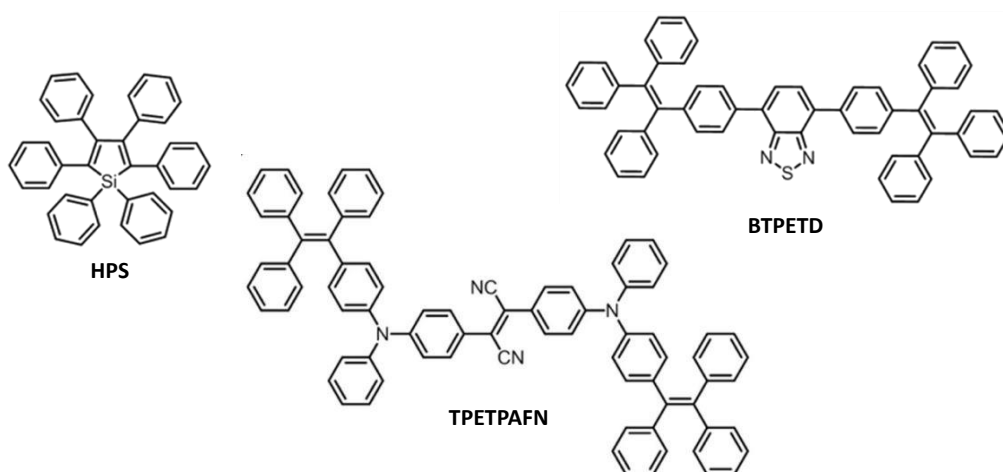


Figure 25 : Structure de molécules fluorescentes présentant le phénomène AIE après encapsulation. HPS [125], BTPETD et TPETPAFN [126].

Par opposition au phénomène d'ACQ, le phénomène d'AIE permet le développement de nanoparticules possédant un pourcentage massique de molécules fluorescentes supérieur à 20% [115], voir **Tableau 4**. Des NPOs-AIE avec différentes gammes spectrales d'absorption et de fluorescence ont été développées. En 2013, des expériences d'imagerie de fluorescence 2 couleurs ont été réalisées [126], utilisant simultanément des NPO-AIE hydrosolubles à base de BTPETD (vert) et TPETPAFN (rouge). L'étude a été réalisée sur du tissu pulmonaire de souris en utilisant une internalisation des sondes par diffusion membranaire. Les images ont été enregistrées avec un microscope confocal, une source d'excitation laser à 458 nm et deux filtres passe-bande (480 - 560 et 670 - 800 nm) afin de collecter séparément la fluorescence des deux NPOs-AIE.

Les NPOs-AIE possèdent de très bonnes propriétés spectroscopiques (**Tableau 4**). Pourtant elles n'utilisent pas encore tout le potentiel des molécules fluorescentes. En effet, les molécules encapsulées dans les NPOs-AIE ont des coefficients d'absorption molaire situés entre 10 000 et 30 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹, ce qui est au mieux 3 fois moins que celui de la fluorescéine (96 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹) mais cela reste environ 10 fois moins que celui de la Cy5 (250 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹). De plus, les développements récents de NPOs-AIE ne correspondent pas à des gammes spectrales permettant l'utilisation de longueurs d'ondes d'excitation dans le rouge (supérieures à 650 nm), idéales pour les études *in vivo*.

Molécule encapsulée	Polymère organique	Taille des NPs (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	B (10 ³ L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Encapsulation (% massique)	Φ_F
HPS	PS-b-PMAA	77	365	486	170 000	30	0,62
BTPETD	DSPE-PEG	32	423	539	21 460	> 20	0,58
TPETPAFN	DSPE-PEG	33	510	670	10 080	> 20	0,24

Tableau 4 : Comparaison de différentes NPOs présentant une émission de fluorescence induite par agrégation moléculaire ainsi qu'un fort taux de molécules encapsulées. HPS [125], BTPETD et TPETPAFN [126].

I.4.2.3 Limitation de l'agrégation des molécules encapsulées

Les agrégats moléculaires pouvant apparaître au sein d'une NPO sont faiblement fluorescents. Cela induit une forte diminution du rendement quantique de fluorescence. La formation de ces agrégats se traduit généralement par l'apparition d'excimères, c'est-à-dire d'assemblages moléculaires ne pouvant exister qu'à l'état excité. L'agrégation moléculaire peut être limitée par l'ajout de groupements encombrants sur les molécules fluorescentes, ou par l'ajout de contre-ions, ou encore en liant de façon covalente les molécules fluorescentes avec le polymère de la NPO.

L'ajout de groupements liés de façon covalente à la molécule fluorescente a pour but d'empêcher le « π -stacking » intermoléculaire en jouant sur l'encombrement stérique. Cette méthode est très efficace lors de l'utilisation de molécules fluorescentes très plates et composées de un ou plusieurs cycles aromatiques. Une étude a montré qu'en modifiant une molécule de BODIPY par l'ajout de deux groupements dérivés de phényle (en bleu **Figure 26**), un rendement quantique de fluorescence de 77 % est observé pour un taux d'encapsulation massique de 3 % [127]. En revanche, ce taux d'encapsulation reste nettement inférieur à ceux observés pour les NPOs-AIE (supérieur à 20%), ce qui se traduit par de plus faibles brillances (Tableau 5). Des travaux ont également été réalisés sur des pérylènes diimides (PDI), qui ont tendance à former des agrégats de type H [116]. De la même façon que pour le BODIPY, des groupements externes (en vert, **Figure 26**) à base de noyaux aromatiques (Lumogen Red) ou de chaînes carbonées (PDI-1) empêchent la formation d'agrégats pour des taux d'encapsulation supérieurs à 3%.

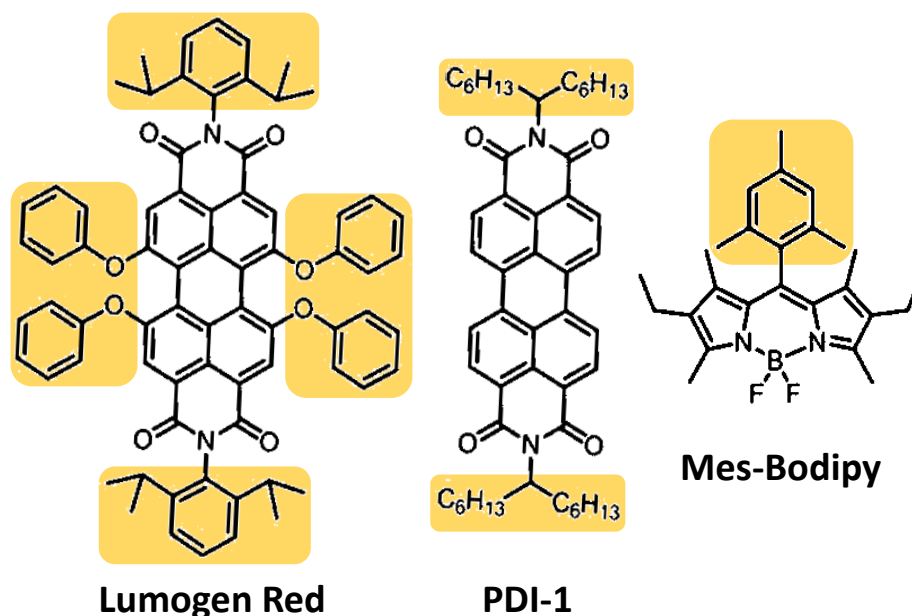


Figure 26 : Structure de molécules fluorescentes modifiées par l'ajout de groupements encombrants. Lumogen Red et PDI-1 [116], BODIPY [127].

L'ajout d'un contre-ion au sein de la nanoparticule peut également limiter l'agrégation moléculaire. En effet, en plus d'une forte tendance au « π -stacking », certaines molécules fluorescentes très utilisées dans le domaine de l'imagerie biologique, telles que les Rhodamines ou les Cyanines, sont également chargées électriquement. La présence de charges électriques positives rend ces molécules plus hydrophiles, ce qui favorise leur agrégation. Une étude [6] réalisée sur un dérivé de la rhodamine B (**Figure 27**) montre que des NPOs à faible taux d'encapsulation (0,1 %) présentent un temps de vie moyen similaire à la Rhodamine B dans le méthanol ($\approx 3,7$ ns) ainsi qu'un bon rendement quantique de fluorescence (≈ 60 %). En revanche, pour un taux d'encapsulation de 5 % (plus de 500 molécules), la présence d'agrégats moléculaires provoque une forte diminution du rendement quantique de fluorescence (< 5 %) et du temps de vie moyen de fluorescence (< 1 ns). Grâce à l'ajout d'un contre-ion hydrophobe (F5-TPB, **Figure 27**), un rendement quantique de fluorescence de 23% est atteint pour un taux d'encapsulation de 5 %. La diminution des agrégats au sein de la NPO se traduit donc par une augmentation du temps de vie moyen de fluorescence (> 2 ns), se rapprochant de celui de la molécule seule. Cette modification permet aux NPOs d'atteindre une très forte brillance (**Tableau 5**).

La taille de la Rhodamine B/F5-TPB a été diminuée, passant de 40 à 15 nm [128]. De plus, un rendement quantique supérieur à 60% a été observé. La réduction en taille a été réalisée en changeant la nature et la quantité du polymère d'encapsulation lors de la synthèse. En revanche, la conservation du même taux d'encapsulation (5 %), entraîne une diminution de la brillance (**Tableau 5**).

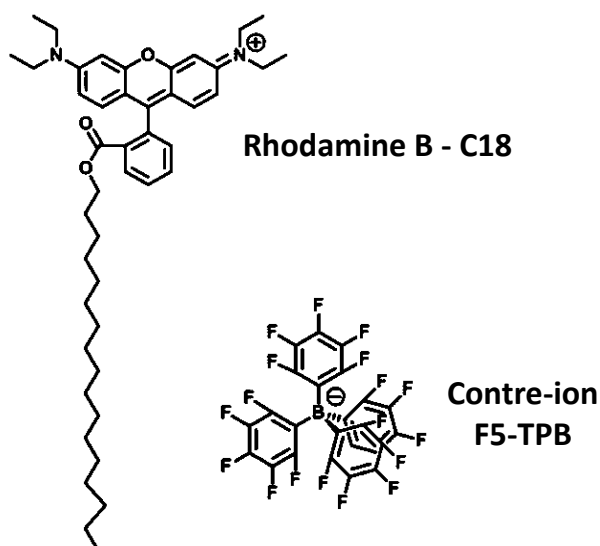


Figure 27 : Structure d'un dérivé de Rhodamine B et de son contre-ion. [6]

Enfin, il est possible de polymériser la molécule fluorescente directement avec le polymère servant à l'encapsulation. Cette méthode apporte un contrôle précis sur la quantité de molécules fluorescentes encapsulées par NPO. La liaison covalente des molécules avec le polymère empêche leur relargage dans le milieu étudié. En 2009 [129], des travaux ont montré que lors de polymérisation d'un dérivé de PDI dans une NPO majoritairement composée de polystyrène (PS) et d'acrylamide, une forte brillance est observée (**Tableau 5**) pour un taux d'encapsulation de 2,4 % et une taille de NPO de 40 nm. Plus récemment, la synthèse d'une NPO à base de dérivé de BODIPY, en copolymérisation avec des molécules de styrène a été réalisée [109], voir **Figure 28A**.

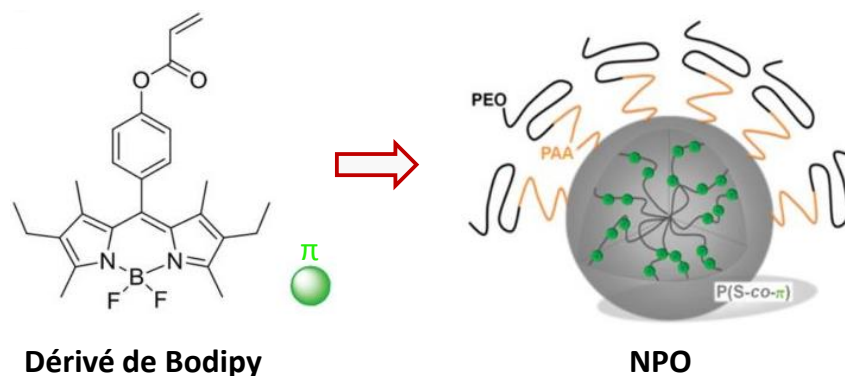


Figure 28 : Structure d'une NPO à base de BODIPY copolymérisés avec du polystyrène [5]. PEO = poly(ethylene oxide), PAA = poly(acrylic acide).

Il a notamment été montré [5], que l'augmentation du taux d'encapsulation induit une nette diminution du rendement quantique de fluorescence et du temps de vie moyen de fluorescence des NPOs en solution (**Figure 29**). Plus de 5000 dérivés de BODIPY sont encapsulés par NPO, à raison de 2,9 unités par chaînes de polymère, représentant un taux d'encapsulation massique de 8 %. Ce grand nombre de molécules permet d'atteindre une brillance très importante (**Tableau 5**) avec un rendement quantique de fluorescence de 35 %, malgré la diminution significative du temps de vie. En revanche, il induit des tailles de NPO allant de 60 à 90 nm.

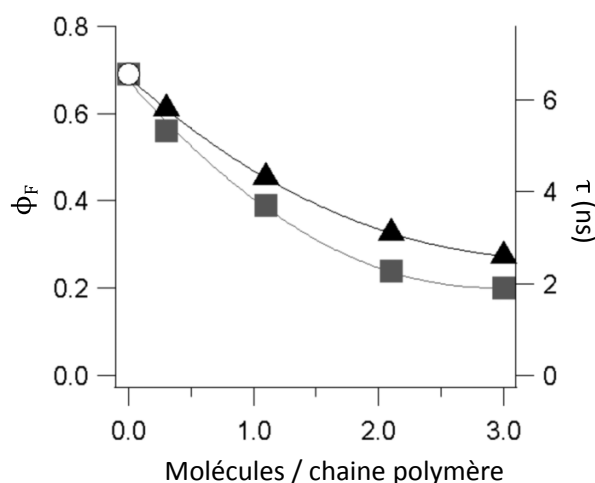


Figure 29 : Evolution du rendement quantique de fluorescence ϕ_F (carrés) et du temps de vie moyen (triangles) en fonction du nombre de molécules par chaîne au sein des NPO. La valeur pour 0 molécules par chaîne, correspond à la molécule seule dans le toluène [5].

Molécule encapsulée	Polymère organique	Taille des NPs (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	B ($10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Encapsulation (% massique)	Φ_F	τ (ns)
Molécules avec ajout de groupements encombrants								
Mes-Bodipy	PS	16	526	540	3 350	3,5	0,77	6,1
Lumogen Red	PLGA	38	575	605	7 500	5	0,5	-
Molécules avec ajout de contre-ions								
Rhodamine B F5-TPB	PLGA	40	560	580	18 000	5	0,23	2,05
Rhodamine B F5-TPB	PMMA-SO ₃ H	15	560	580	3 000	5	0,6	-
Molécules polymérisables								
Dérivé de PDI	Acrylamide PS	40	520	550	10 000	2,4	0,5	-
Dérivé de Bodipy	Polystyrène PEG	70	529	544	140 000	8	0,35	3,6

Tableau 5 : Comparaison de différentes nanoparticules organiques selon plusieurs méthodes limitant l'agrégation moléculaire. Mes-BODIPY [127], Lumogen Red [116], Rhodamine B/F5-TPB [6] [128], dérivé de PDI [129] et dérivé de BODIPY [109].

L'existence de photo-clignotement et la diminution du temps de vie provient de la présence de processus photo-induits au sein de la nanoparticule en compétition à la relaxation de l'état S_1 . La présence de transferts d'énergie de type Förster induit la migration de l'énergie d'excitation au sein des molécules encapsulées. Ces migrations peuvent mener à une émission de fluorescence ou bien en une extinction de fluorescence si la migration se termine sur une espèce noire.

1.4.2.4 Clignotement par transfert d'exciton

En 2010, une extinction de fluorescence sur plus de 100 molécules fluorescentes, sous forme d'agrégats de type J [130] a été observée. Cette extinction a été attribuée à une migration de l'exciton au travers de l'agrégat ou EET («Exciton Energy Transfer»). En effet, la migration peut prendre fin par l'émission de fluorescence d'une molécule ou lorsque

l'exciton fait passer une molécule dans un état noir, annulant dans le même temps l'émission de fluorescence sensée se produire. En revanche, ces agrégats sont inutilisables tels quels en imagerie de par leurs tailles supérieures au micromètre et leur faibles solubilités dans les milieux aqueux. D'autres études ont également montré un clignotement par migration d'excitons [131, 132].

S. Klymchenko et al [6] ont synthétisé la première NPO montrant une propriété de clignotement. L'étude a été réalisée sur des NPOs d'environ 40 nm, composées de Rhodamine B modifiées par une chaîne hydrophobe de 18 carbones (**Figure 27**) dont la charge positive est annulée par la présence d'un contre-ion fluoré, le F5-TPB. Les auteurs ont réalisé de la microscopie dSTORM afin d'obtenir des images super-résolues (**Figure 30**). L'état OFF survient après migration de l'énergie d'excitation vers une espèce noire, attribuée ici à une espèce radicalaire de la Rhodamine B.

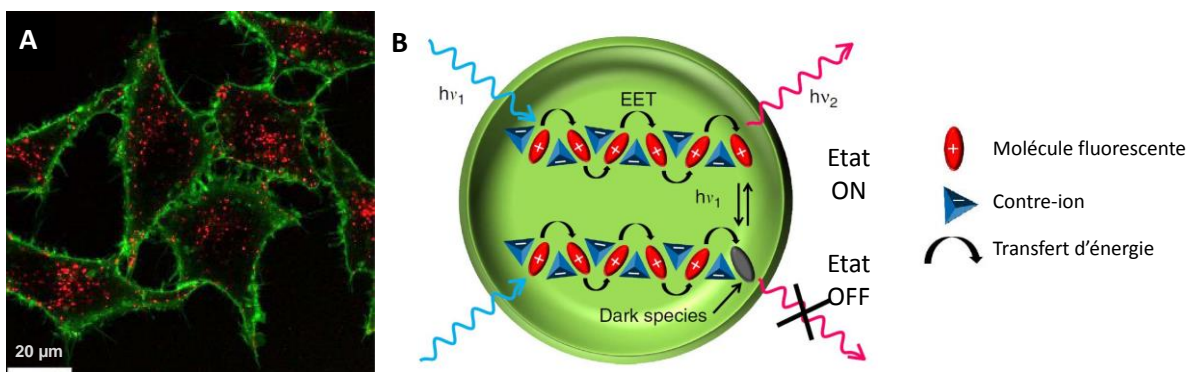


Figure 30 : (A) Image dSTORM de cellules HeLa. Les membranes cellulaires sont marquées par la molécule Alexa488 (en vert) et le cytoplasme contient la NPO Rhodamine B/F5-TPB (en rouge). (B) Schéma représentant un « Excitation Energy Transfert », ou homo-FRET, au sein de la NPO Rhodamine B/F5-TPB. [6]

Les auteurs de cette étude ont également réalisé des expériences de spectroscopie de particules uniques. Chaque résultat a été obtenu sur une moyenne de 200 NPOs. Des NPOs présentant différents taux d'encapsulation (0,1, 1 et 5 %), allant jusqu'à environ 500 molécules par NPO, ont été comparées sous différentes puissances d'illumination (0,45, 4,5 et 13,5 W.cm⁻¹), voir **Figure 31**. Seules les NPOs dont les taux d'encapsulation correspondent

à 1 et 5 % présentent un clignotement ON/OFF. Pendant les temps OFF, on remarque que l'intensité de fluorescence est proche du bruit de fond, ce qui montre que la quasi-totalité des molécules s'éteignent en même temps. De plus, les auteurs ont montré que la puissance d'illumination a un impact sur le temps passé dans les états ON et OFF. On peut voir **Figure 31B** que pour une puissance de $0,45 \text{ W.cm}^{-1}$, la molécule passe plus de temps à l'état ON qu'à l'état OFF. Cette tendance s'inverse pour les puissances de 4,5 et $13,5 \text{ W.cm}^{-1}$. De long temps OFF sont très importants pour obtenir des images super-résolues avec une méthode SMLM. Les statistiques accumulées lors de cette étude ont également montré que les différents temps ON et OFF suivent une loi de puissance [133].

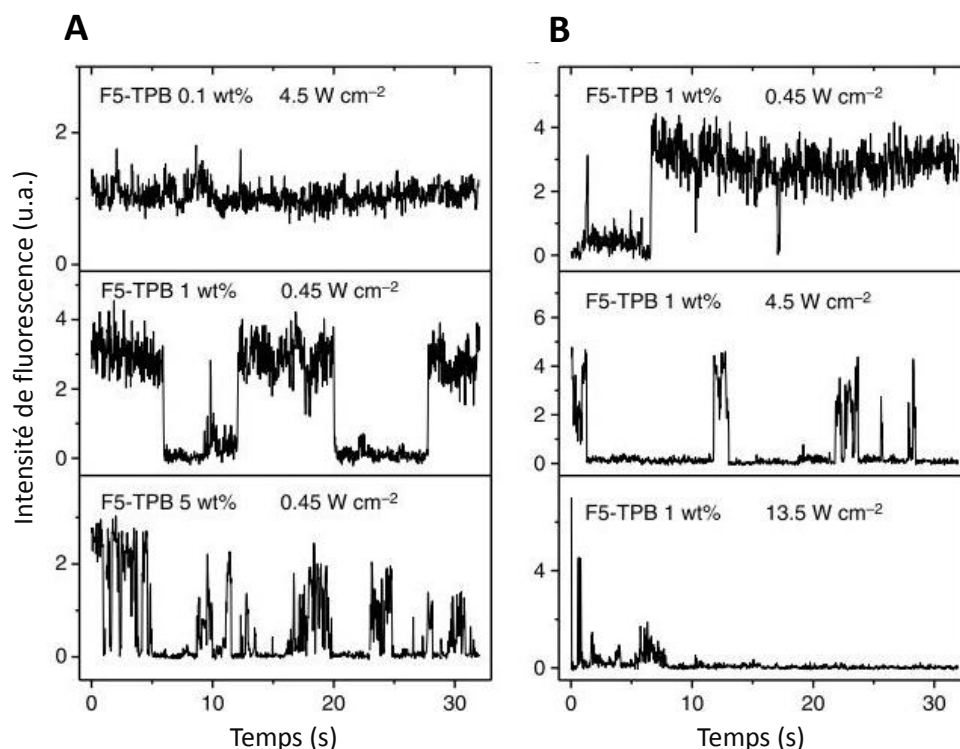


Figure 31 : Différentes traces de particules uniques au cours du temps, (A) avec variation du taux d'encapsulation et (B) avec variation de la puissance d'illumination. [6]

Un transfert d'énergie de type EET sur plus de 200 molécules a été estimé pour des NPOs possédant environ 500 molécules soit un taux d'encapsulation de 5%. Cet EET apparaît également dans une moindre mesure pour un taux de d'encapsulation de 1%. En effet, un transfert d'énergie de type « hopping », au sein d'un groupe de molécules orientées de façon aléatoire donne lieu à une fluorescence dépolarisée [134, 135]. S. Klymchenko et al [6]

ont réalisé des expériences d'anisotropie de fluorescence résolue en temps (**Figure 32**), c'est-à-dire une étude de la dépolarisation de la fluorescence en fonction du temps.

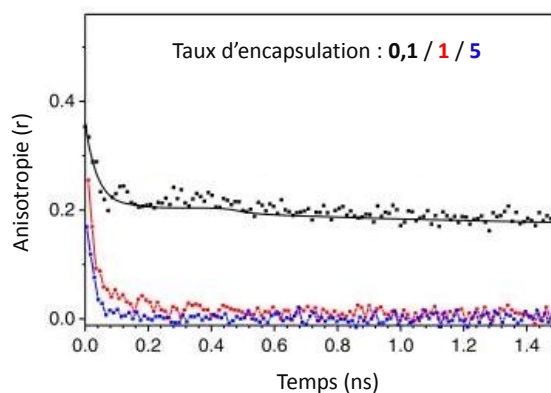


Figure 32 : déclin d'anisotropie résolus en temps de la NPO Rhodamine B/F5-TPB pour différents taux d'encapsulation, 0,1 % en masse totale (noir), 1 % (rouge) et 5 % (bleu). [6]

Afin de confirmer la présence d'un transfert d'énergie au sein des nanoparticules, il est également possible d'observer par spectroscopie femtoseconde les différents phénomènes se produisant juste après l'excitation des molécules, par spectroscopie femtoseconde. Par cette technique, les différentes espèces chimiques, fluorescentes ou non fluorescentes, qui absorbent de l'énergie deviennent observables. Une étude réalisée sur un couple PDI-éthynylène [136] a caractérisé un transfert d'énergie entre ces deux molécules par spectroscopie femtoseconde. Les temps de déclin de la région spectrale correspondant à la bande d'absorption ont été attribués à différentes espèces. Pour la molécule de PDI seule, un temps mono-exponentiel de 5 ns a été trouvé, attribué à la molécule d'origine, dont le temps de vie de fluorescence est autour de 5,2 ns. Lors de l'étude du couple PDI-éthynylène, deux temps de 185 ps et 1 ns ont été trouvés, attribués respectivement à la formation et au déclin d'une espèce radicalaire de la molécule de PDI. Enfin, l'étude du couple PDI-éthynylène sur lequel ont été rajoutés des groupements de PDI montre un temps supplémentaire d'une dizaine de picosecondes attribué à une annihilation singulet-singulet entre 2 molécules d'éthylène. Cette étude montre 2 phénomènes conduisant à l'extinction de la fluorescence susceptibles d'être observés lors d'un transfert d'énergie intermoléculaire : la formation d'une espèce radicalaire et une annihilation singulet-singulet.

I.5 Conclusion

Les NPOs offrent des brillances bien supérieures aux sondes fluorescentes classiques. La liaison covalente des molécules au sein de la NPO permet d'obtenir une très faible cytotoxicité. Enfin, leur fonctionnalisation de surface permet une forte adaptation aux différents milieux d'études possibles. Les molécules qu'elles renferment sont susceptibles de former des agrégats non fluorescents. Plusieurs solutions ont été mises en place afin de réduire cette agrégation moléculaire, l'ajout de groupement encombrant sur les molécules, l'ajout de contre-ion et la polymérisation des molécules avec NPO. Ces avancées ont permis d'atteindre des brillances dépassant $10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Cependant, afin de pouvoir atteindre la super-résolution en microscopie de fluorescence, un clignotement ON-OFF est nécessaire. Un seul exemple de cette photo-physique a récemment été montré avec la NPO Rhodamine B/F5-TPB. Pouvoir induire un transfert d'énergie collectif et simultané entre plusieurs centaines de molécules fluorescentes au sein d'une NPO reste un vrai challenge.

Une partie de mon travail de thèse est la caractérisation de la photo-physique d'une NPO contenant plus de 5000 molécules dérivées de BODIPY. Afin de la rendre utilisable en imagerie de super-résolution, un clignotement est nécessaire. L'objectif est donc d'étudier les transferts d'énergie possibles au sein de cette NPO et de trouver des conditions expérimentales pour lesquelles un transfert d'énergie collectif permet l'obtention d'un état OFF, à l'image de la NPO Rhodamine B/F5-TPB. Dans notre cas, le nombre de molécules encapsulées va rendre encore plus difficile l'obtention d'une extinction totale de la fluorescence de la NPO.

**Chapitre II Caractérisation
spectroscopique d'ensemble de
nanoparticules polymères à forte
concentration de BODIPYs**

II.1 Introduction

Dans ce chapitre seront abordés les résultats obtenus lors de l'étude de la molécule BDPMA (BODIPY MethAcrylate) et d'émulsions de nanoparticules (NPFs) polymères fluorescentes à couronne de PEO-PAA (poly(éthylène glycol) - poly(acide acrylique)) et à cœur polystyrène-BDPMA avec 3 BDPMA en moyenne par chaîne. Cette concentration en BDPMA rend la brillance de la NPF environ 100 fois supérieure à celles des QDs classiques. Ces nanoparticules ont été synthétisées lors de la thèse de C. Grazon [137] et publiées récemment [5, 109, 138]. Notre but est de comprendre les processus photo-induits au sein de ces nanoparticules pour potentiellement les utiliser en imagerie de fluorescence super-résolue. L'agencement et le nombre de molécules excitées au sein de la nanoparticule sont deux paramètres importants car ils vont déterminer l'efficacité des transferts d'énergie à longue distance (supérieure au nanomètre : migration d'énergie par homo-FRET, extinction de fluorescence par annihilation singulet-singulet) et l'existence de processus à courte distance conduisant généralement à l'extinction de fluorescence (formation d'excimères, formation de cation/anion par transfert d'électron avec l'environnement). Les transferts d'énergie donnent lieu à des processus dynamiques multi-échelles, de la picoseconde jusqu'à quelques centaines de nanosecondes, et vont permettre de faire migrer l'énergie vers des espèces non fluorescentes (radical cation, excimère) généralement à l'origine du photo-clignotement.

Dans un premier temps, une étude en spectroscopie stationnaire sera réalisée sur le monomère et les NPFs, suivie d'une étude de fluorescence résolue en temps afin de déterminer les déclins de fluorescence caractéristiques du temps de vie de l'état S_1 . Dans ces expériences le nombre de molécules de BDPMA excitées à l'intérieur d'une NPF par impulsion est inférieur à 1 et la résolution temporelle est d'une dizaine de picoseconde. Les transferts d'énergie FRET, transferts d'électrons, l'existence d'excimères et l'influence de la contrainte mécanique (état solide) du monomère seront caractérisés. Des expériences d'anisotropie de temps de vie d'émission de fluorescence nous permettront d'évaluer la vitesse de migration de l'énergie entre différentes molécules par homo-FRET. Enfin, une étude en absorption transitoire femtoseconde en fonction de la puissance de pompe nous permettra d'étudier les phénomènes de transferts d'énergie entre plusieurs molécules

excitées à l'intérieur d'une même NPF avec une résolution d'une centaine de femtosecondes.

II.2 Conditions expérimentales

II.2.1 Structure des NPFs

Mon travail s'est focalisé sur la caractérisation des NPFs, synthétisées par Gilles Clavier au PPSM (ENS Cachan) et Rachel Méallet-Renault à l'ISMO (Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay) [5]. Elles possèdent une surface hydrophile composée d'un copolymère de poly(éthylène glycol) (PEO) avec du poly(acide acrylique) (PAA). Cette structure est liée de façon covalente à un cœur hydrophobe composé de polystyrène, dans lequel sont incorporées les molécules de BDPMA (BODIPY MéthAcrylate) par copolymérisation [138]. Enfin la structure se termine par une fonction trithiocarbonate (TTC) et une chaîne de 12 carbones (**Figure 33**).

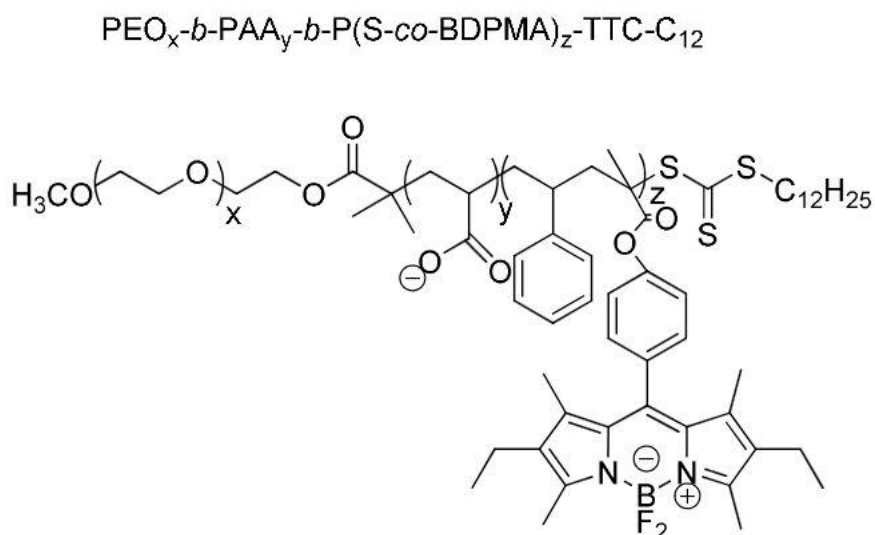


Figure 33 : Structure de la chaîne polymère constituant la NPF [138].

Les NPFs contiennent environ 5250 molécules à raison de 3 molécules par chaîne de polystyrène (**Figure 34**). Leur surface hydrophile est fonctionnalisable et les rend parfaitement biocompatible. Les études déjà réalisées sur ces NPOs, montrent qu'elles possèdent un rendement quantique de fluorescence de 0,2 et un diamètre hydrodynamique de 70 nm. Un déclin multi-exponentiel donne un temps de vie moyen estimé à 2,8 ns. Les molécules de BDPMA sont supposées s'agencer de façon hétérogène au sein du cœur hydrophobe et être localisées plutôt proches de la surface (à l'interface du cœur hydrophobe

et de la couronne hydrophile). Mais il est encore difficile de prédire leur agencement et d'estimer une distance moyenne entre chaque BDPMA au sein des NPFs.

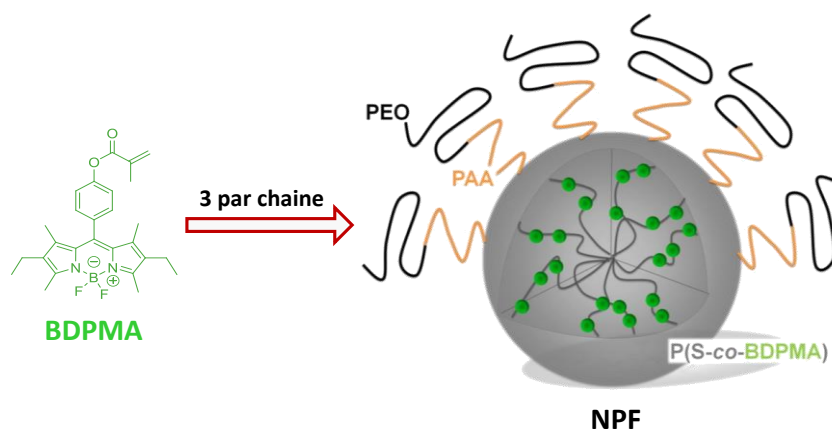


Figure 34 : répartition des BDPMA au sein de la NPF. Adaptée de [5].

II.2.2 Solvants

L'eau millipore a été obtenue via un appareil de purification Purelab classic (ELGA). L'ensemble des solvants organiques utilisés pour la préparation et l'analyse des échantillons sont de qualité spectroscopique et ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

II.2.3 Spectroscopie d'absorption UV-visible stationnaire

Les spectres stationnaires des différents échantillons en solution ont été obtenus par un spectromètre UV-visible Cary1 (VARIAN) possédant une gamme spectrale comprise entre 200 et 800 nm et une résolution maximale de 0,1 nm. La précision en absorbance est de l'ordre de 10^{-3} . L'ensemble des mesures ont été réalisées avec une résolution spectrale de 1 nm, en mode double faisceau et à température ambiante.

II.2.4 Spectroscopie de fluorescence stationnaire

Les spectres de fluorescence ont été réalisés sur un FluoroMax de marque HORIBA possédant un monochromateur pour l'excitation et un pour l'émission. Les paramètres utilisés sont : une bande passante de 1,5 nm, une incrémentation de 1 nm, un temps d'intégration de 0,1 s et une cuve d'épaisseur 1 cm.

II.2.5 Spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde

Le système utilisé se compose d'une ligne à retard (MT160-250PP) de marque Microcontrol, d'une précision de $\pm 0,1 \mu\text{m}$, permettant un contrôle précis du délai (t) entre le faisceau de pompe (488 nm, 100 fs) et de sonde (continuum de lumière blanche femtoseconde). Le chemin optique pour l'impulsion de sonde par rapport à l'impulsion de pompe (488 nm, 100 fs) peut ainsi être contrôlé entre 0 et 1,5 ns sachant qu'un déplacement de $1 \mu\text{m}$ correspond à un délai d'environ 13 fs. En amont de l'échantillon (**Figure 35**), le faisceau de sonde est divisé en deux (50 – 50 %), correspondant au signal de référence I_{ref} et de mesure I_{sonde} . La taille du faisceau de pompe, mesurée à l'aide d'une caméra, est de 0,4 micromètres (FWHM). Le recouvrement pompe-sonde est optimisé pour maximiser l'interaction entre les deux faisceaux sur la totalité de l'épaisseur de l'échantillon. La polarisation entre ces deux faisceaux est fixée à l'angle magique, correspondant à $54,7^\circ$, afin de s'affranchir de l'influence de la rotation des molécules. L'échantillon est placé dans une cuvette en quartz-suprasil d'épaisseur 1 mm. La cuve en mouvement (translation horizontale) permet d'éviter la destruction de l'échantillon et également de garantir que la fraction du volume pompée soit toujours dans l'état fondamental. Le système permet de mesurer les spectres de variation d'absorbance ($A_{\text{pompe}} - A_{\text{sans pompe}}$) pour différents délais. Les spectres obtenus sont corrigés du décalage temporel (dû à la dispersion des optiques) des longueurs d'onde du rouge-proche infrarouge par rapport aux longueurs d'onde UV (*Group Velocity Dispersion*). Ensuite, les différentes constantes cinétiques des espèces transitoires sont déterminées par analyse globale sur l'ensemble du spectre (350 - 700 nm) avec un pas de 10 nm.

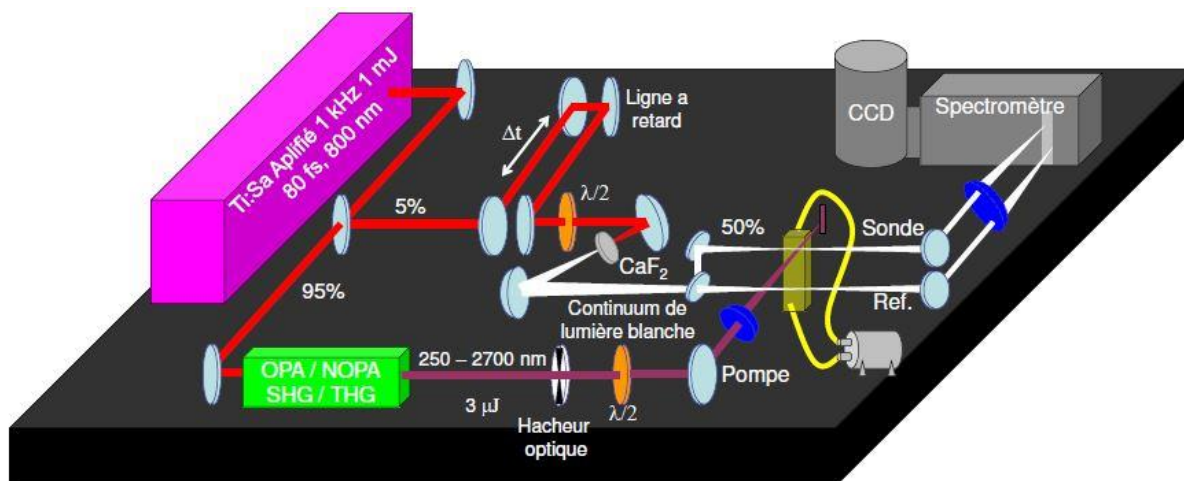


Figure 35 : Schéma du montage pompe – sonde utilisé pour les expériences d'absorption transitoire femtoseconde.

II.2.6 TCSPC en solution

Le montage de la source laser est représenté **Figure 36**. Il se compose d'un laser Titane-Saphir (Chameleon Ultra II) de marque Cohérent, cadencé à une fréquence 80 MHz, délivre des impulsions de 200 fs de large et peut atteindre une puissance de 3,8 W sur une gamme de longueur d'onde de 340 à 1080 nm. Une puissance d'environ 1.3 W est obtenue à la longueur d'onde de 976 nm. On diminue la fréquence des impulsions à 4 MHz grâce au sélecteur d'impulsion. La longueur d'onde d'excitation de 488 nm (4 mW) est obtenue grâce à un générateur de seconde harmonique (SHG, « *Second Harmonic Generator* ») de marque A.P.E. Sur le faisceau à 976 nm, un prélèvement de 4% (lame de verre) est fait, servant à déclencher une photodiode rapide permettant de définir le temps zéro pour le comptage de photon unique (TCSPC). A la sortie du module de SHG, des miroirs en aluminium (large bande UV) de diamètre 25,4 mm et dont la réflexion est optimisée pour le domaine de l'UV-visible et du proche infrarouge, permettent de diriger le faisceau vers un spectromètre FluoTime200 de marque PicoQuant.

Le spectromètre FluoTime200 se compose d'un porte cuve pour des cellules 1 x 1 cm collectant l'émission à 90° par rapport au faisceau d'excitation. L'émission de lumière est dirigée dans un monochromateur permettant la sélection de la longueur d'onde d'émission. La largeur des fentes d'entrée et de sortie du monochromateur a été fixée à 0,5 mm conduisant à une bande passante de 4 nm. Le signal de fluorescence est ensuite détecté et amplifié par un photomultiplicateur à galettes de micro-canaux (MCP-PMT, « *Multichannel*

Plate - PhotoMultiplier Tube ») refroidi par effet pelletier à -40° permettant d'avoir un bruit proche de zéro. Les déclins sont enregistrés sur 65 000 canaux de 4 ps chacun. La fonction de réponse instrumentale (IRF, « *Instrumental Response Function* ») a été mesurée à la longueur d'onde d'excitation (FWHM = 36 ps) à l'aide d'une solution diffusante « ludox ». Le spectromètre est également équipé de 2 polariseurs permettant de contrôler la polarisation du faisceau d'excitation et celui d'émission. Ces deux polariseurs vont permettre de réaliser des mesures de temps de vie classique (à l'angle magique à $54,7^{\circ}$ entre la polarisation du faisceau d'excitation et d'émission) en s'affranchissant du problème de photo-sélection et de rotation des molécules lors de la mesure du déclin. Enfin la mesure des déclins pour différentes polarisations permet de réaliser des mesures d'anisotropie de temps de vie de fluorescence. Le fonctionnement du comptage de photons uniques permettant la mesure des temps de vie de fluorescence est détaillé en **Annexe 1**.

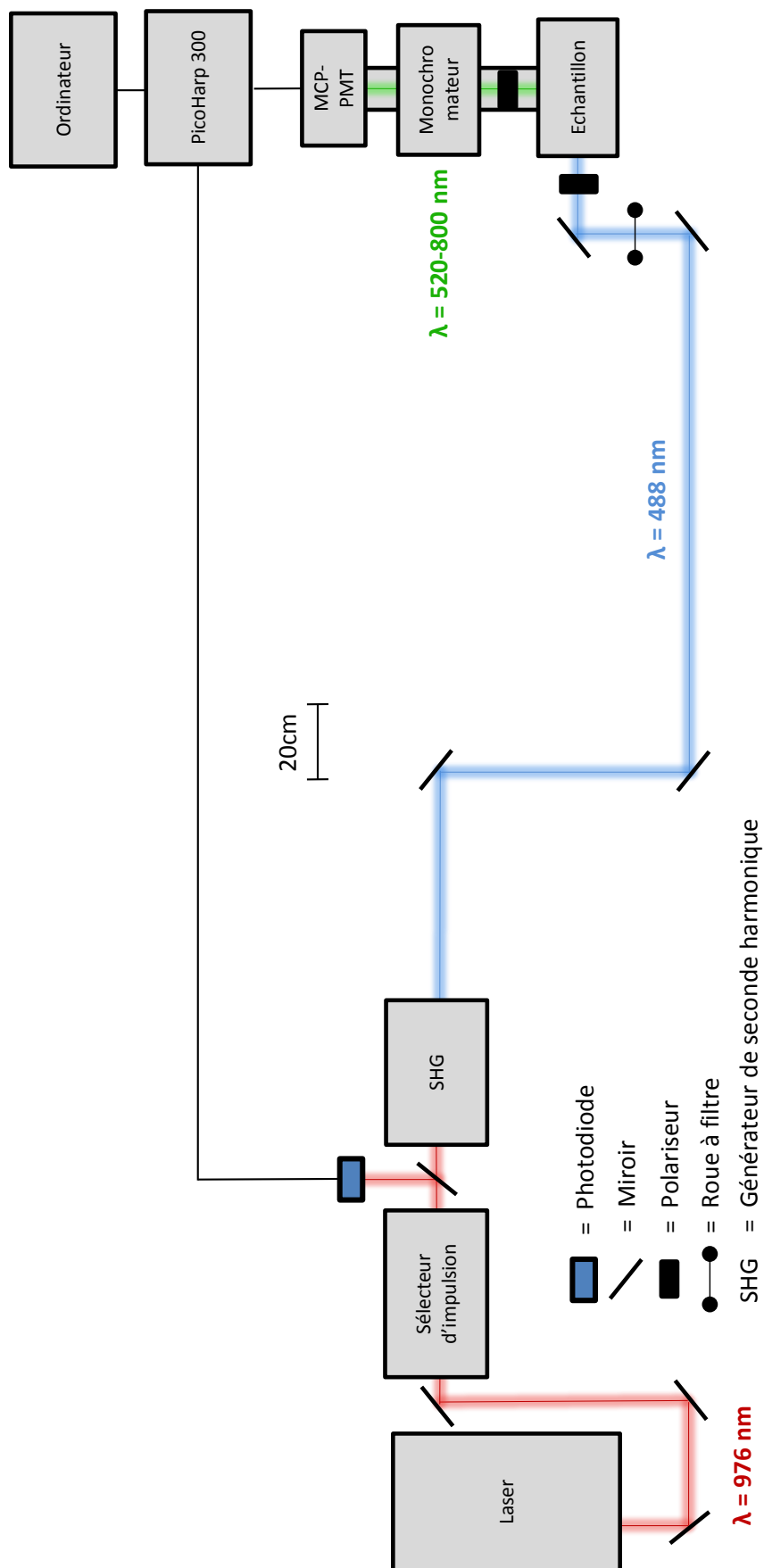


Figure 36 : Schéma du montage utilisé pour les mesures de temps de vie de fluorescence en solution.

II.3 Résultats de l'étude des NPFs en solution

II.3.1 Détermination de la taille des NPFs

Nous avons commencé par déterminer la répartition en taille des NPFs en les analysants par DLS (« *Dynamic Light Scattering* » ou diffusion dynamique de la lumière) (**Figure 37**). 93 % de l'intensité en DLS correspond à des particules de 100 nm de diamètre, attribuées aux NPFs et 7 % à des particules de 740 nm de diamètre, attribuées à quelques agrégats de NPFs. On remarque qu'elles sont 30 nm plus grandes que celles décrites dans la littérature [5]. Cette différence peut s'expliquer par une difficulté à les dissocier complètement et donc l'existence d'agrégats de NPFs en solution.

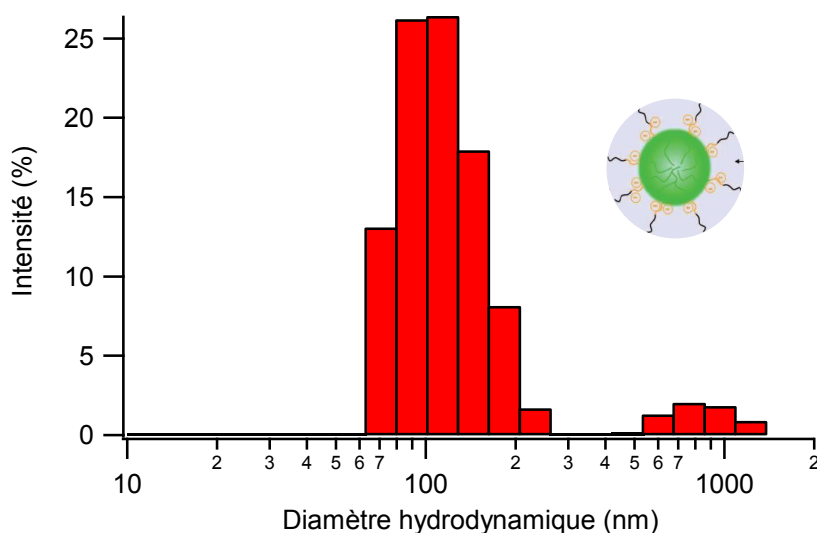


Figure 37 : Histogramme de DLS pour les NPFs

II.3.2 Spectres stationnaires UV-visible

Les spectres d'absorption et de fluorescence de la molécule de BDPMA dans le toluène (apolaire) et l'acétonitrile (polaire) sont présentés **Figure 38**. L'acétonitrile a été choisi pour caractériser les molécules proches de la couronne hydrophile tandis que le toluène permet de s'intéresser à celles situées au centre du cœur de la NPFs [139].

La molécule de BDPMA dans le toluène présente un maximum d'absorption à 529 nm et un maximum d'émission de fluorescence à 540 nm, ce qui représente un stokes shift de 457 cm^{-1} . Ces maxima sont légèrement déplacés vers les hautes énergies pour les spectres dans l'acétonitrile, avec des maxima d'absorption et d'émission respectivement à 522 et 535 nm.

Sur les deux spectres, on remarque l'épaule vibrationnel de la bande $S_0 \rightarrow S_1$ (centrée sur 480 nm). Enfin, une seconde bande vers 370 nm, de plus faible intensité, correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_2$. On observe également, pour les deux solvants, une certaine symétrie entre les spectres d'absorption et de fluorescence, qui traduit une géométrie similaire entre le BDPMA à l'état fondamental (S_0) et à l'état excité (S_1). Le déplacement spectral du toluène vers les basses énergies s'explique par un état excité moins polaire que l'état fondamental.

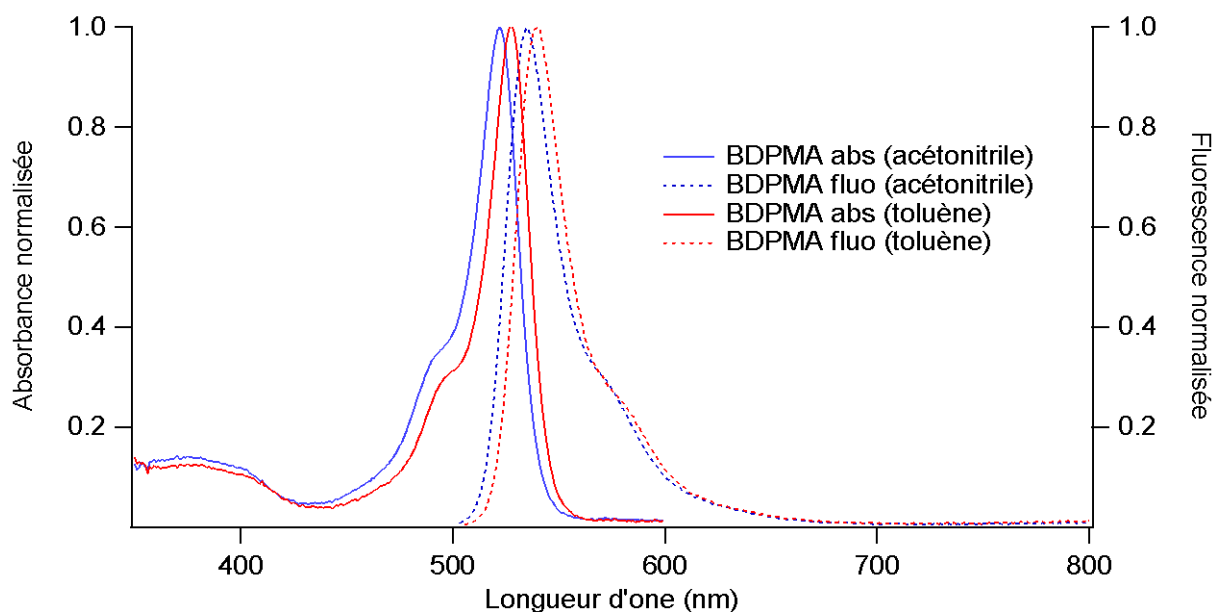


Figure 38 : Spectres stationnaires UV-visible de la molécule de BDPMA dans le toluène (rouge) et dans l'acétonitrile (bleu). Les spectres de fluorescences ont été réalisés par excitation à 488 nm

Les résultats obtenus dans le toluène sont similaires à ceux retrouvés dans la littérature [5]. Le coefficient d'absorption molaire de la molécule dans le toluène à 488 nm est de $14 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. On utilise l'équation (22) pour calculer le rendement quantique de fluorescence, avec A l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation (488 nm), I l'intégration de la fluorescence et n l'indice de réfraction du milieu, pour l'échantillon E et la référence R . Un rendement quantique de fluorescence de 0,75 (**Tableau 6**) a été calculé en prenant comme référence la Rhodamine 6G dans l'eau (un rendement quantique de fluorescence de 0,83 à 488 nm [140]).

$$\phi_F^{(E)} = \phi_F^{(R)} \times \frac{(1 - 10^{-A^{(R)}}) \times I^{(E)} \times n^{2(E)}}{(1 - 10^{-A^{(E)}}) \times I^{(R)} \times n^{2(R)}} \quad (22)$$

Les spectres d'absorption et de fluorescence des nanoparticules NPFs dispersées dans l'eau ont été ensuite mesurés, voir **Figure 39**. Le maximum d'absorption est à 529 nm et le maximum d'émission de fluorescence est à 546 nm (Tableau 6). Un rendement quantique de fluorescence de 0,1 et une brillance de $5,7 \times 10^6$ ont été calculés. Le rendement quantique déterminé est plus faible que celui rapporté dans la littérature. On peut faire l'hypothèse que le vieillissement des NPFs a conduit à la photo-dégradation de molécules de Bodipy et à la formation de quencher.

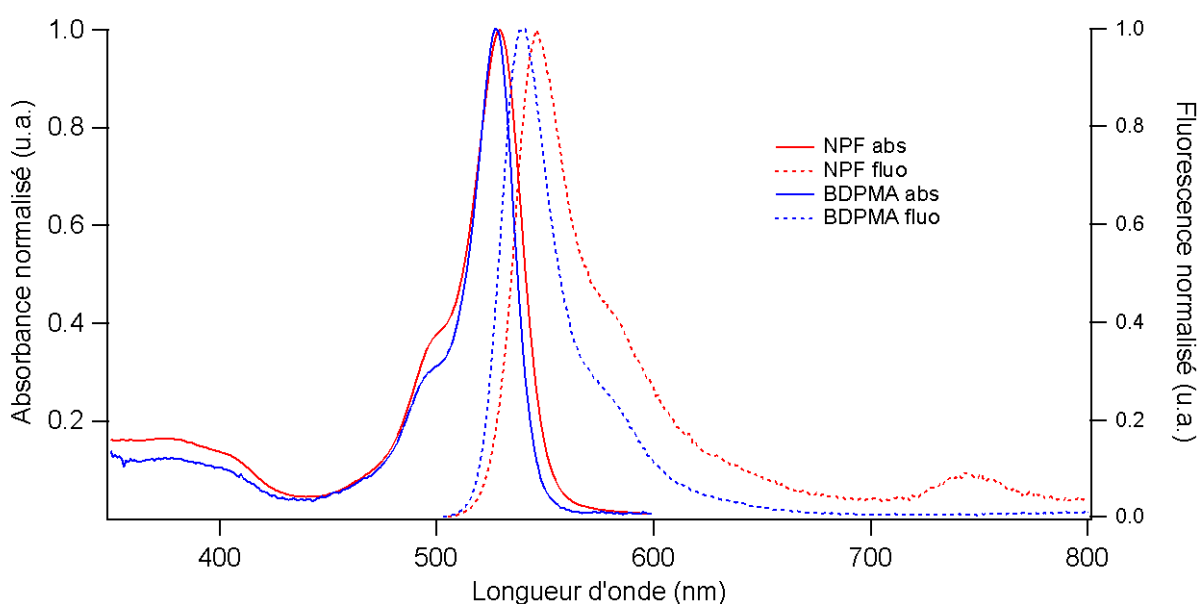


Figure 39 : Spectres stationnaires UV-visible de la molécule de BDPMA dans le toluène (bleu) et des NPFs (rouge) dans l'eau. Les spectres de fluorescences ont été réalisés par excitation à 488 nm

Aucun changement significatif entre les spectres d'absorption de la molécule de BDPMA dans le toluène et de la NPF n'est observé, ce qui indique qu'au sein de la NPF il n'y a pas d'interactions fortes entre les molécules à l'état fondamental. Le maximum d'absorbance pour les NPFs correspond à celui mesuré pour les molécules de BDPMA dans le toluène. On observe, en revanche, un élargissement de 288 cm^{-1} et un déplacement de 203 cm^{-1} vers les basses énergies du maximum d'émission pour les NPFs comparé à celui de la molécule de BDPMA dans le toluène. L'élargissement est attribué à une hétérogénéité géométrique des molécules au sein des NPFs et le déplacement bathochromique a déjà été observé lors d'une étude sur des krypto-BODIPY copolymérisés avec du PMMA [141]. Il a été

attribué au confinement des molécules au sein du polymère sous forme d'agrégats. Un déplacement spectral vers le rouge étant caractéristique des agrégats de type J.

La faible augmentation d'absorbance pour des longueurs d'ondes inférieures à 400 nm s'explique par la diffusion de la lumière par les NPFs. Enfin, l'épaulemment vibrationnel de la bande $S_0 \rightarrow S_1$ (centré sur 500 nm) est plus marqué pour les NPFs que pour les molécules en solution, ce qui est généralement observé [142].

En revanche, pour le spectre de fluorescence des NPFs on note la présence d'une faible bande centrée à 750 nm non décrite dans les études précédentes sachant que les spectres s'arrêtaient à 700 nm. Cette bande suppose l'existence d'une nouvelle espèce. Une première hypothèse est d'associer cette bande à une émission de type excimère mais sa largeur et son maximum d'émission sont différents des bandes d'émission d'excimère généralement observées pour les Bodipy. La nature de cette espèce n'est donc pas triviale. En ce qui concerne la diminution du rendement quantique de fluorescence pour les NPFs, celle-ci peut être associée à l'existence majoritaire d'agrégats. En effet l'existence d'agrégats conduit généralement à l'augmentation des phénomènes de relaxations non radiatives de l'état S_1 . Cependant le spectre d'absorbance des NPFs ne montre pas d'interaction forte caractéristique de l'existence d'agrégats. Une autre explication peut être l'existence d'une migration efficace de l'énergie vers des espèces relaxant essentiellement de façon non radiative ou des espèces non fluorescentes (cation / anion). En effet les spectres d'émission et d'absorption nous permettent de calculer, d'après l'équation (22), un R_0 de « *hopping* » ou homo-FRET de 4,7 nm. Sachant qu'il y a plus de 5000 molécules de BDPMA, il y a une probabilité forte pour que la distance entre deux molécules soit inférieure à R_0 , ce qui impliquerait l'existence de transferts d'énergie par homo-FRET efficaces.

Echantillon	Solvant	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	Stoke shift (cm^{-1})	B ($10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Φ_F
BDPMA	toluène	527	540	457	12	0,75
	ACN	522	535	465	15	0,93
NPF	Eau	529	546	589	5 775	0,1

Tableau 6 : Caractéristiques spectrales obtenues lors de l'étude stationnaire en solution réalisée sur la molécule de BDPMA et sur les NPFs.

Nous allons ensuite mesurer les temps de vie de fluorescence pour obtenir une caractérisation plus fine de la relaxation des états fluorescents et de l'espèce à 750 nm.

II.3.3 Temps de vie de fluorescence

Tout d'abord, la molécule de BDPMA a été analysée dans le toluène et dans l'acétonitrile. Le temps de vie (mono-exponentiel) de 4,67 ns obtenu dans le toluène (**Figure 40**) est comparable avec le temps rapporté dans la littérature ($\tau = 4,9 \text{ ns}$) [109]. Le temps de 4,9 ns est déterminé en prenant l'intégrale de l'air sous le déclin de fluorescence. Le temps de vie de fluorescence de la molécule dans l'acétonitrile (mono-exponentiel) est de 5,34 ns. On a vu précédemment que les spectres de la molécule de BDPMA dans le toluène étaient déplacés vers les basses énergies, réduisant ainsi la différence d'énergie entre les états S_1 et S_0 . Cette réduction induit une augmentation de la relaxation par voie non radiative (**Tableau 7**) se traduisant par une réduction du temps de vie de fluorescence.

$$k_r = \frac{\Phi_F}{\tau} \quad \text{et} \quad k_{nr} = \frac{1 - \Phi_F}{\tau} \quad (23)$$

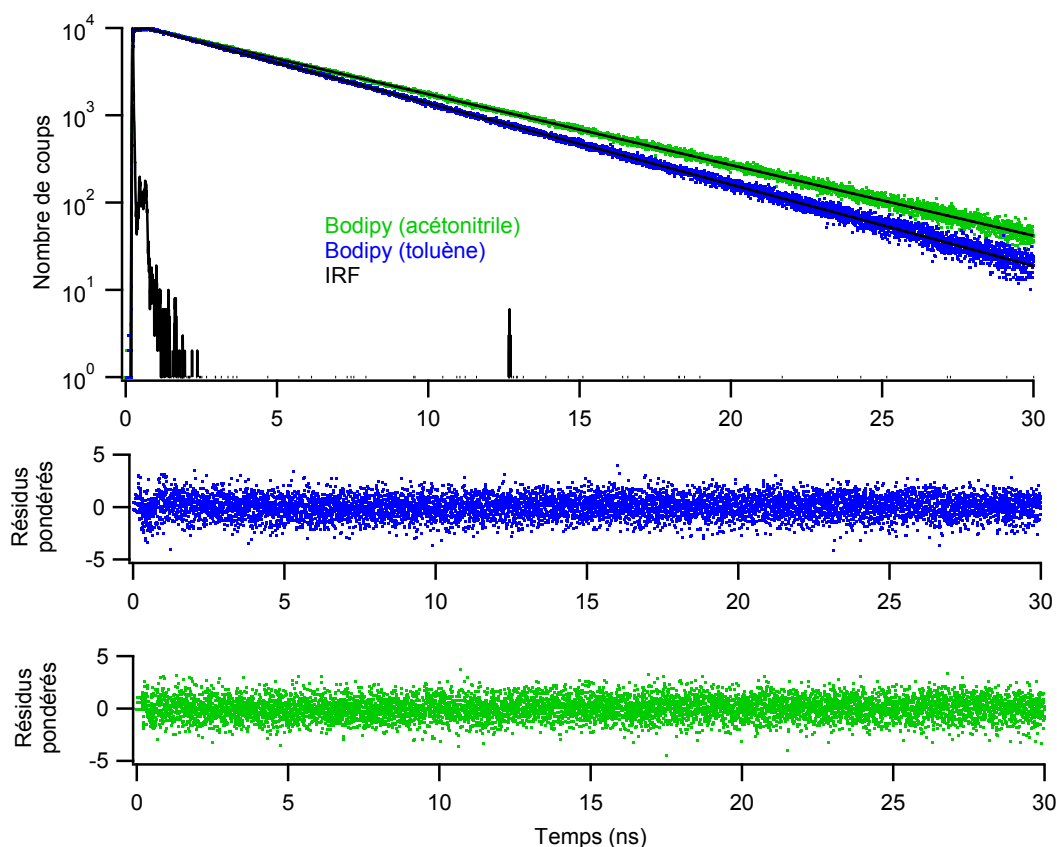


Figure 40 : Déclin de fluorescence et ajustement avec une fonction mono-exponentielle de la molécule BDPMA dans l'acétonitrile (vert) et le toluène (bleu). Les résidus pondérés sont aussi représentés.

Le déclin de fluorescence des NPFs a ensuite été étudié à 3 longueurs d'onde d'émission différentes (540, 580 et 750 nm) (**Figure 41A**). L'énergie d'excitation par impulsion laser utilisée est de $3,75 \times 10^{-7} \mu\text{J}$. A cette énergie, on obtient environ 10^{-4} molécules excitées par NPF. Les phénomènes d'annihilation singulet-singulet, faisant intervenir 2 molécules à l'état excité ne seront donc statistiquement pas observés. L'utilisation de 4 fonctions exponentielles est nécessaire à la modélisation des déclin de fluorescences des NPFs. En revanche, ce choix n'implique pas directement l'existence de 4 espèces. Les graphiques de résidus et d'autocorrélation (**Figure 41B et C**) montrent peu de dispersion et sont bien centrés sur zéro. Les temps de vie obtenus sont présentés dans le **Tableau 7**. Les temps de vie moyens τ (basés sur l'intensité « int » et sur l'amplitude « amp ») ont été calculés suivant les équations (24), qui dépendent des paramètres de la modélisation multi-exponentielle.

$$\tau_{\text{int}} = \frac{\sum_i A_i \times \tau_i^2}{\sum_i A_i \times \tau_i} \quad \text{et} \quad \tau_{\text{amp}} = \frac{\sum_i A_i \times \tau_i}{\sum_i A_i} \quad (24)$$

Le styrène étant apolaire comme le toluène, le temps de 4,6 ns est attribué au temps de vie de molécules isolées de BDPMA au sein d'une NPF. On remarque qu'il ne représente que 5% de l'amplitude totale du déclin, ce qui signifie que les molécules interagissent majoritairement avec leur environnement au sein des NPFs.

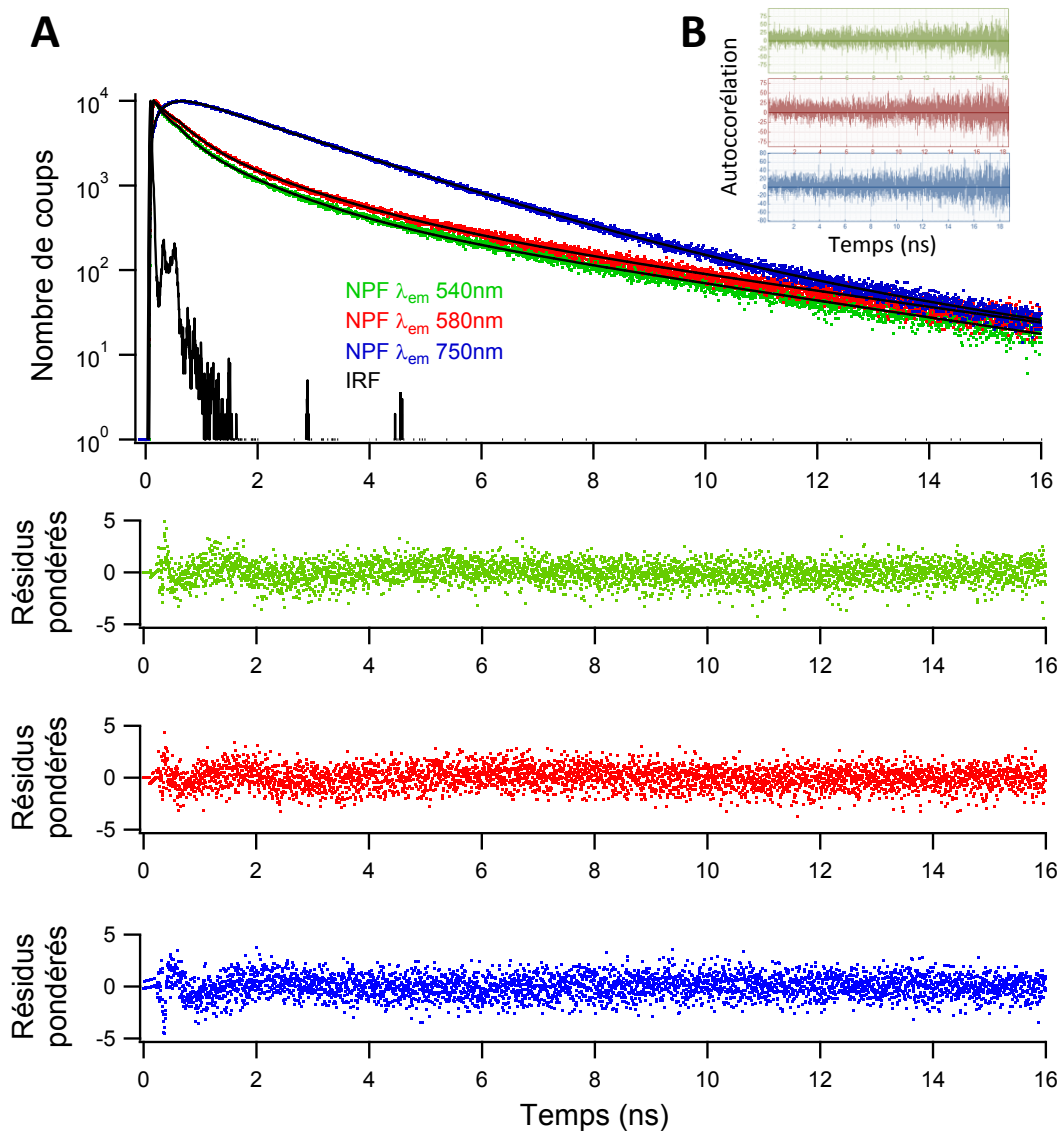


Figure 41 : (A) Déclins de fluorescence des NPFs aux longueurs d'ondes 540 nm (vert), 580 nm (rouge,) 750 nm (bleu) et les résidus des modélisations multi-exponentielles. (B) autocorrélation de la modélisation en fonction du temps.

Les déclin à 540 et 580 nm sont caractérisés par trois temps caractéristiques (4.5 ns, 1.5 ns et une centaine de ps) que l'on associe à l'existence d'au moins 3 espèces. Une première, avec des temps caractéristiques d'une centaine de picosecondes, voir Tableau 7, représentant environ 80% du déclin. Cette relaxation rapide de l'état S1 explique la diminution du rendement quantique de fluorescence des NPFs. On observe également une deuxième espèce avec un temps de 1,5 ns et enfin une troisième avec un temps de 4,5 ns, caractéristique de l'émission d'une molécule de BDPMA seule (Figure 42).

Dans le déclin à 750 nm, on retrouve les temps d'une centaine de picosecondes mais comme un temps de montée, suggérant la formation d'une nouvelle espèce. Cette nouvelle espèce décline en 1,9 ns (95 %) (Figure 42).

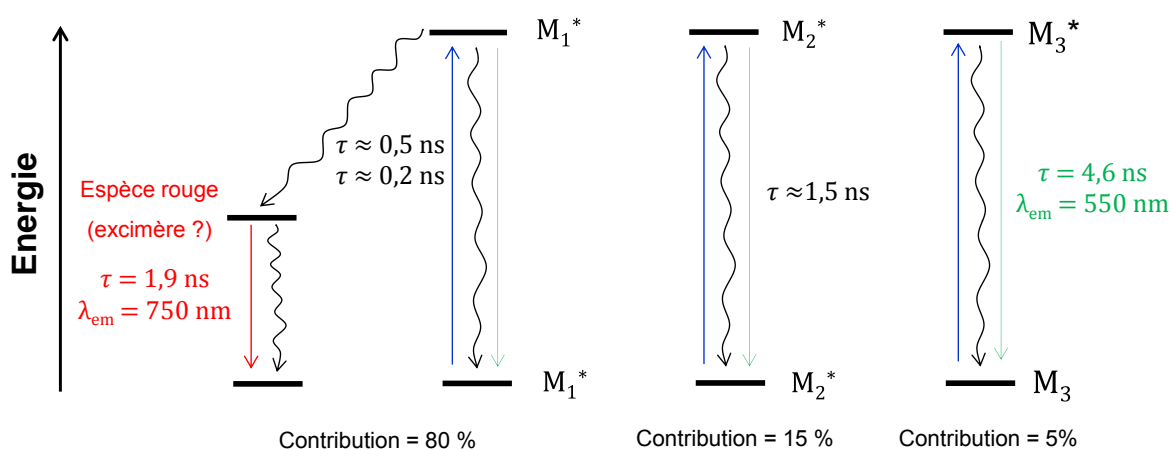


Figure 42 : Diagramme d'énergie représentant les différentes espèces participant aux déclin observés lors de l'étude de fluorescence résolue en temps des NPFs en solution, avec leur contribution.

Phénomènes radiatifs en trait droit et non radiatifs en trait ondulé.

Echantillon	Solvant	λ_{em} (nm)	χ^2	τ_i (ns)	Amplitude (%)	τ_{moyen} en intensité (ns)	Φ_F	k_r ($10^7 s^{-1}$)	k_{nr} ($10^8 s^{-1}$)
BDPMA	toluène	540	1,008	$4,67 \pm 0,015$	100	4,67	0,75	16	0,53
	ACN	540	0,998	$5,34 \pm 0,018$	100	5,34	0,93	17,4	0,13
NPF	Eau	540	0,981	$4,5 \pm 0,052$	4	1,92	0,1	5,2	4,7
				$1,5 \pm 0,024$	16				
				$0,48 \pm 0,009$	43				
				$0,17 \pm 0,01$	37				
	Eau	580	0,984	$4,4 \pm 0,045$	5	2,05	0,1	4,8	4,4
				$1,6 \pm 0,02$	16				
Eau	750	1,038	$0,56 \pm 0,01$	41	2,32	0,1	4,3	3,9	
			$0,22 \pm 0,015$	38					
Eau	750	1,038	$4,7 \pm 0,074$	5	2,32	0,1	4,3	3,9	
			$1,87 \pm 0,007$	95					
Eau	750	1,038	$0,51 \pm 0,066$	- 15	2,32	0,1	4,3	3,9	
			$0,19 \pm 0,007$	- 85					

Tableau 7 : Résultats de l'étude de fluorescence résolue en temps sur la molécule de BDPMA et la NPF en solution.

Nous allons ensuite étudier l'existence possible de transferts d'énergie au sein des NPFs. Comme nous l'avons mentionné précédemment il est possible d'observer l'existence d'une migration efficace de l'énergie vers des espèces relaxant essentiellement de façon non radiative ou des espèces non fluorescentes (cation / anion).

II.3.4 Anisotropie de fluorescence résolue dans le temps

Dans le but d'observer la présence d'une dépolarisation de la fluorescence des molécules de BDPMA lors de transferts d'énergie, une étude d'anisotropie de fluorescence a été réalisée. Lorsque l'on excite une molécule fluorescente avec de la lumière polarisée linéairement, l'anisotropie de fluorescence notée r sera définie suivant l'équation (25), où VV et VH (position verticale (V) ou horizontale (H) des polariseurs) sont les intensités d'émission de fluorescence dont la polarisation est, respectivement, parallèle et perpendiculaire à la direction de la polarisation d'excitation et G est un facteur de correction d'intensité dépendant du système de mesure. La mesure d'anisotropie permet habituellement de caractériser la dépolarisation des molécules après une excitation sélective des molécules (leur dipôle de transition coïncide avec la polarisation du faisceau d'excitation) due à la diffusion brownienne rotationnelle des molécules dans un solvant. On ajuste les données avec une loi exponentielle et une anisotropie initiale (liée à l'angle entre

le dipôle de transition de l'absorption et d'émission) et un temps de corrélation rotationnel est déterminé.

$$r(t) = \frac{VV(t) - G \times VH(t)}{VV(t) + 2 \times G \times VH(t)} \quad \text{avec} \quad G = \frac{\int HV(t)dt}{\int HH(t)dt} \quad (25)$$

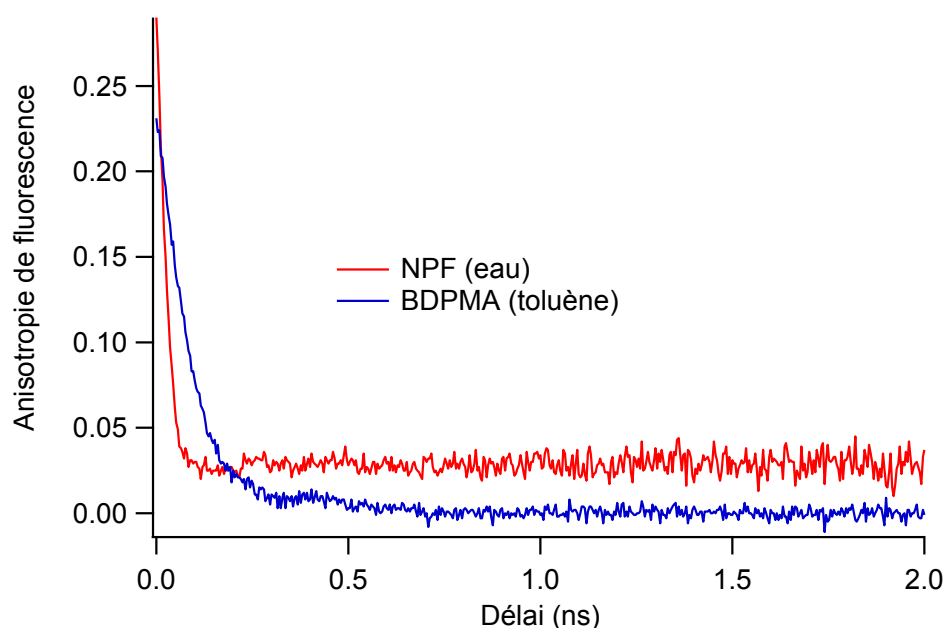


Figure 43 : Anisotropies de fluorescence résolues en temps de la molécule de BDPMA dans le toluène et de la NPF dans l'eau.

Les résultats de l'étude d'anisotropie de fluorescence résolue en temps de la molécule de BDPMA et de la NPF sont présentés **Figure 43** et **Tableau 8**. Les temps de corrélation rotationnels (τ) sont déterminés selon l'équation (26). Nous avons utilisé un ajustement sans déconvolution de la réponse instrumentale avec une valeur de G égale à 1,05, déterminé expérimentalement. Ce type d'ajustement ne nous permet pas d'être précis sur la valeur de l'anisotropie initiale. Le résultat obtenu sur le BDPMA montre une forte diminution de l'anisotropie de fluorescence en quelques centaines de picosecondes, pour atteindre une valeur proche de zéro. Un temps de corrélation rotationnel de 0,088 ns est déterminé pour le BDPMA dans le toluène. Dans le cas de la NPF, on s'attend à un temps de corrélation rotationnel plus long dû à la diffusion brownienne. Cependant on constate une diminution plus rapide de l'anisotropie de fluorescence avec un temps de corrélation rotationnel de 0,023 ns. Même si ce temps est à prendre avec précaution sachant qu'il est

dû même ordre de grandeur que la réponse instrumental (36 ps), il démontre qu'il existe un transfert d'exciton très rapide au sein des NPFs. De plus, contrairement au BDPMA, le déclin d'anisotropie des NPFs atteint un plateau après 0,1 ns avec une valeur non nulle (0,028). Le fait que le déclin d'anisotropie ne tombe pas à zéro nous montre que ces transferts d'énergie ne concernent pas l'ensemble des molécules contenues dans les NPFs. Cette stabilisation apparente est due au temps de corrélation rotationnel qui est beaucoup plus long que le déclin de fluorescence des NPFs

$$r(t) = r_0 \times \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (26)$$

Echantillon	r_0	τ (ns)	r_{inf}	χ^2
BDPMA	0,24	$0,088 \pm 0,005$	$0,0005 \pm 0,001$	1,09
NPF	0,33	$0,023 \pm 0,001$	$0,028 \pm 0,001$	1,08

Tableau 8 : Résultats de l'étude d'anisotropie de fluorescence résolue en temps (non déconvoluée) sur la molécule de BDPMA dans le toluène et la NPF dans l'eau.

Les résultats pour les NPFs nous donnent un déclin rapide caractéristique de l'existence de transferts d'énergie (migration d'énergie de type homo-FRET) non radiatifs entre les molécules de BDPMA au sein des NPFs. En assignant la vitesse du transfert par homo-FRET au temps de corrélation rotationnel déterminé par les mesures d'anisotropie résolue dans le temps, un R_0 de 4,7 nm qui a été déterminé à l'aide de l'équation (7) et des spectres stationnaires, avec $k = 0,476$ et $n = 1,53$ (toluène). Une distance intermoléculaire (R) de 1,9 nm a ensuite été calculée en utilisant l'équation (27).

$$R = \left(\frac{\tau_{anisotropie}}{\tau_{BDPMA} - \tau_{anisotropie}} \right)^{1/6} \times R_0 \quad (27)$$

Nous avons vu précédemment la présence d'espèces noires permettant l'apparition de phénomènes non radiatifs au sein des NPS et responsables de la perte du rendement quantique de fluorescence. Cela est en notre faveur car elles peuvent être à l'origine d'un état OFF (**Figure 44**).

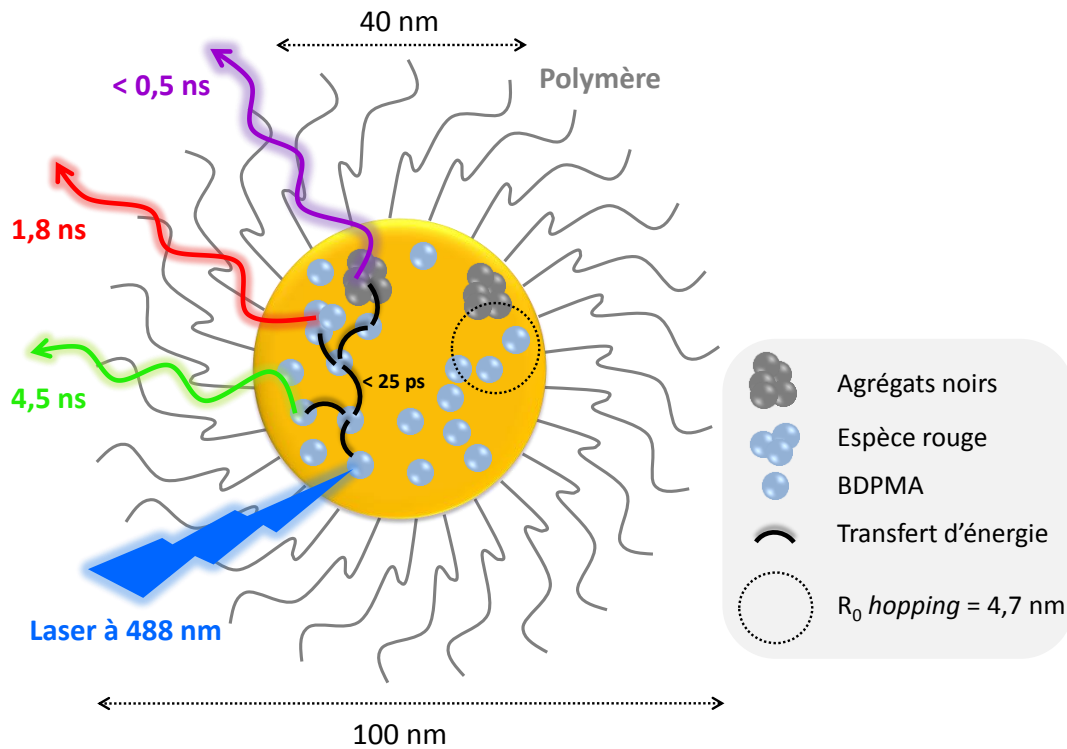


Figure 44 : Schéma d'une NPF représentant les transferts d'énergie interne de type homo-FRET se produisant après excitation.

Par la suite nous allons nous intéresser aux phénomènes ultrarapides qui peuvent avoir lieu à des temps inférieurs à 50 ps et aux transferts d'énergie entre plusieurs molécules excitées. En effet, en microscopie, les niveaux de puissance utilisés conduisent à l'existence de plusieurs molécules excitées par impulsion.

II.3.5 Absorption transitoire femtoseconde

II.3.5.1 Comparaison BDPMA et NPF

Afin de pouvoir observer plus en détails les phénomènes se produisant à l'échelle de la picoseconde, des études ont été réalisées en absorption transitoire femtoseconde, avec une résolution temporelle de l'ordre de 150 femtosecondes, estimée d'après le calcul de la FWHM du SRA (« *Stimulated Raman Amplification* ») estimée à 186 fs. Le grand nombre de molécules encapsulées favorise les interactions intermoléculaires pouvant induire des transferts d'énergie. Afin d'observer la formation de nouvelles espèces au sein des NPFs, la comparaison des spectres d'absorption transitoire femtoseconde (de 1 à 400 ps) de la molécule de BDPMA dans l'acétonitrile ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) et de la NPF dans l'eau ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$) est présentée **Figure 45**. L'énergie utilisée pour les NPFs est de 0,18 μJ . Pour cette énergie, une dizaine de molécules sur 5000 sont excitées ce qui limite les transferts d'énergie entre 2 molécules excitées au sein d'une NPF. La **Figure 45** nous permet de comparer la photodynamique d'une molécule en solution et au sein d'une NPF. D'après les études en spectroscopie stationnaire et d'émission résolue dans le temps, le toluène semble un choix pertinent mais celui-ci conduit généralement à l'observation d'un signal d'excimère du solvant qui recouvre le signal de la molécule étudiée. Les spectres d'absorption transitoire pour la molécule sont identiques en utilisant une excitation à 488 nm ou 400 nm. Les mesures à 400 nm permettent de mieux observer la bande de dépopulation et nous avons donc choisi de travailler à 400 nm pour les NPFs.

Dans les deux cas, juste après excitation à 0,7 picoseconde on observe une bande positive entre 330 nm et 450 nm et une bande négative entre 450 et 700 nm. La bande positive correspond à l'absorption de l'état singulet de BDPMA tandis que la bande négative est la somme de la bande dépopulation et d'émission stimulée de l'état S_0 . Pour les molécules de BDPMA dans l'acétonitrile (**Figure 45A**), le maximum de la bande négative est à 538 nm et pour les nanoparticules à 546 nm (**Figure 45B**), ce qui est en accord avec les spectres d'absorption stationnaire et d'émission de fluorescence. Après 0,7 ps les spectres d'absorption transitoire pour la molécule de BDPMA ne changent pas jusqu'à 400 picosecondes, ce qui est en accord avec la mesure du déclin de fluorescence mono-exponentiel (5,34 ns).

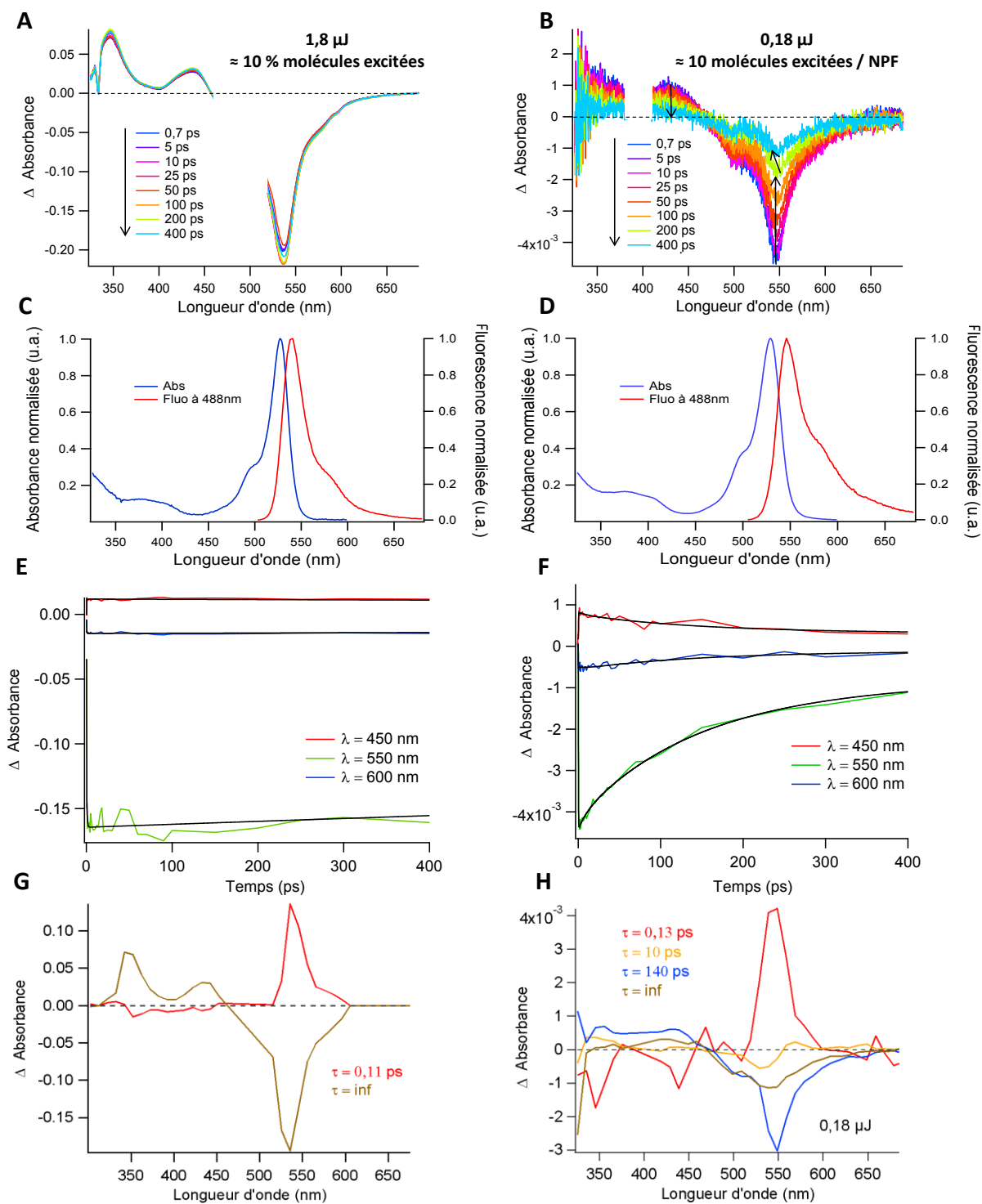


Figure 45 : spectres d'absorption transitoire femtoseconde (A) de la molécule de BDPMA dans l'acétonitrile après une excitation à 488 nm ($A_{488} = 0,31$) et (B) des NPFs dans l'eau après une excitation à 400 nm ($A_{400} = 0,18$). Les spectres d'absorbance et d'émission stationnaire, respectivement (C) et (D). Les déclin à 3 longueurs d'ondes différentes avec leur ajustement multi-exponentiel (noir), respectivement (E) et (F). Les spectres associés aux temps de déclin obtenus par analyse globale des déclin, respectivement (G) et (H).

Les évolutions temporelles de la variation d'absorbance tous les 10 nm ont été traitées par analyse globale, convoluée par une impulsion gaussienne de 186 fs. Pour chaque ajustement, un τ_{inf} fixe de 5,34 ns, correspondant au temps de vie d'émission de la molécule de BDPMA dans l'acétonitrile, a été imposé afin d'ajuster les modélisations. L'analyse globale des déclinés (**Figure 45E**) nous permet de déterminer une relaxation vibrationnelle dans l'état S_1 de 110 ± 10 fs (en rouge, **Figure 45G**). Dans le cas des NPFs, on remarque une relaxation rapide de l'état S_1 , avec une diminution de 80 % de la bande de dépopulation entre 0,7 et 400 ps. Un τ_{inf} fixe de 0,5 ns, correspondant au temps de vie moyen de la NPF sans la contribution du temps de l'excimère à 1,9 ns, a été imposé afin d'ajuster les modélisations. Il est nécessaire d'utiliser 3 exponentielles pour ajuster les déclinés et l'analyse globale des déclinés (**Figure 45F**) donne les 3 temps suivants (**Figure 45H**) : 130 ± 10 fs correspondant à la relaxation vibrationnelle dans l'état S_1 , $10 \pm 1,3$ ps (minoritaire) et 140 ± 12 ps (majoritaire). Le temps de 140 ps a déjà été observé lors des mesures de comptage de photons uniques. Le spectre associé au déclin de 10 ps (en jaune, **Figure 45H**) est caractéristique d'une relaxation vibrationnelle d'un état fondamental chaud (bande négative et positive centrée sur le minimum de la bande de dépopulation). La relaxation rapide de l'état S_1 conduit à la formation d'un état excité vibrationnellement qui se refroidit [144]. Par rapport aux mesures de déclinés de fluorescence, les mesures de spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde nous permettent de conclure que les molécules de BDPMA relaxent essentiellement de façon non radiative en quelques centaines de picosecondes. Nous n'observons donc pas de signal spécifique à la formation de l'espèce à 750 nm (déclin en 1,9 ns de la bande d'émission à 750 nm) qui est une espèce minoritaire.

II.3.5.1 Etude en fonction de l'énergie d'excitation (BDPMA)

Une étude en fonction de l'énergie d'excitation a été réalisée, permettant d'observer l'effet de l'augmentation du nombre de molécules excitées sur les phénomènes de désexcitations des molécules de BDPMA seules et au sein des NPFs. Le calcul du pourcentage de molécules excitées (M^*) lors des expériences a été déterminé suivant l'équation (28), avec E l'énergie du laser à la longueur d'onde d'excitation (en J), A l'absorbance à la longueur

d'onde d'excitation, C la concentration de la solution (mol.L-1), V le volume de l'échantillon irradié par le faisceau (L), Na le nombre d'Avogadro (mol-1), h la constante de Planck (J.s) et c la célérité (m.s-1).

$$M^* = \frac{E_{(\lambda_{exc})} \times (1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}) \times \lambda_{exc}}{C \times V \times Na \times h \times c} \quad (28)$$

On estime qu'une erreur d'environ 15% est faite sur le nombre de molécules excitées par NPFs, cette erreur provenant essentiellement sur la détermination du volume de solution excité par le faisceau laser femtoseconde de pompe. Les résultats pour BDPMA en solution dans l'acétonitrile ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$) obtenus pour des pourcentages de molécules excitées allant d'environ 1% à 10%, sont présentés **Figure 46A**. Aucun changement spectral n'est observé en fonction de la puissance d'excitation. On observe une relation linéaire entre l'absorbance et l'énergie d'excitation (**Figure 46B**). Les évolutions temporelles (de 1 à 400 ps par pas de 10 nm) ont été traitées en analyse globale, en tenant compte d'une impulsion gaussienne de 186 fs. Comme mentionné précédemment, pour chaque déclin, un τ_{inf} fixe de 5,34 ns, correspondant au temps de vie d'émission de la molécule de BDPMA dans l'acétonitrile, a été imposé afin d'ajuster les modélisations et nous avons retrouvé à chaque puissance un temps de montée d'une centaine de picosecondes associé à la relaxation vibrationnelle (**Tableau 9**).

Energie (μ J)	τ (ps)	Molécules excitées (%)
0,3	0,11 \pm 0,01	1,7
0,7	0,10 \pm 0,008	4,1
1,8	0,11 \pm 0,009	10,6

Tableau 9 : Evolution des temps caractéristiques obtenus par spectroscopie d'absorption en fonction de l'énergie d'excitation à 488 nm ($A_{488} = 0,31$).

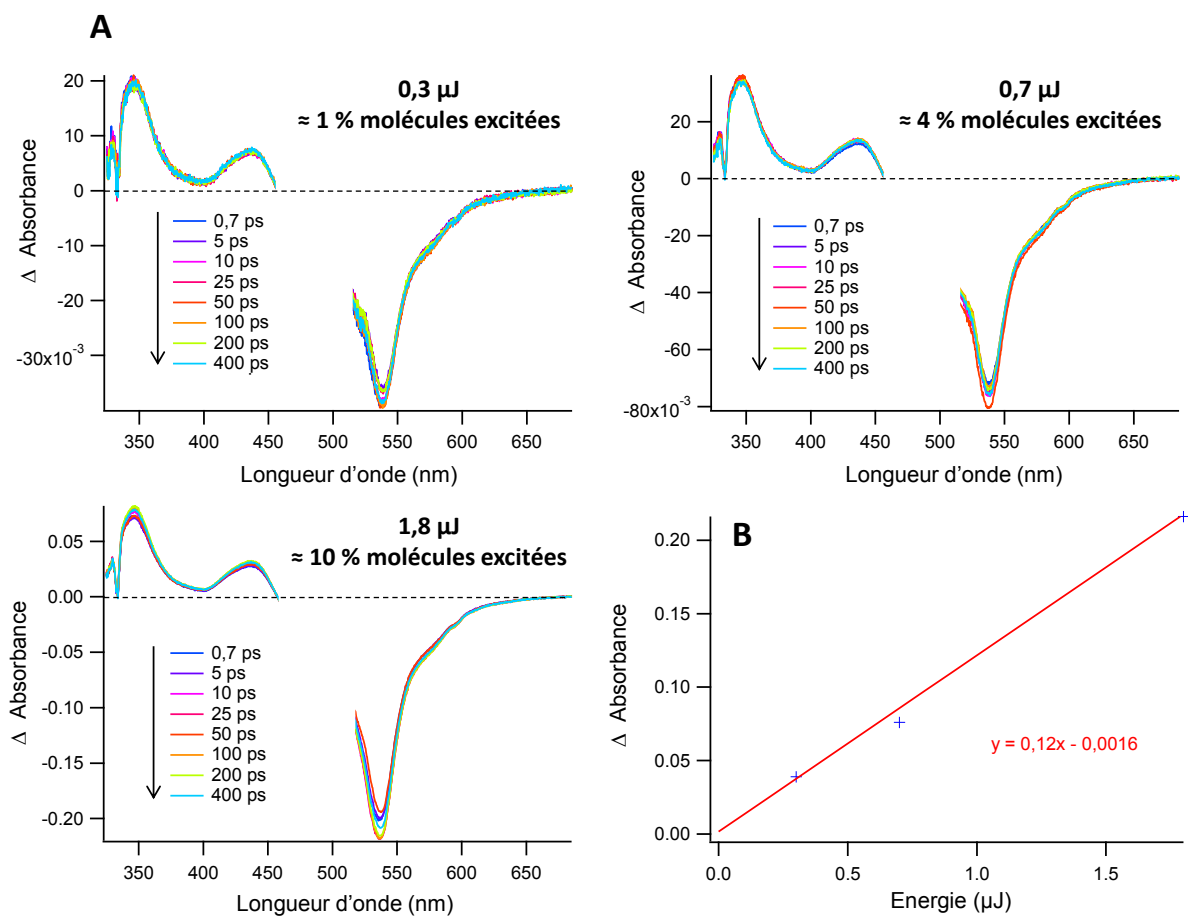


Figure 46 : (A) Spectres d'absorption transitoire femtoseconde de la molécule de BDPMA dans l'acétonitrile pour une excitation à 488 nm ($A_{488} = 0,31$), pour différentes énergies d'excitation. (B) Valeur absolue du maximum de la bande négative en fonction de l'énergie d'excitation à 488 nm.

II.3.5.1 Etude en fonction de l'énergie d'excitation (NPF)

L'étude de puissance sur la NPF en solution dans l'eau ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$) est présentée **Figure 47A**. Contrairement aux molécules de BDPMA en solution, la variation de l'énergie d'excitation fait apparaître des différences spectrales. On observe aussi une relation exponentielle entre l'absorbance et l'énergie d'excitation (**Figure 47B**), traduisant une saturation classique d'un processus mono-photonique [145].

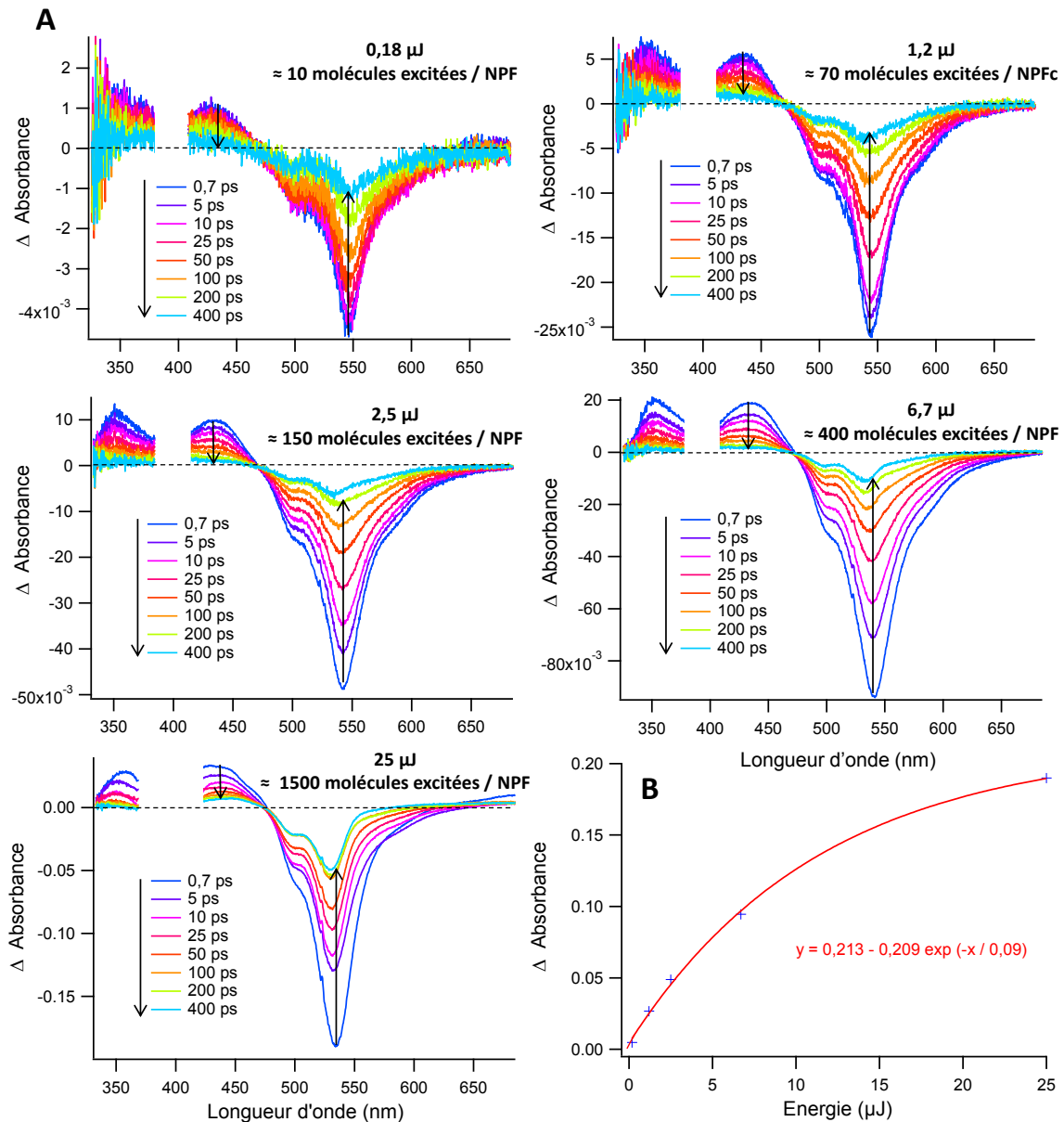


Figure 47 : (A) Spectres d'absorption transitoire femtoseconde de la NPF dans l'eau pour une excitation à 400 nm ($A_{400} = 0,18$), pour différentes énergies d'excitation. (B) Valeur absolue de l'absorbance maximum de la bande négative en fonction de l'énergie d'excitation à 400 nm.

A $t = 0,7$ ps, le minimum de la bande correspondant à la dépopulation de l'état S_0 et à l'émission stimulée se déplace vers le bleu avec l'augmentation de l'énergie d'excitation (voir **Tableau 10**). Ce déplacement hypsochrome est dû à la formation d'un état chaud, c'est-à-dire un état excité vibrationnellement, dans l'état fondamental. Cet état chaud se caractérise par une bande d'absorption positive avec un maximum déplacé vers le rouge par rapport au maximum de la bande de dépopulation [144].

Energie (μ J)	0,18	1,2	2,5	6,7	25
$\lambda_{\min} \Delta$ ABS à 0,7 ps (nm)	546	544	542	540	535
$\lambda_{\min} \Delta$ ABS à 400 ps (nm)	541	539	537	535	530

Tableau 10 : Evolution du maximum de la bande négative du spectre des NPFs, à $t = 0,7$ ps et 400 ps, en fonction de l'énergie d'excitation (en μ J).

On observe également qu'après la disparition de plus de 80% à 400 ps le spectre transitoire est caractérisé par une bande de dépopulation qui se déplace vers le bleu. Ce décalage est plus important et à lieu plus rapidement lors d'une excitation à une énergie de 25 μ J, voir **Figure 48**, ce qui confirme que ce déplacement de bande est dû à une relaxation vibrationnelle dans l'état fondamental. En effet plus l'excitation est élevée, plus le retour vers l'état fondamental est rapide avec une formation plus importante d'espèces chaudes.

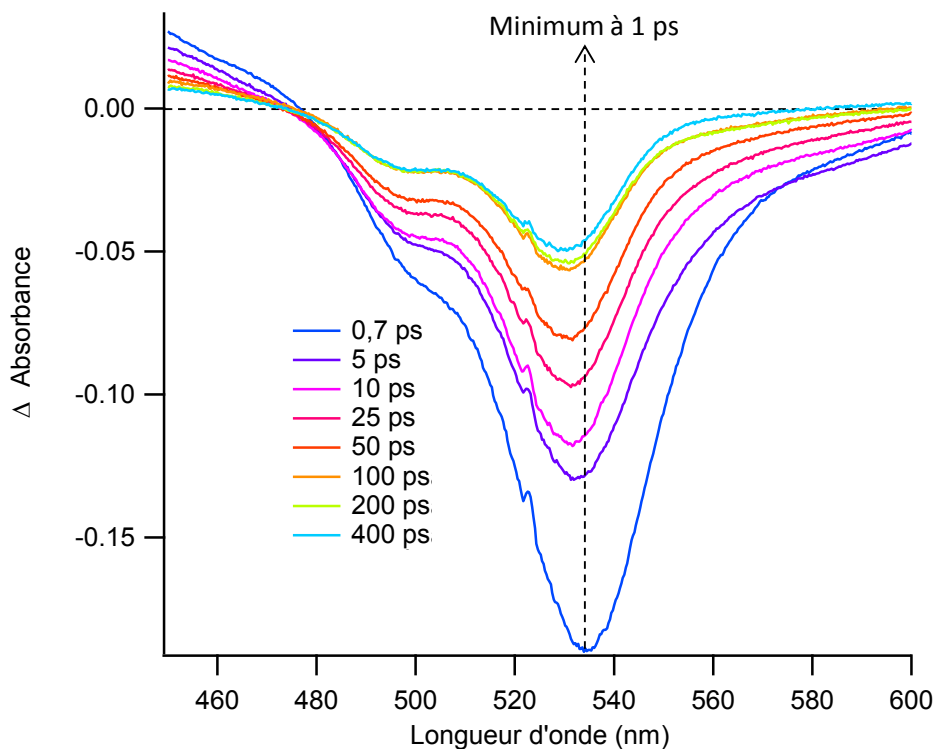


Figure 48 : Spectres d'absorption transitoire femtoseconde de la NPF dans l'eau pour une excitation à 400 nm d'énergie 25 μ J ($A_{400} = 0,18$). Observation du déplacement du maximum de la bande négative au cours du temps.

Si l'on observe maintenant l'effet de l'énergie d'excitation sur l'évolution des déclin de la bande $S_1 \rightarrow S_n$ (**Figure 49**), on remarque que plus on augmente la puissance d'excitation, plus le déclin est rapide. L'augmentation de la puissance va augmenter le nombre de molécules excitées présentes au sein des NPs et il sera de plus en plus probable d'obtenir des phénomènes de migration (transfert d'énergie de type Förster). Notre hypothèse est que, le nombre de molécule excitées plus les phénomènes de migrations vont conduire à augmenter la probabilité d'avoir une interaction entre 2 molécules à l'état excité, de type singulet-singulet. Ce type d'interaction va provoquer le retour à l'état fondamental pour une des deux molécules et le passage dans un état excité d'ordre supérieur (S_n avec $n > 1$) pour l'autre (Figure 7, **Chapitre I**).

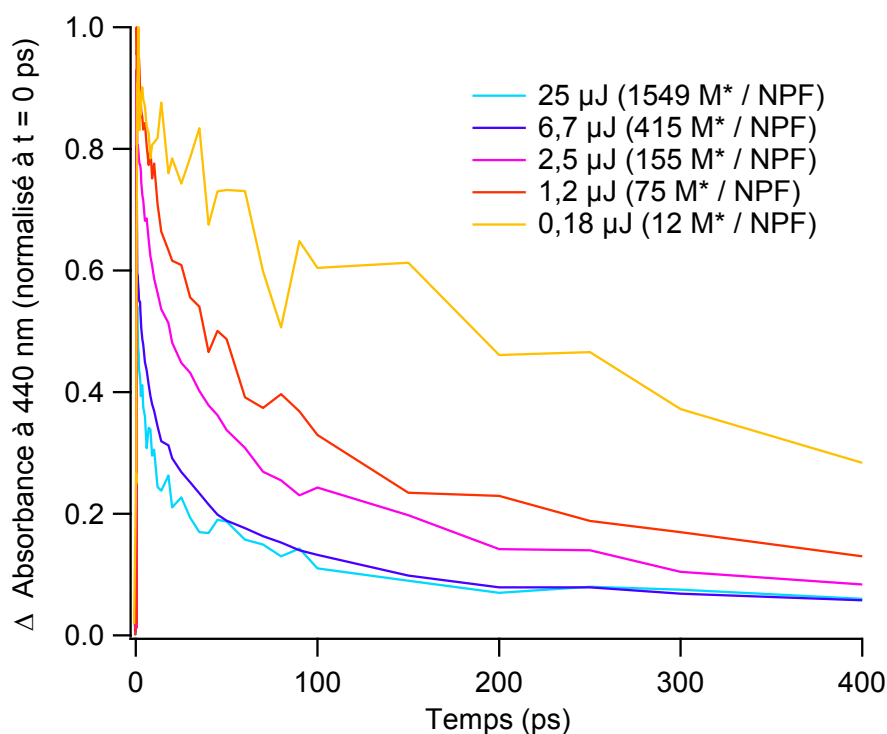


Figure 49 : Absorbance normalisée en fonction du temps pour les déclin à 440 nm (bande $S_1 \rightarrow S_n$) pour différentes énergies d'excitation ($A_{400} = 0,18$).

Les déclin (de 1 à 400 ps) tous les 10 nm ont été traités en analyse globale, convolués par une impulsion gaussienne de 186 fs. Pour chaque déclin, un τ_{inf} fixe de 0,5 ns, correspondant au temps de vie moyen de la NPF sans la contribution du temps à 0,17 ns qui a été imposé afin d'ajuster les modélisations. En effet lors de la modélisation des puissances de 0,18 à 6,7 μJ , un temps long d'environ 156 ± 18 ps a été trouvé. Cependant, l'étude réalisée en absorption transitoire ne comporte que 4 points entre 100 et 400 ps donc sa précision n'est pas très robuste. Ce temps est proche du temps de 170 ps déterminé par les mesures de temps de vie de fluorescence à 540 nm. La modélisation multi-exponentielle pour chaque énergie a permis de déterminer les différents temps caractéristiques de relaxation de l'état S_1 , voir **Tableau 11**. Comme lors de l'étude de la molécule de BDPMA, on retrouve pour chaque puissance le temps de montée de $0,12 \pm 0,02$ ps (en rouge **Tableau 11**). Il est donc attribué à une relaxation vibrationnelle de l'état S_1 .

Energie (μJ)	Molécules excitées par NPF	τ (ps)	τ à 540 nm (% amplitude)
0,18	≈ 10	0,13 \pm 0,01 10 \pm 1,3 170	- 17 83
1,2	≈ 70	0,11 \pm 0,005 22 \pm 0,6 170	- 49 50
2,5	≈ 150	0,14 \pm 0,002 5,7 \pm 0,24 32 \pm 1,4 170	- 26 44 30
6,7	≈ 400	0,13 \pm 0,002 4,6 \pm 0,13 26 \pm 1 170	- 39 37 24
25	≈ 1500	0,12 \pm 0,009 1,53 \pm 0,13 26 \pm 1	- 60 40

Tableau 11 : Etude en analyse globale des spectres d'absorption transitoire femtoseconde de la NPF dans l'eau. Evolution des temps de vie en fonction de l'énergie d'excitation à 400 nm ($A_{400} = 0,18$).

L'analyse des spectres associés aux déclins pour les 4 plus fortes énergies d'excitation (**Figure 50**) montre que le temps court autour de 27 ps (en vert, **Tableau 11**) est relativement constant. On l'associe ce temps caractéristique à la relaxation vibrationnelle d'une espèce chaude dans l'état fondamental. On remarque aussi l'apparition d'un temps caractéristique de quelques picosecondes dont la valeur diminue et la contribution augmente avec l'augmentation de l'énergie d'excitation. L'augmentation importante de la contribution nous permet d'attribuer ce temps au phénomène d'annihilation singulet-singulet. La diminution de la valeur de ce temps est logique car l'augmentation du nombre de molécules excitées au sein d'une NPF va également tendre à diminuer la distance séparant les molécules entrant dans des transferts de type annihilation singulet-singulet, augmentant ainsi la vitesse de ces transferts.

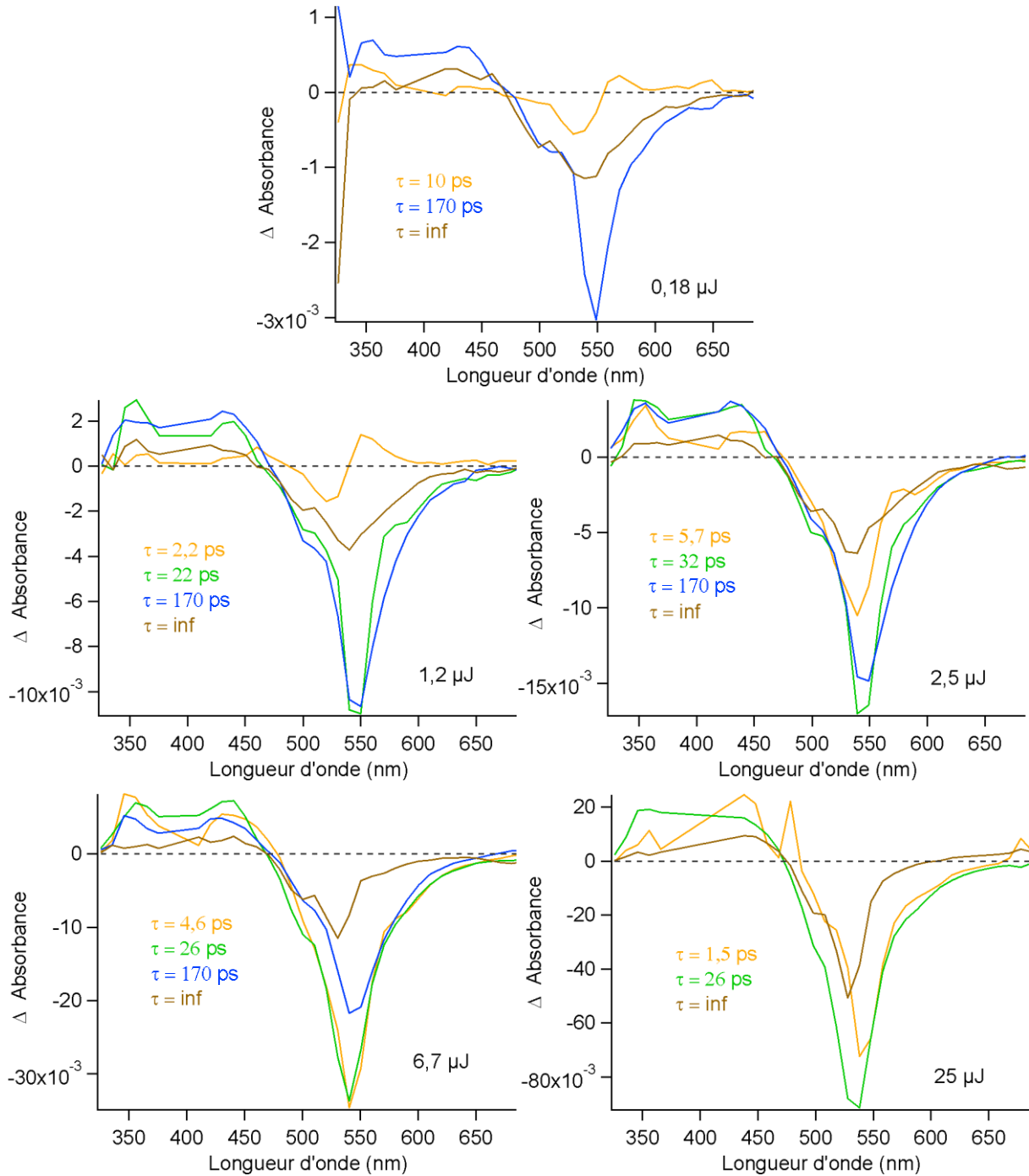


Figure 50 : Evolution du poids des temps de déclin en fonction des longueurs d'ondes pour les différentes énergies d'excitation à 488 nm ($A_{400} = 0,18$).

Afin de confirmer la présence d'un phénomène d'annihilation singulet-singulet, une analyse des déclin d'absorption transitoire des NFPs pour les différentes énergies d'excitation a été effectuée en utilisant l'équation (29), modélisant le phénomène d'annihilation [146] avec Abs l'absorbance transitoire, Na le nombre d'Avogadro, τ le temps

de déclin à l'état fondamental en l'absence d'annihilation, ϵ le coefficient d'extinction molaire, d le chemin optique et γ la constante d'annihilation.

$$\frac{1}{\text{Abs}(t)} = \left(\frac{1}{\text{Abs}(0)} + \frac{Na \times \gamma \times \tau}{\epsilon \times d} \right) \times \exp\left(\frac{t}{\tau}\right) - \frac{Na \times \gamma \times \tau}{\epsilon \times d} \quad (29)$$

Pour les déclin à 440 nm (bande d'absorption S_1-S_n), les courbes $1 / \text{Abs} = f(\exp(t / \tau))$ ont été tracées pour chaque puissance d'excitation avec $\tau = 0,54$ ns, représenté **Figure 51**. Ce temps de déclin a été calculé en prenant la moyenne pondérée par l'amplitude des temps déterminés lors de la mesure par comptage de photons uniques.

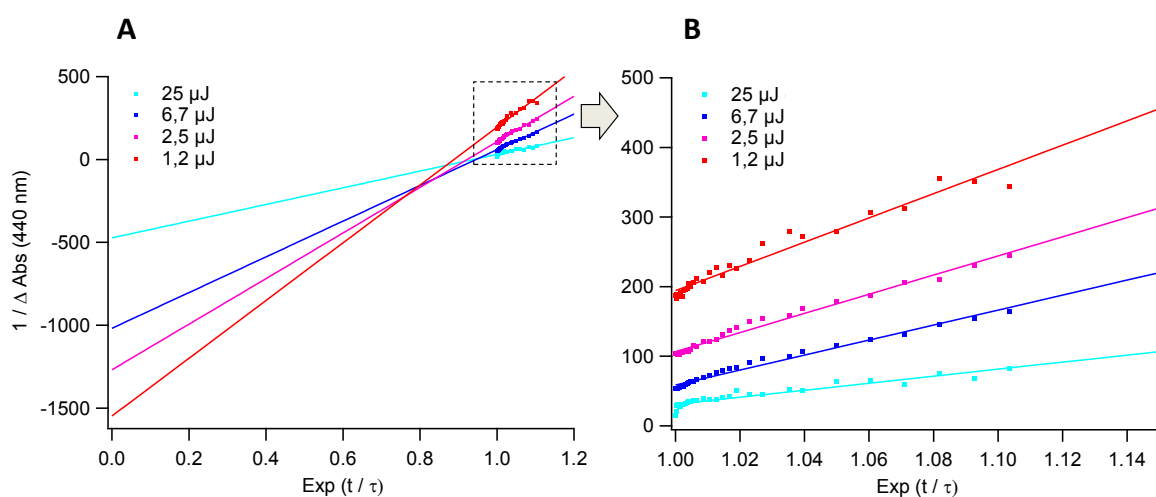


Figure 51 : (A) Tracé de $1 / \text{Abs} = f(\exp(t / \tau))$ pour chaque énergie d'excitation. (B) agrandissement de la zone encadrée en pointillés sur (A).

On note que l'ajustement par une droite est de plus en plus correct lorsque l'énergie augmente. Ceci confirme l'existence de phénomènes annihilation singulet-singulet qui vont exister lorsque la concentration en molécules excitées augmente. D'après les valeurs des ordonnées à l'origine obtenues, il est possible de calculer la constante d'annihilation γ pour chaque puissance, reportée **Tableau 12**. La constante d'annihilation pour la plus forte puissance ($\gamma = 4,5 \times 10^{-10} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) est proche des valeurs trouvées dans la littérature [146]. Ceci coïncide avec le fait que pour la plus forte puissance, la relaxation de l'état S_1 se fait essentiellement par annihilation singulet-singulet.

Energie (μJ)	0,18	1,2	2,5	6,7	25
γ ($10^{-10} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$)	-	15,6	12,3	9,7	4,5

Tableau 12 : constante d'annihilation en fonction de l'Energie d'excitation à 400 nm ($A_{400} = 0,18$).

Un R_0 d'annihilation peut également être déterminé. Pour cela, il est nécessaire de calculer le spectre d'absorbance de l'état S_1 (**Figure 52**). On utilise le spectre d'absorption transitoire en solution à 1 ps que l'on corrige de la contribution de la bande de dépopulation (on connaît le nombre de molécules excitées et le spectre d'absorbance stationnaire) et de l'émission stimulée (spectre de fluorescence multiplié par λ^4 et normalisé). Cela nous permet de calculer un R_0 de 8,9 nm en utilisant l'équation (7). Une distance intermoléculaire (R) de 2,7 nm a ensuite été déterminée en utilisant l'équation (27). Cette distance est proche de celle déterminée avec le temps caractéristique de la migration de type homo-FRET ($R = 1,9 \text{ nm}$), ce qui confirme la grande proximité des molécules de BDPMA au sein de la NPF.

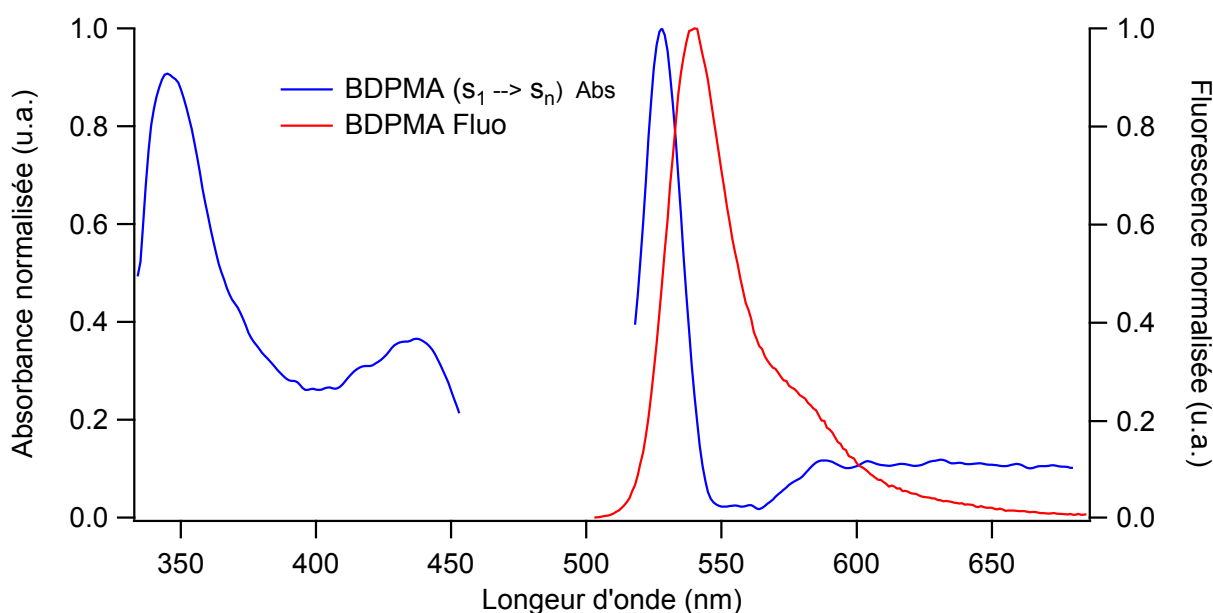


Figure 52 : Spectres d'absorption de l'état excité S_1 (bleu) et spectre de fluorescence de l'état stationnaire (rouge) de la molécule de BDPMA dans l'acétonitrile.

II.4 Conclusion

L'ensemble des mesures en solution nous a permis de montrer que la perte de rendement quantique était due à une relaxation rapide de façon non radiative des molécules de BDPMA au sein des NPFs. Nous avons aussi pu montrer que les molécules de BDPMA étaient assez proches (1 - 2 nanomètres) ce qui conduit à l'existence d'agrégats non émissifs, une migration d'énergie efficace sur des échelles temporelles de quelques dizaines de picosecondes et à l'annihilation singulet-singulet avec un temps caractéristique de quelques picosecondes (**Figure 53**). L'annihilation singulet-singulet dépend de la distance entre chaque molécule et de la concentration en molécules excitées.

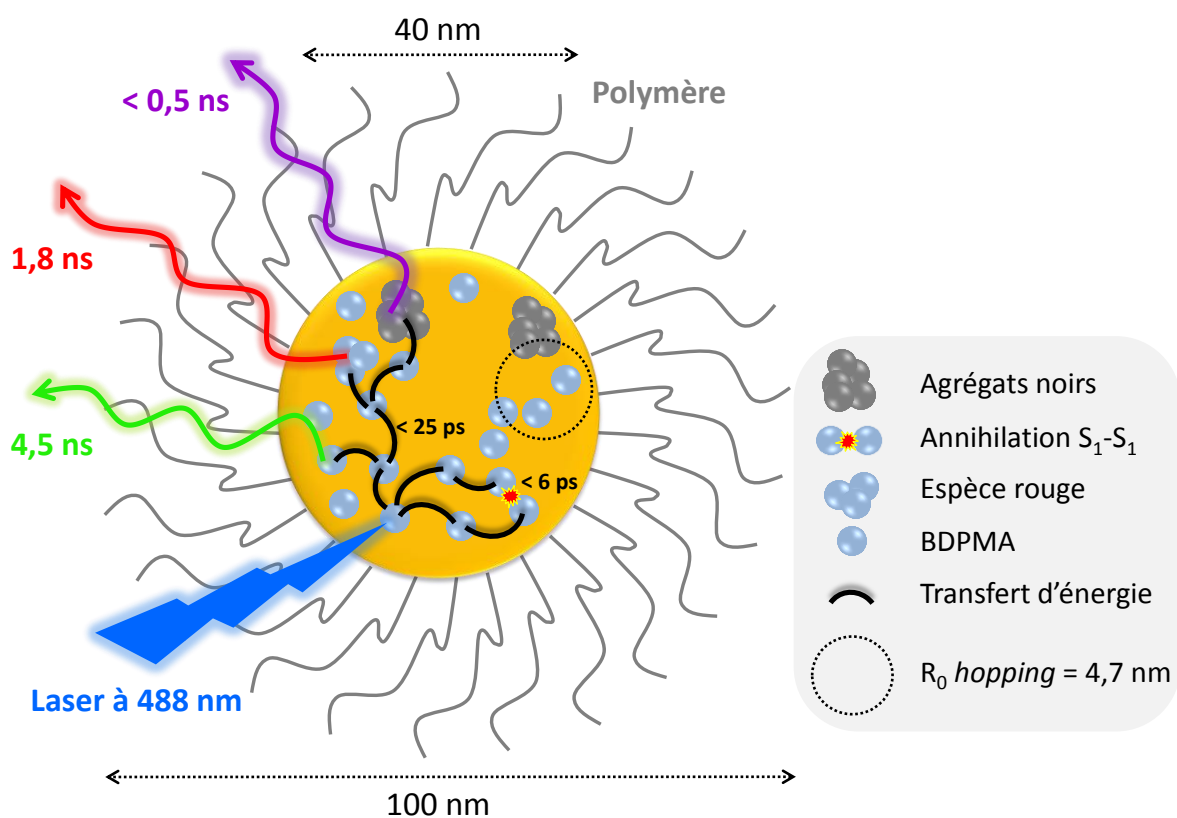


Figure 53 : Schéma d'une NPF représentant les transferts d'énergie interne de type homo-FRET se produisant après excitation.

L'ensemble de ces mesures nous permettent de déterminer un mécanisme global de la relaxation de l'état S_1 des molécules de BDPMA au sein des NPFs. La relaxation sub-nanoseconde rapide est interprétée par l'existence d'agrégats et de l'annihilation singulet-singulet. L'annihilation singulet-singulet va permettre la formation d'espèces S_n qui sont plus sensibles à la photodégradation et donc à la formation d'espèces noires. Le transfert d'énergie par homo-FRET va conduire à la migration de l'énergie vers des agrégats relaxants de façon non radiative ou la formation d'espèces noires.

Chapitre III Caractérisation des NPFs par spectroscopie de particules uniques

III.1 Introduction

La propriété de clignotement d'une sonde permet sa utilisation en imagerie de super-résolution. La présence ou non d'un état OFF caractérisé par l'extinction complète de la fluorescence influencera le choix de la méthode de traitement d'images. L'objectif est, tout d'abord, d'observer en microscopie de fluorescence résolue en temps si les NPFs peuvent clignoter et, d'autre part, de regarder si ces clignotements sont liés à la présence de transferts d'énergie interne, décrits dans le chapitre précédent et caractérisés par des temps inférieurs à 100 picosecondes.

Dans ce chapitre je commencerai par présenter la réalisation du montage de microscopie de fluorescence résolue en temps. Ensuite, comme nous avons montré que les déclins d'émission des nanoparticules dépendent de la puissance d'excitation, nous avons réalisé une étude d'intensité et des temps de vie de fluorescence en particules uniques, en fonction de la puissance d'excitation. Différentes puissances ont été choisies afin d'exciter chaque fois un nombre différent de molécules au sein des nanoparticules.

III.2 Conditions expérimentales

III.2.1 Solvants

L'eau a été obtenue via un appareil de purification Purelab classic (ELGA) afin de posséder une résistivité de 18,2 M Ω .cm à 25 °C. L'ensemble des solvants organiques utilisés pour la préparation et l'analyse des échantillons sont de qualité spectroscopique et ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

III.2.2 Préparation des échantillons

Afin de réaliser des expériences de particules uniques en microscopie de fluorescence résolue en temps, les nanoparticules doivent être immobilisées. Pour cela les NPFs ont été dispersées dans un film de PVA (Polyvinyl alcohol) (concentration pM pour avoir moins d'une nanoparticule dans un volume limité par la diffraction, 1 μm^3) déposé par spin coating sur une lamelle en verre de microscope (épaisseur de 170 micromètres). Nous avons choisi le PVA sachant que celui-ci est un polymère soluble dans l'eau. Les films ont été obtenus à partir de solutions (50/50) contenant des NPFs dans l'eau à très faible concentration (pM) mélangées à du PVA (4% en poids). Elles ont ensuite été déposées en utilisant un spin-coater Spin150 de marque SPS (Semiconductor Production Systems, paramétré sur une accélération de 300 tours par seconde et une vitesse maximale de 3000 tours par seconde pour un temps total d'une minute) sur une lamelle de microscope 24 x 24 mm préalablement nettoyée. L'étape de lavage est une étape primordiale car elle permet de visualiser les NPF et non des impuretés.

III.2.3 Source laser femtoseconde

La source laser utilisée est la même que pour l'étude de fluorescence résolue en temps en solution (excitation à 488 nm, 200 fs, 4 MHz), voir partie **II.2.5**.

III.2.4 Microscope de fluorescence résolue en temps

Le montage de microscopie de fluorescence résolue en temps est le seul à ne pas avoir été opérationnel à mon arrivée au laboratoire. Une étape de développement a donc été nécessaire.

Le montage expérimental de microscopie de fluorescence résolue en temps est représenté **Figure 54**. L'acheminement du faisceau laser collimaté du SHG vers le microscope a été réalisé avec des miroirs Argent de diamètre 25,4 mm, dont la réflexion est optimisée pour le domaine du visible et du proche infrarouge. Un périscope est placé directement en sortie du SHG (488 nm, 4 MHz) afin de relever le faisceau jusqu'à une hauteur de 193 mm, nécessaire à l'injection dans le microscope. Ensuite un agrandisseur de faisceau, composé de 2 lentilles convergentes de focale $F_1 = 40$ mm et $F_2 = 250$ mm permet de faire passer le diamètre du faisceau de 1,5 mm à 9,4 mm. L'agrandissement est nécessaire afin que la taille de faisceau du laser recouvre totalement la pupille de l'objectif utilisé (7,5 mm). Des diaphragmes sont disposés avant et après le télescope optique pour constituer des références d'alignement et fixer la taille du faisceau avec une distribution d'intensité homogène.

Le faisceau passe ensuite au travers d'un compensateur de Berek. Le compensateur de Berek permet de contrôler la polarisation pour une large gamme de longueur d'onde du faisceau laser à l'aide d'une lame demi-onde et quart d'onde placées dans un même système optique. Lors des expériences, une polarisation circulaire a été choisie afin d'exciter le maximum de molécules au sein des nanoparticules.

Le faisceau laser est ensuite injecté dans le microscope. Le microscope utilisé est un microscope inversé de type IX 71 de chez Olympus. L'injection du laser se fait par l'arrière et un miroir dichroïque permet de réfléchir le faisceau laser d'excitation vers l'objectif qui focalise le faisceau (**Figure 55**). Pour collecter un maximum d'émission un objectif x 100 à immersion, d'ouverture numérique 1,40 est utilisé. La fluorescence émise est collectée par le même objectif (épifluorescence) et passe à travers le miroir dichroïque. Le miroir dichroïque réfléchit le laser et laisse passer la fluorescence émise. La fluorescence est ensuite focalisée par la lentille de tube. Un miroir permet d'avoir une sortie latérale gauche à 100%. Le microscope est également équipé d'une table piézoélectrique de marque Physik Instrumente, permettant de réaliser un balayage de l'échantillon dans les trois dimensions

avec une précision de 2 nm. Le miroir dichroïque utilisé lors des mesures est un U-MWB2 (500 nm) de marque Olympus équipé d'un filtre d'excitation 460 - 490 nm et d'un filtre d'émission passe-haut à 520 nm (**Figure 55**).

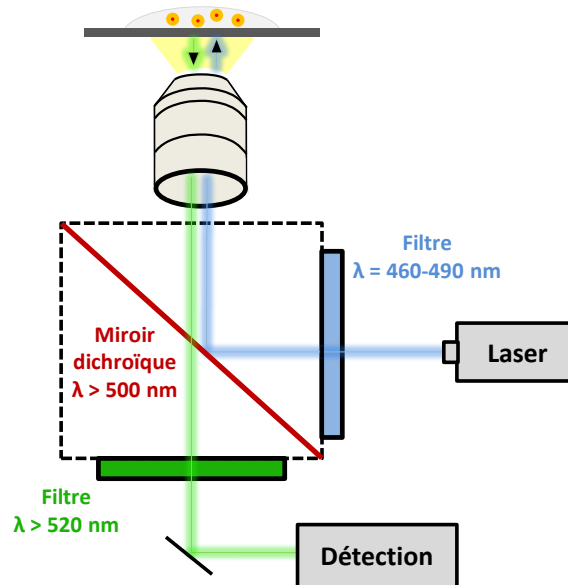


Figure 55 : schéma du système miroir dichroïque + filtres.

Un diaphragme de 100 μm de diamètre est placé au point focal de la lentille de tube. Le but de ce filtre spatial est d'améliorer la résolution axiale en z en ne laissant passer que l'émission au point focal. Derrière le diaphragme est positionnée une lentille convergente $F_3 = 75$ mm afin d'obtenir un faisceau collimaté. Une lentille convergente $F_4 = 150$ mm permet ensuite la focalisation du faisceau sur une photodiode à avalanche (APD) qui a une ouverture de 50 micromètres et une réponse instrumentale temporelle de 50 ps (**Figure 56**). L'APD est ensuite reliée au système d'acquisition PicoHarp 300 de marque PicoQuant.

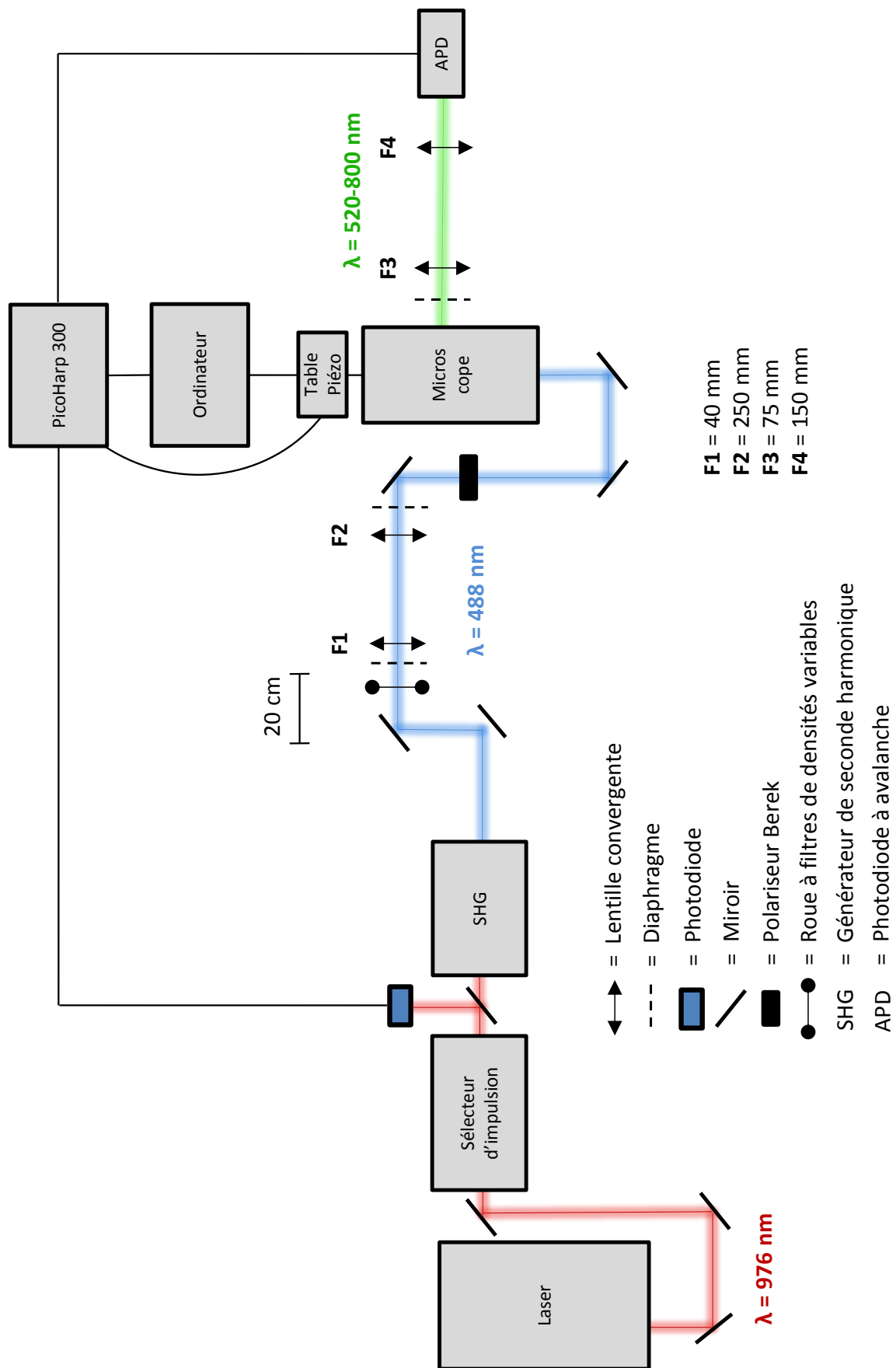


Figure 56 : Schéma du montage de microscopie de fluorescence résolue en temps.

III.2.5 Caractérisation du microscope confocal

La résolution spatiale axiale et latérale du microscope confocal a été caractérisée en mesurant la diffusion du faisceau laser d'excitation (488 nm) par des nanoparticules d'or de diamètre 100 nm

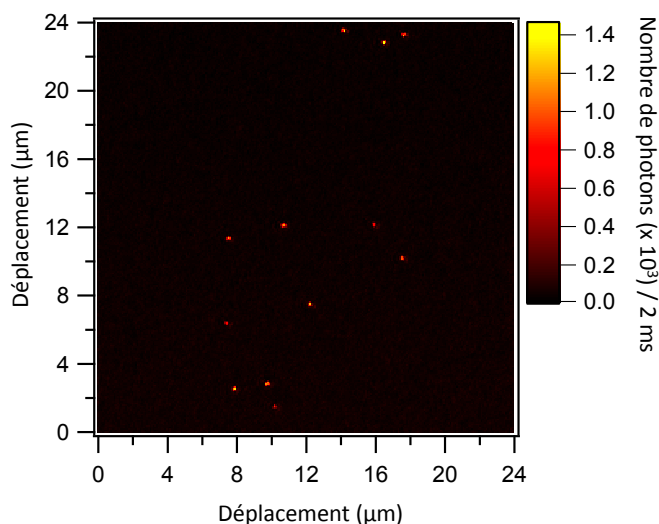


Figure 57 : Image xy de nanoparticules d'or. L'échelle de couleur représente le nombre de photons. Image de 128 x 128 pixels, taille de pixel de 190 nm et temps d'acquisition de 2 ms par pixel.

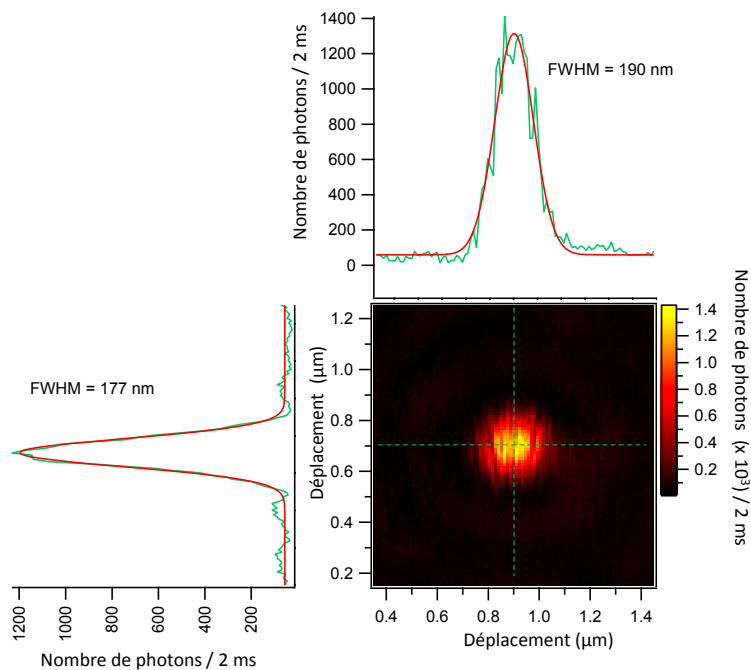


Figure 58 : Image selon les axes xy d'une nanoparticule d'or. Détermination de la FWHM de la PSF. L'échelle de couleur des images représente le nombre de photons. Image de 128 x 128 pixels, taille de pixel de 19 nm et temps d'acquisition de 2 ms par pixel.

Une caractérisation de la réponse instrumentale pour la mesure des temps de vie a également été effectuée. J'ai comparé la réponse instrumentale obtenue pour la réflexion du laser avec celle obtenue pour l'érythrosine B dans l'eau qui a un temps de vie de $0,089 \pm 0,003$ ns, proche des limites de résolution de l'APD (50 ps). On peut observer **Figure 59**, que l'IRF et le déclin TCSPC de l'érythrosine B sont très proches. Un temps de vie de $0,079 \pm 0,01$ ns est déterminé grâce à une modélisation mono-exponentielle ($\chi^2 = 1,132$). Ce résultat nous montre que le montage permet la détection de temps de vie supérieur à 50 ps.

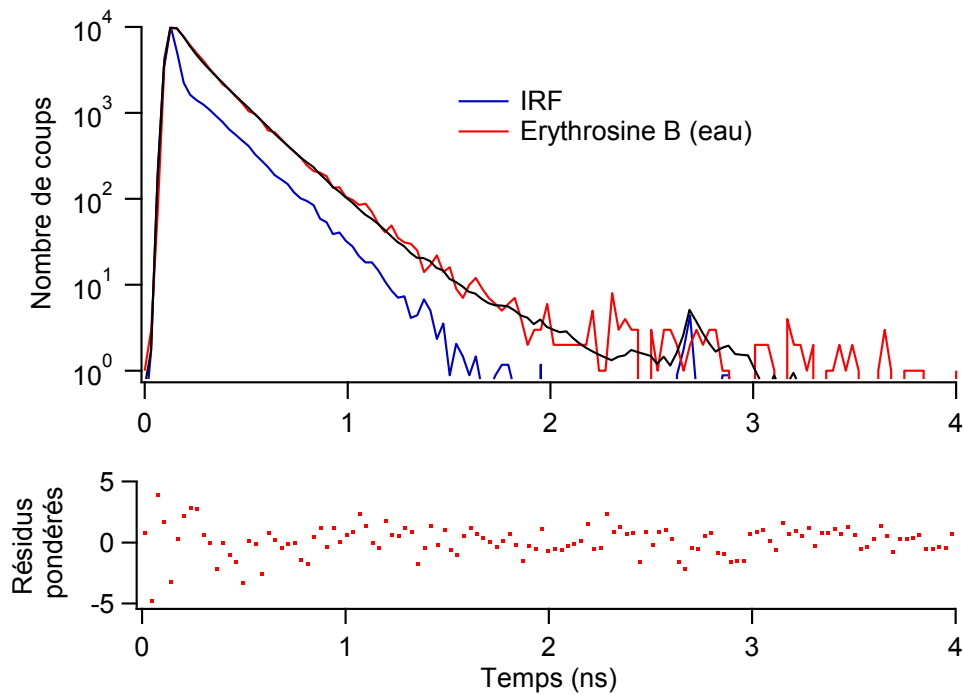


Figure 59 : Déclin de fluorescence de l'érythrosine B dans l'eau avec une excitation à 488 nm.

III.3 Etude par spectroscopie de particules uniques de l'émission des NPFs

III.3.1 Observation des NPFs uniques

Les NPFs doivent être étudiées une à une en microscopie de fluorescence résolue en temps. On peut voir **Figure 60**, une image de fluorescence des NPFs dispersées au sein d'un film de PVA, obtenue avec une puissance de 5 nW au niveau de l'échantillon. Une faible puissance a été choisie pour réaliser les images afin de ne pas photodégrader les NPFs.

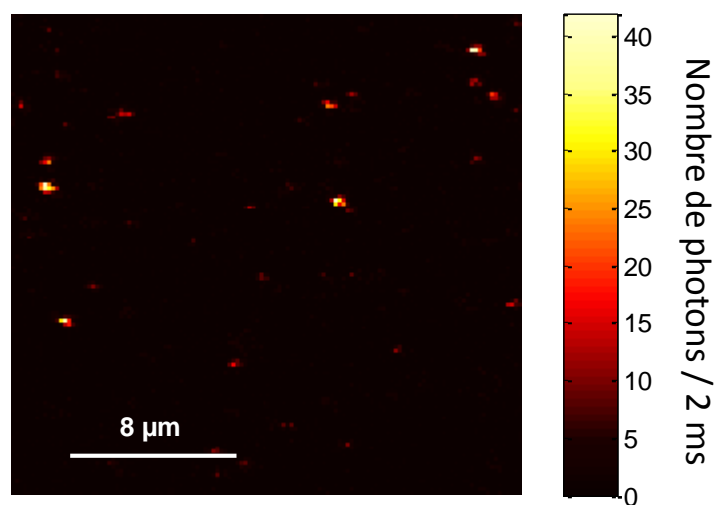


Figure 60 : Image de fluorescence des NPFs. 128 x 128 pixels, une taille de pixel de 190 nm, une puissance laser de 5 nW et un temps d'exposition de 2 ms par pixels.

Le microscope confocal nous permet d'exciter les NPFs individuellement dans un volume limité par la diffraction et donc de réaliser, contrairement à l'étude en solution, une étude de l'émission particule par particule en fonction de la puissance d'excitation. Des puissances d'excitation de 0,01 μW, 0,1 μW, 1 μW et 10 μW ont été choisies de manière à exciter respectivement environ 1, 10, 130 et 1300 BDPMA par NP par impulsion laser. Le calcul du pourcentage de molécules excitées (M^*) lors des expériences a été déterminé suivant l'équation (32), avec P la puissance du laser à la longueur d'onde d'excitation (en J.s⁻¹), $\sigma_{(\lambda_{exc})}$ la section efficace de la NPF à la longueur d'onde d'excitation, F la fréquence du laser (en Hz) et r le rayon de la PSF du montage expérimental (en cm).

$$M^* = \frac{P_{(\lambda_{exc})} \times \sigma_{\lambda_{exc}} \times \lambda_{exc}}{3,14 \times r^2 \times F \times h \times c} \quad (30)$$

On estime qu'une erreur d'environ 15% est faite sur le nombre de molécules excitées par NPFs, cette erreur provenant essentiellement de la détermination de la section efficace des nanoparticules. Les traces de 50 particules ont été enregistrées pour chaque puissance. Les temps d'acquisition ont varié de 1 à 3 minutes. Les déclin de TCSPC ont été enregistrés en collectant un nombre suffisant de photons sur 4096 canaux de 8 ps chacun.

III.3.2 Evolution de l'intensité en fonction du temps

Sur la totalité des courbes d'évolution de l'intensité (nombre de photons mesurés pendant 5 ms) en fonction du temps, soit 50 traces sur 4 puissances différentes, seulement 2 types de fluctuation d'intensité au cours du temps ont été observés, voir **Figure 61**. Le premier (type 1) montre la photodégradation rapide de la nanoparticule (en rouge, **Figure 61A**). Cela se traduit par une perte importante d'intensité de fluorescence en moins de deux secondes pour atteindre un plateau de faible intensité. Les fluctuations de type 2 montrent une photodégradation rapide suivie d'une faible augmentation de l'intensité de fluorescence (en bleu, **Figure 61A**) avant de diminuer vers un plateau de faible intensité.

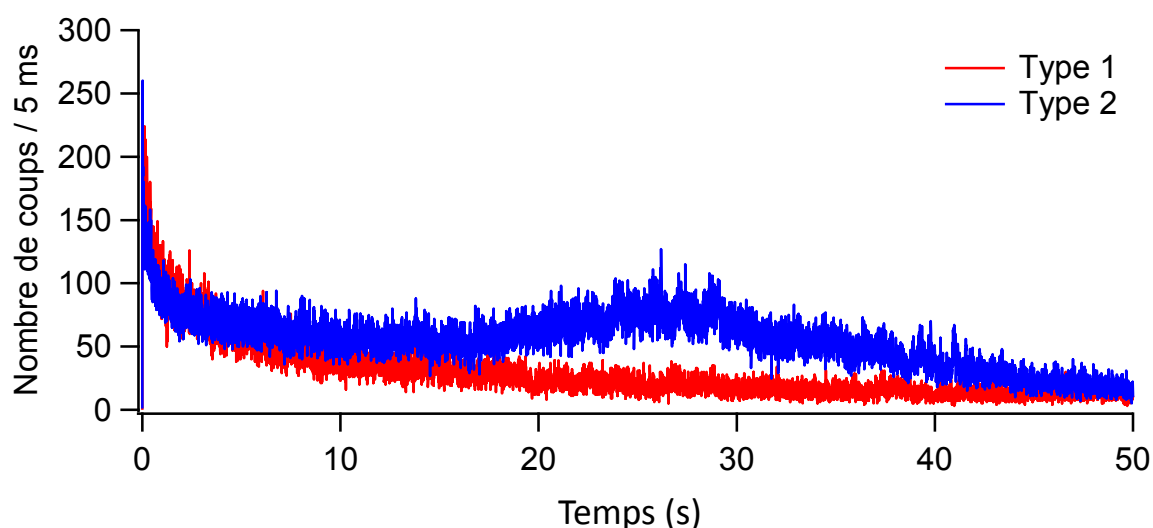


Figure 61 : Comparaison des deux types de fluctuation d'intensité observés lors de l'étude des NPFs en particule unique, réalisé à 1 μ W.

L'observation des types de trace 1 ou 2 dépend fortement de la puissance d'excitation utilisée, voir **Tableau 13**. On remarque que les évolutions de type 2 sont très présentes à faible puissance, et peu présentes à forte puissance.

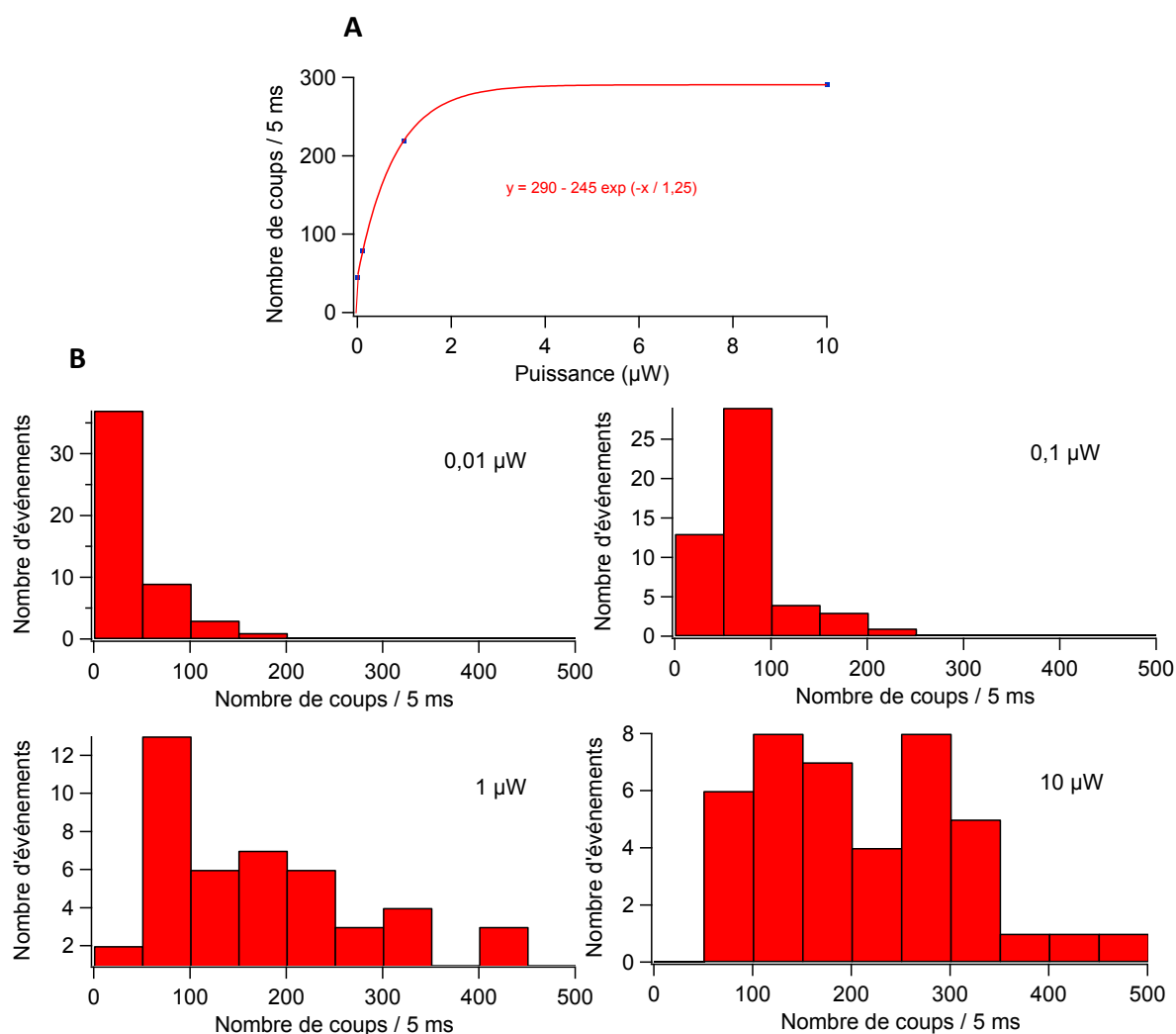


Figure 62 : (A) intensités moyennes, à $t = 0$ seconde, pour chaque puissance. (B) Distribution des intensités à $t = 0$ pour l'ensemble des NPFs mesurées à différentes puissances. Pas de l'histogramme de 50 coups / 5 ms.

Nous nous sommes également intéressés aux variations d'intensités en fonction de l'énergie d'excitation. Dans un premier temps, les intensités à $t = 0$ s pour les NPFs ont été mesurées, voir **Figure 62B**. On remarque, **Figure 62A**, que l'intensité initiale suit une loi classique de saturation mono-photonique Une intensité maximum est atteinte vers $4 \mu\text{W}$ pour 520 molécules excitées par NPFs. Nous avons également voulu déterminer la photostabilité des NPFs en fonction de l'énergie d'excitation, en calculant le rapport entre

l'intensité de fluorescence à 1 min et égale zéro (**Tableau 13**). Les résultats montrent que toutes les énergies induisent une photodégradation des molécules. A plus faible énergie, environ 66 % de l'intensité initiale est perdue au bout de 1 minute. Pour les 3 autres énergies, la perte est supérieure à 90%. Cette faible photostabilité est un facteur limitant. Cependant, de par le nombre important de molécules au sein des BDPMA, le nombre de photons collectés après 1 minute reste suffisant pour pouvoir imager les NPFs.

Energie (μW)	BDPMA excitées par NPF	$I_{1 \text{ min}} / I_0$	Type 1	Type 2
0,01	1,373	$0,34 \pm 0,081$	3	47
0,1	13,73	$0,093 \pm 0,011$	10	40
1	137,3	$0,077 \pm 0,016$	39	11
10	1373	$0,041 \pm 0,013$	45	5

Tableau 13 : Type de traces observées en fonction de la puissance d'excitation.

En regardant attentivement les courbes d'intensité en fonction du temps, on a l'impression que l'intensité de fluorescence fluctue. Lorsque maintenant on retrace les variations d'intensité avec une résolution temporelle de 30 ms, on observe l'existence de clignotements ainsi qu'une forte photodégradation exponentielle pour les puissances élevées (**Figure 63**). Le choix de 30 ms est lié à l'acquisition d'image qui est limitée à 33 ms pour les caméras EMCCD (« *Electron-Multiplied Charge Coupled Device* »). La **Figure 63** nous montre donc l'évolution de l'intensité d'une NPF pour 200 images lors de mesures de microscopie en champ large, à différentes puissances.

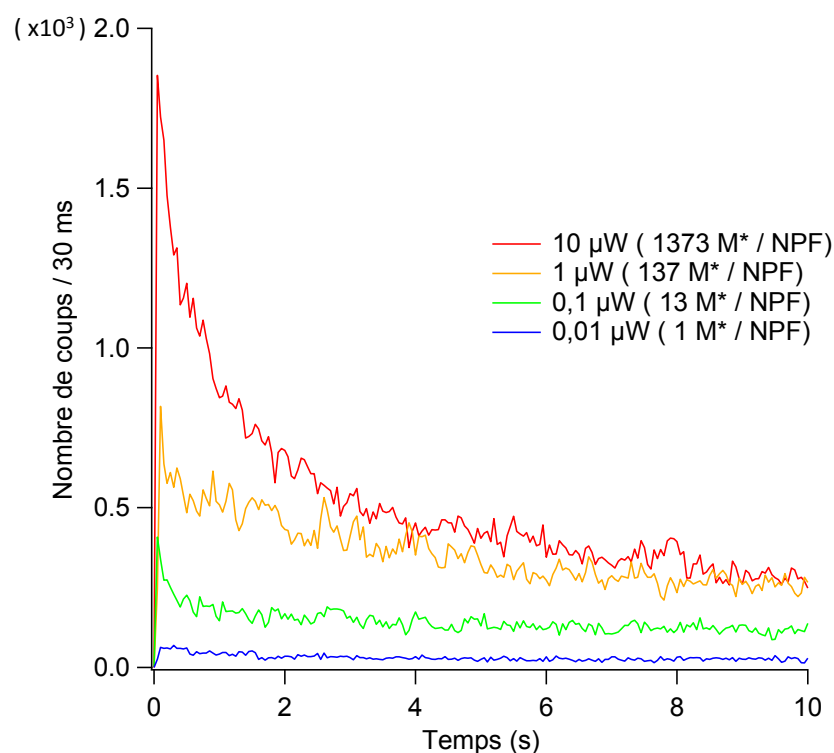


Figure 63 : Observation des fluctuations d'émission de fluorescence au cours du temps (type 1) en fonction de la puissance d'excitation. Chaque point représente un nombre de photons sur 30 ms.

Si l'on regarde plus attentivement, aucune variation significative n'est observée sur l'intensité mesurée avec une excitation de 0,01 μW , correspondant à 1 molécule excitée par NPFs (en bleu). Par opposition, les 3 autres évolutions montrent du photo-clignotement. Celui-ci semble de plus en plus rapide lorsque le nombre de molécules excitées augmente. Nous liions donc ces fluctuations à l'existence de l'annihilation singulet-singulet et à la migration de l'énergie au sein des NPFs. Ce clignotement ne permet pas d'éteindre complètement la fluorescence des NPFs et implique l'utilisation de méthodes permettant de travailler en haute densité et sur les fluctuations du signal (type SOFI). Le choix de la puissance doit se faire pour avoir à la fois des clignotements de grande amplitude et une photodégradation la plus faible possible. Les deux dernières puissances, 0,1 et 1 μW , montrent une faible photodégradation dans la première seconde de la trace puis un niveau d'intensité relativement stable jusqu'à la fin. La principale différence se fait sur l'importance de la variation d'intensité. La puissance de 1 μW ($1 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$) semble être la mieux adaptée pour envisager d'acquérir des images en microscopie champ large super-résolue. Pour mieux comprendre l'origine de ces clignotements, nous proposons d'étudier les temps de vie pour chaque NPF.

III.3.3 Temps de vie

Afin de mieux comprendre la dynamique de ces 2 types de traces, une étude des déclin de fluorescence (TCSPC, avec 8 ps par canal), en faisant la somme totale des photons collectés (3 minutes) obtenus sur chaque NPF, a été réalisée. Chaque déclin de fluorescence a été modélisé par une fonction à 4 exponentielles et reconvolué par la réponse instrumentale (IRF laser). Les temps caractéristiques obtenus sur 50 déclin par puissances sont représentés par 5 valeurs moyennes allant de quelques picosecondes jusqu'à quelques nanosecondes. Les différents τ_i ainsi que les temps de vie moyen, en amplitude et en intensité, sont présentés dans le **Tableau 14**.

Energie (μW)	BDPMA excité par NP	τ en intensité (ns)	τ en amplitude (ns)	τ_i (ns)	τ_i (% amplitude)	χ^2
0,01	1,373	$1,08 \pm 0,02$	$0,398 \pm 0,008$	$0,01 \pm 0,003$ $0,1 \pm 0,007$ $0,53 \pm 0,03$ $1,83 \pm 0,14$ $3,9 \pm 0,3$	72 55 20 9 4	1,038
0,1	13,73	$2,05 \pm 0,02$	$0,453 \pm 0,009$	$0,014 \pm 0,002$ $0,066 \pm 0,002$ $0,46 \pm 0,03$ $1,82 \pm 0,13$ $4,6 \pm 0,2$	70 60 13 7 6,5	1,058
1	137,3	$1 \pm 0,03$	$0,104 \pm 0,005$	$0,011 \pm 0,001$ $0,06 \pm 0,003$ $0,46 \pm 0,02$ $2,16 \pm 0,13$ $4,3 \pm 0,2$	78 33 5 2 2,5	1,068
10	1373	$1,23 \pm 0,05$	$0,194 \pm 0,009$	$0,018 \pm 0,003$ $0,063 \pm 0,005$ $0,46 \pm 0,03$ $1,85 \pm 0,12$ $4,2 \pm 0,3$	74 50 8 2 1,6	1,039

Tableau 14 : Résultats de la modélisation des déclin TCSPC en particule unique des NPFs dans un film de PVA. Evolution des temps de vie en fonction de la puissance laser (488 nm).

On constate que les temps de vie τ_i obtenus sont les mêmes pour chaque puissance. On retrouve trois temps similaires à ceux obtenus lors de l'étude des NPFs en solution (environ 0,5 ns, 2 ns et 4,3 ns). On note également la présence de temps très courts d'environ 15 et 60 ps (**Figure 64**). Ces deux derniers temps sont à prendre avec précaution, étant donné qu'ils sont à la limite de résolution du montage expérimental (50 ps).

Cependant, on remarque que la majorité du déclin a lieu pendant ces temps de quelques dizaines de picosecondes. Ce résultat est en accord avec les mesures par spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde, où l'on a constaté une perte de la bande de dépopulation de plus de 80% en 400 ps.

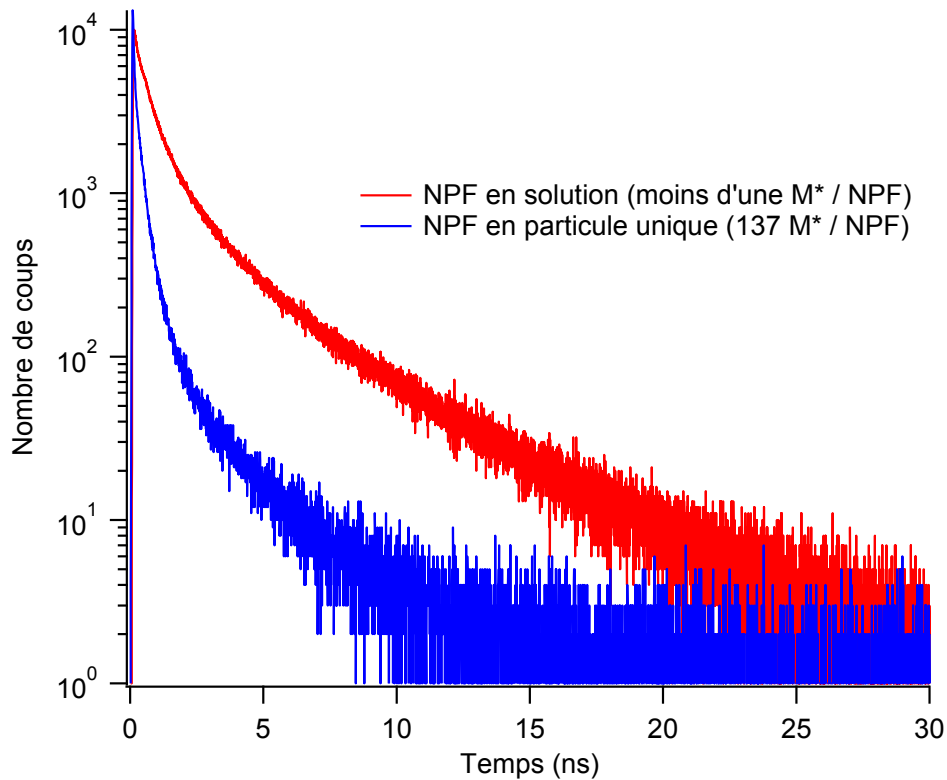


Figure 64 : Comparaison des déclin TCSPC des NPFs en solution (rouge) et en particule unique pour une énergie de $1 \mu W$ (bleu).

Afin de voir l'effet de la puissance d'excitation sur les déclin de fluorescence des NPs, on peut voir **Figure 65** la représentation graphique des distributions des différents τ_i obtenus pour les 50 nanoparticules mesurées.

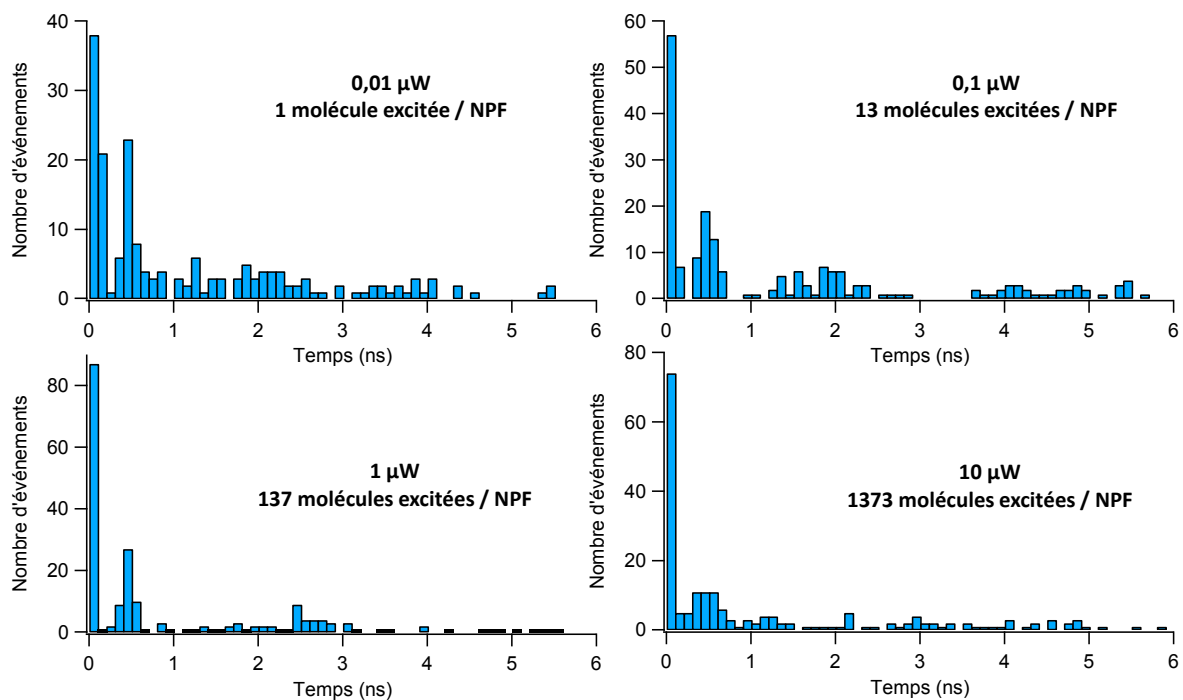


Figure 65 : Histogrammes représentant les différents τ obtenus lors de la modélisation multi-exponentielle des déclins TCSPC de particules uniques à différentes puissances (pas de 100 ps).

On constate une augmentation de 50 % du nombre de temps de vie sous les 100 ps en passant de 0,01 à 0,1 μW et une augmentation d'environ 40 % en passant de 0,1 à 1 μW , ce qui implique une diminution du nombre de temps de vie longs (> 3 ns). Cela coïncide également avec l'étude femtoseconde, mettant en évidence l'apparition de temps courts avec l'augmentation de la puissance, correspondant à des transferts d'énergie interne de type annihilation singulet-singulet entre molécules de BDPMA (voir **Figure 66**). La faible présence de temps long nous informe également sur la prépondérance des transferts d'énergie de type homo-FRET (migration). Ceux-ci se terminent par une espèce noire, rendant peu probable l'apparition de l'émission de fluorescence d'une molécule seule (4,6 ns). En revanche, malgré le plateau de puissance atteint à 10 μW , on remarque qu'il reste toujours quelques temps longs. Ceci peut être dû à l'inhomogénéité de répartition des molécules au sein des NPFs, localisées préférentiellement en périphérie du cœur des NPFs, qui va conduire à la présence de molécules isolées au centre, mais également au fait que la photodégradation détruit un grand nombre de molécules, réduisant ainsi la densité de molécule et conduisant à l'apparition de molécules isolées.

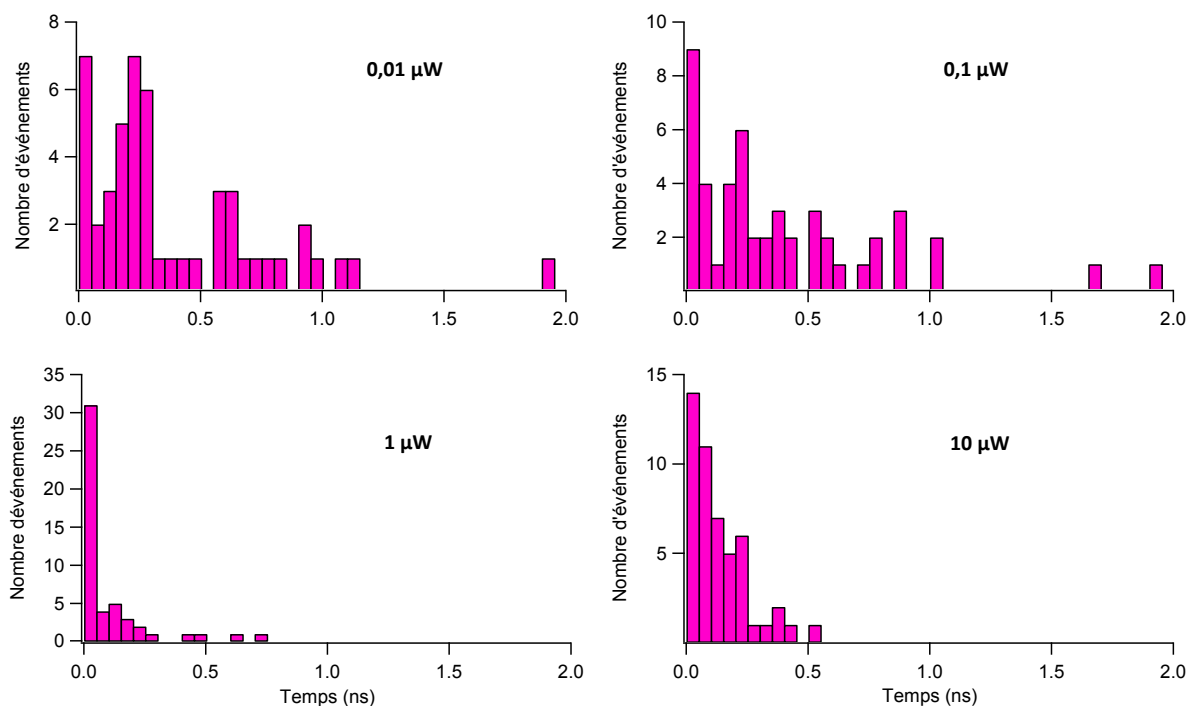


Figure 66 : Histogrammes représentant les différents τ moyens en amplitude (pas de 50 ps) obtenus lors de la modélisation des déclin TCSPC de particules uniques pour différentes puissances.

Dans le but de comparer le temps de vie en fonction du temps pour les traces de type 1 et 2, une étude TCSPC sur des parties spécifiques des deux types de traces a été réalisée, voir **Figure 67**. Les déclin TCSPC obtenus sur la partie de photodégradation ainsi que ceux obtenus sur la partie de faible intensité ont été analysés et les résultats sont présentés respectivement **Figure 67B** et **C**.

Les deux types de traces présentent un déclin de fluorescence rapide et multi-exponentiel, pendant les 15 premières secondes. On notera une diminution légèrement plus rapide dans les premières 200 – 300 ps pour la trace de type 1 (rouge). En revanche, la différence devient significative lors de l'analyse des 35 dernières secondes des traces, comprenant l'augmentation d'intensité de la trace de type 2. La trace de type 1 affiche un déclin rapide de fluorescence semblable à celui observé dans la partie de photodégradation, au contraire, la trace de type 2 est modélisée par un déclin quasi mono-exponentiel et très long comparé à la trace de type 1. Les déclin ont par la suite été modélisés par des fonctions mono ou multi-exponentielles.

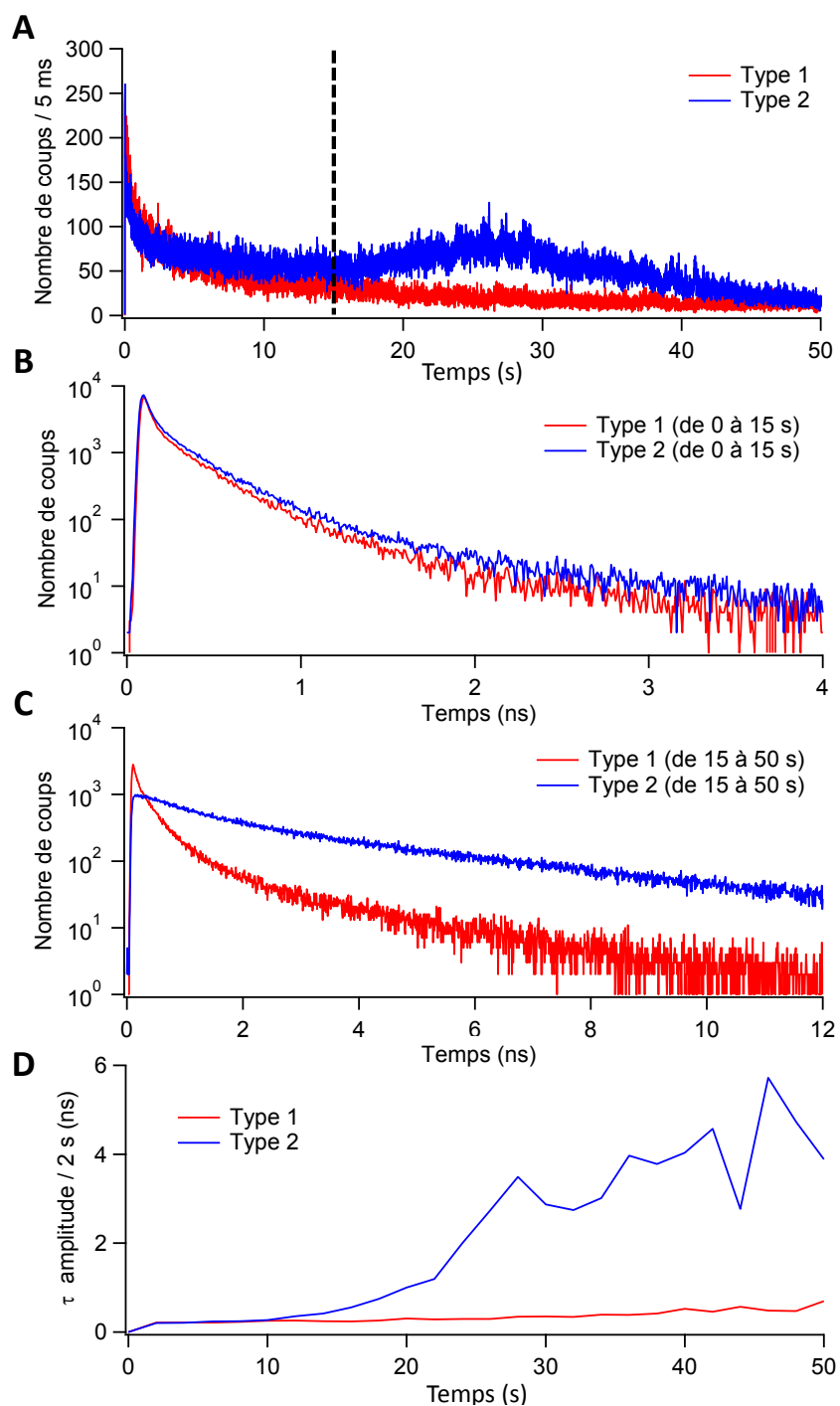


Figure 67 : Comparaison des deux types de traces observées lors de l'étude des NPFs en particules uniques. (A) Les deux traces au cours du temps. Leur déclin de fluorescence en TCSPC sur les 15 premières et les 35 dernières secondes respectivement (B) et (C). (D) Variation du temps moyen en amplitude au cours du temps. Traces réalisées à $1 \mu W$.

Pour la trace de type 1, on trouve des temps de $0,011 \pm 0,004$ ns, $0,06 \pm 0,008$ ns et $0,52 \pm 0,038$ ns (similaires à ceux décrits lors de l'étude globale **Tableau 14**) sur les 15 premières secondes. Un temps supplémentaire de $2,1 \pm 0,14$ ns correspondant au temps

attribué précédemment aux agrégats de BDPMA, est trouvé pour le déclin des 35 dernières secondes. Aucun temps autour de 4,5 ns, correspondant au comportement de la molécule seule en solution, n'est observé.

Pour la trace de type 2, pendant les 15 premières secondes on observe sensiblement les même temps que la trace de type 1. En revanche, pour le déclin des 35 dernières secondes, une fonction mono-exponentielle suffit à déterminer un temps de $4,5 \pm 0,1$ ns ($\chi^2 = 1,01$), correspondant au temps de la molécule de BDPMA seule en solution. L'apparition de ce temps long est également très largement observable sur **Figure 67D** par l'augmentation du temps de vie moyen en amplitude de la trace de type 2 (bleu). On constate une forte augmentation du temps de vie vers 15 s, moment où l'intensité de fluorescence arrête de décroître (**Figure 67A**, trace 2). La différence principale entre les traces de type 1 et de type 2 est donc l'apparition du temps de vie de la molécule seule au détriment des temps courts entre 0,01 et 0,5 ns. L'apparition du temps de vie de la molécule de BDPMA suppose que la photodégradation partielle des molécules au sein de la particule (à faible puissance), a conduit à isoler spatialement des molécules.

III.4 Conclusion

L'étude de puissance permet l'observation de temps de vie courts ($< 0,1$ ns) avec l'augmentation de la puissance d'excitation laser à 488 nm. Ces temps montrent bien la présence de transferts d'énergie interne de type homo-FRET, engendrant la migration de l'énergie d'excitation à travers les molécules de BDPMA et conduisant à de l'annihilation singulet-singulet ou se terminant par une espèce noire (ex. agrégats). La relaxation non radiative des molécules au sein des NPFs provoquée par l'annihilation singulet-singulet et les espèces noires est responsable de la diminution du rendement quantique de fluorescence. De plus, deux types de traces ont été observés sur l'ensemble des échantillons, indépendamment de la puissance d'excitation. La différence principale entre ces deux types est l'apparition du temps de la molécule seule en solution autour de 4,5 ns pour les fluctuations de type 2. Le fait que le type 2 soit très largement majoritaire pour les faibles puissances (0,01 et 0,1 μ W) est logique, car la photodégradation des molécules au sein des particules est plus faible, conduisant à l'apparition d'un nombre important de molécules isolées spatialement. De plus, ces puissances induisent une faible probabilité d'obtenir deux molécules excitées proches spatialement. Le type 2 reste cependant observable à forte puissance car, malgré une photodégradation très importante, l'inhomogénéité de répartition des molécules au sein des NPFs, localisées préférentiellement en périphérie du cœur de la NPF, va conduire à la présence de molécules isolées au centre du cœur hydrophobe.

D'autre part, la saturation de l'intensité de fluorescence à $t = 0$ s, observée pour la plus forte puissance, coïncide avec la proximité de l'ensemble des résultats entre les puissances 1 et 10 μ W. Les temps de vie moyens les plus courts ont été trouvés pour la puissance à 1 μ W car la photodégradation y est moins importante en comparaison avec la puissance à 10 μ W. Cela permet une meilleure observation des transferts d'énergie.

Enfin, des fluctuations dans l'émission de fluorescence des NPFs, causées par la migration de l'énergie vers des espèces noires et l'existence de l'annihilation singulet-singulet, pourraient permettre leur utilisation en imagerie de super-résolution dans le cadre d'une analyse par une méthode de haute densité basée sur l'étude des fluctuations de signal.

Chapitre IV Traitement d'images fluorescentes de haute densité

IV.1 Introduction

L'analyse d'images en haute densité est un domaine en pleine évolution. De nombreuses méthodes ont été développées permettant d'analyser des images de densité égale à 15 molécules. μm^{-2} . Cependant, mis à part les méthodes de traitement statistique du signal comme SOFI, il existe peu de techniques capables de traiter des images dans des conditions de densité supérieure. C'est pourquoi, nous proposons une nouvelle méthode de traitement appelée MAPPIX (MAPping Pixel dissimilarity) [11]. Cette méthode se base sur l'analyse du signal de fluorescence au cours du temps. Le signal sous chaque pixel va être comparé au signal moyen (de l'ensemble ou d'un groupe de pixels) afin de déterminer une valeur de dissimilarité. La dissimilarité entre deux signaux pris comme des vecteurs peut être appréhendée comme une différence en termes de variation et d'intensité. La méthode devra dans un premier temps être validée sur des jeux de données simulées. C'est pourquoi, le développement au préalable d'un programme de simulation d'images de microscopie de fluorescence en champ large a été réalisé. L'efficacité réelle de la méthode devra ensuite être confirmée lors de son application sur données réelles. Dans le même temps, une comparaison avec SOFI, la méthode de référence dans ce domaine, sera effectuée.

La première partie de ce chapitre sera consacrée au développement d'un programme de simulation d'images de microscopie de fluorescence, basé sur la photo-physique d'une molécule unique, ainsi qu'aux différentes simulations réalisées lors de ce travail. Une seconde partie sera dédiée à la présentation de la méthode de traitement du signal MAPPIX. Enfin, les résultats obtenus sur des données simulées et réelles seront présentés et analysés lors d'une troisième et dernière partie.

IV.2 Simulations d'images

Les méthodes doivent être testées sur la base de simulations numériques d'images de microscopie de fluorescence [9, 89, 101-103]. J'ai développé un programme (appelé « simulmap ») permettant de générer des simulations d'images de microscopie de fluorescence, en prenant en compte la photo-physique de l'émission de fluorescence de molécule unique. Afin de me rapprocher des conditions réelles d'images de microscopie de fluorescence, le choix de modéliser des sondes fluorescentes photo-commutables à deux états (ON-OFF) a été fait. Ce développement a été effectué en collaboration avec le docteur Peter Dedecker de l'université de Leuven.

Le programme utilisé pour le calcul de MAPPIX ainsi que les calculs de simulation d'images ont été écrits sous MATLAB version 7.4.0 (R2007a) ou ultérieur [147]. Les images SOFI réalisées lors de cette étude ont été obtenues grâce à l'utilisation de Localizer [148], un programme en libre accès, fonctionnant sous Matlab ou Igor.

IV.2.1 Détail du programme

Les variables entrantes dans le calcul sont définies ci-dessous :

npixels = la taille d'un côté de l'image (carrée) en pixels.

nframes = le nombre d'images du jeu de données.

nemitters = le nombre de sondes, lors d'une répartition aléatoire.

sigma = l'écart-type de la PSF.

FrameTime = le temps d'acquisition d'une image.

$\tau_{ON} = 1/k_{OFF}$ = le temps que la sonde passe à l'état ON.

$\tau_{OFF} = 1/k_{ON}$ = le temps que la sonde passe à l'état OFF.

Background = le niveau de fond de fluorescence.

EMgain = le gain de la caméra EMCCD.

elecnoise = le bruit d'électron.

Qyield = le rendement quantique de fluorescence des sondes.

survivaltime = le temps que va mettre la sonde à s'éteindre (bleaching).

La première étape du programme va être de déterminer les coordonnées des différentes sondes de la simulation. Elles seront regroupées dans une matrice (coordonnées x ; coordonnées y). Ensuite vient la partie du programme de la création de la fluctuation de fluorescence de chaque sonde, une à une, en prenant en compte les paramètres k_{ON} , k_{OFF} et le temps d'acquisition d'une image (*FrameTime*) :

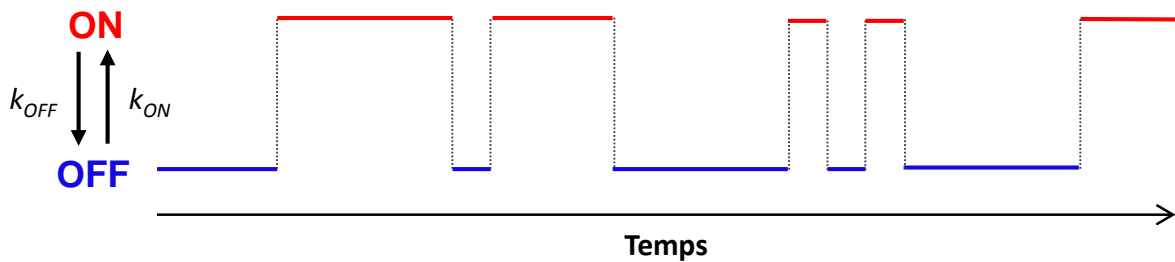


Figure 68 : Schéma représentant les différents τ_{ON} et τ_{OFF} tirés aléatoirement sur une loi exponentielle pendant le temps d'acquisition d'une image.

Les sondes vont successivement passer d'un état ON fluorescent à un état OFF non fluorescent en suivant un processus stochastique (**Figure 68**), où $k_{ON}=1/\tau_{OFF}$ et $k_{OFF}=1/\tau_{ON}$ régissent respectivement le passage de l'état « OFF » vers « ON » et « ON » vers « OFF ». Dans ce programme les temps passés dans chacun des états sont tirés sur une distribution exponentielle, car selon la littérature, cette fonction décrit la distribution des temps de la protéine fluorescente Dronpa qui a été utilisée lors de nos expériences en microscopie en champ large.

Les temps de photo-commutation sont ensuite découpés selon le temps d'acquisition d'une image. Le tirage des temps s'arrête soit à la fin du temps total de l'expérience soit lors du bleaching de la sonde (survivaltime). Ainsi on peut obtenir pour chaque sonde, le temps total (noté A) passé à l'état ON par image. L'étape suivante est la conversion du temps passé ON en nombre de photons (W) modulés par le rendement quantique de fluorescence (Qyield). On choisit une émission moyenne de 10 photons pour chaque milliseconde passée à l'état ON :

$$W = 10 \times A \times Qyield \quad (31)$$

On aura par exemple 1000 photons pour un temps passé à l'état ON de 100 ms avec un rendement quantique de fluorescence de 1. Le nombre de photons trouvé pour chaque sonde peut ensuite être réparti sur l'image. Dans un premier temps un calcul est fait pour déterminer la répartition de la PSF de chaque sonde sur l'ensemble des pixels de l'image (**Figure 69**). Toute les images sont créées de cette façon et constituent un jeu de données (data).

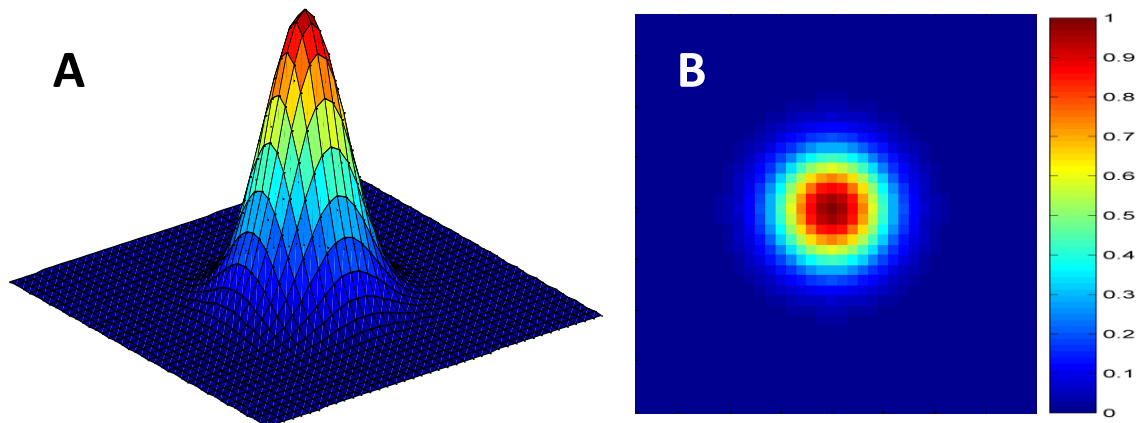


Figure 69 : Image représentant la PSF parfaite d'une sonde fluorescente générée après répartition des photons. (A) vue 3D et (B) vue 2D.

Il est nécessaire de bruitez les données afin de représenter les effets liés au matériel de détection lors des expériences de microscopie de fluorescence. L'étape suivante correspond donc à la prise en compte des sources de bruit et de gain. Dans une caméra CCD, les sources d'incertitudes liées au comptage de photons ou de charges électriques sont décrites par une loi de Poisson. Donc, dans un premier temps, le nombre de photons obtenus sur chaque pixel va être tiré aléatoirement selon une distribution de Poisson [149] (**Figure 70**).

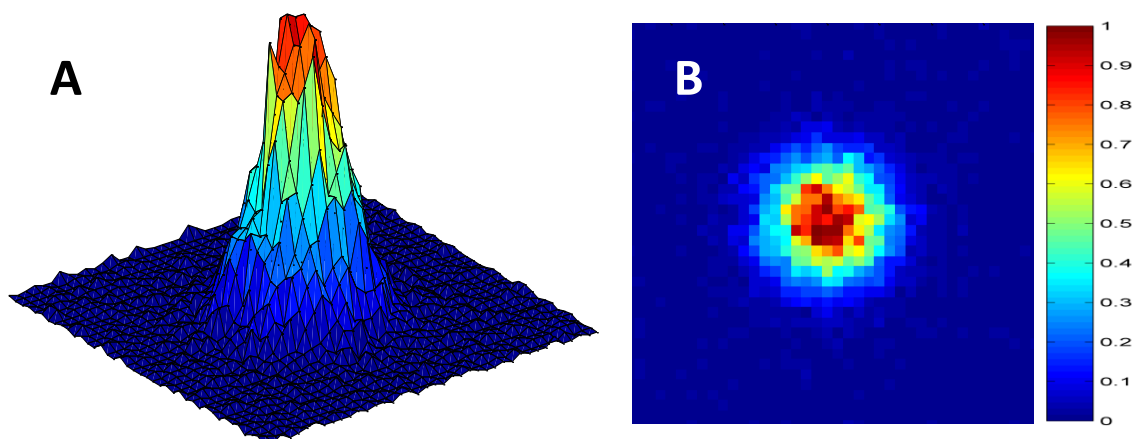


Figure 70 : Image représentant la PSF d'une sonde fluorescente, imparfaite suite à l'ajout d'un bruit de photon. (A) vue 3D et (B) vue 2D.

Une fois l'ensemble des photons collectés par la caméra, la qualité de l'image va être modulée par le gain de l'EMCCD, en suivant une distribution de loi gamma [150]. Enfin, un bruit électronique, représentant le bruit induit par le traitement du signal de la caméra, sera également ajouté à l'image suivant une loi normale [151] (**Figure 71**). Le résultat obtenu à la suite de toutes ces étapes correspond à un jeu de données de microscopie de fluorescence de la forme $n_{pixels} \times n_{pixels} \times n_{frames}$.

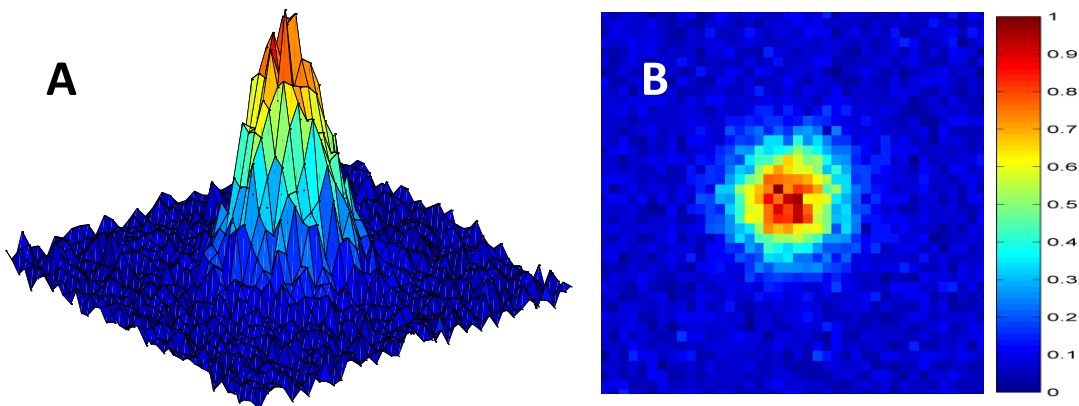


Figure 71 : Image représentant la forme finale de la PSF d'une sonde fluorescente. (A) vue 3D et (B) vue 2D.

IV.2.2 Les simulations de données de haute densité

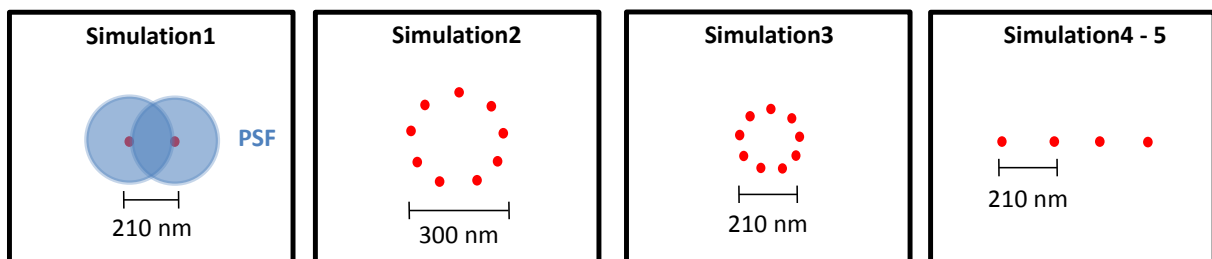


Figure 72 : Représentation de la position des sondes pour les différentes simulations.

- **Simulation 1** : 2 sondes proches de 210 nm (sous la limite de diffraction).
- **Simulation 2** : 9 sondes régulièrement placées sur un cercle de 300 nm de diamètre soit une densité linéique comportant 1 sonde tous les 105 nm.

- **Simulation 3** : 9 sondes régulièrement placées sur un cercle de 210 nm de diamètre soit une densité linéique comportant 1 sonde tous les 73 nm.
- **Simulation 4** : 4 sondes régulièrement espacées de 210 nm le long d'une ligne.
- **Simulation 5** : 4 sondes régulièrement espacées de 210 nm le long d'une ligne, mais possédant des intensités relatives différentes (1, 0.75, 0.5 et 0.25 de gauche à droite).

Lors de mon étude, j'ai simulé plusieurs jeux de données (**Figure 72**) afin de tester et comparer différents algorithmes. Ces simulations ont été réalisées avec les mêmes paramètres: un jeu de 1000 images, une image de 40 x 40 pixels, une taille de pixel de 30 nm, une largeur à mi-hauteur de PSF de 270 nm, un $\tau_{ON} = 2$ s et un $\tau_{OFF} = 0,5$ s et un temps d'acquisition d'image de 1 s. Enfin, un gain de 80 a été choisi pour l'EMCCD ainsi qu'un faible bruit d'électron. Pour la simulation 5, afin d'obtenir une intensité différente pour chaque sonde, un seuil sur le nombre de maximum de photons émis a été utilisé. Tous ces paramètres font que les sondes n'apparaissent jamais éteintes sur l'ensemble des images, ce qui correspond à des situations observées pour les données de haute densité. Afin de vérifier que les sondes simulées ne soient jamais visibles dans leur état OFF, le signal d'un pixel contenant une sonde est représenté **Figure 73**.

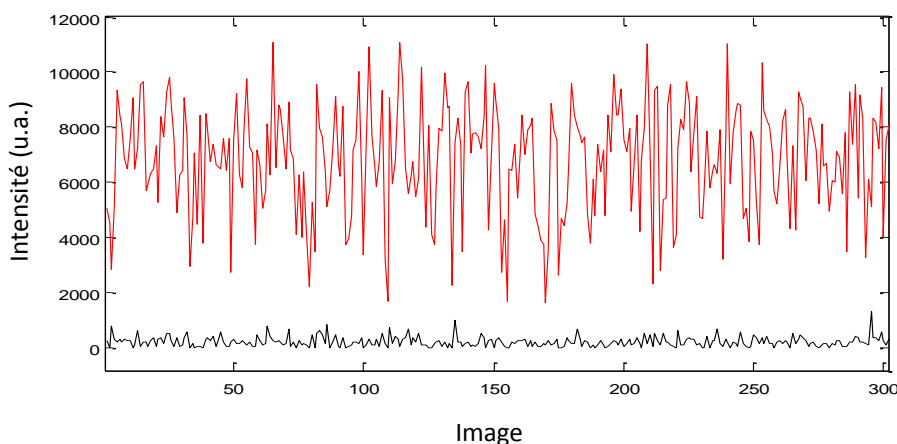


Figure 73 : Intensité d'un pixel vide (noir) et d'un pixel contenant 1 sonde fluorescente (rouge) observée pour les 300 premières images de la simulation 1.

IV.3 MAPping PIXEL dissimilarity (MAPPIX)

IV.3.1 Principe

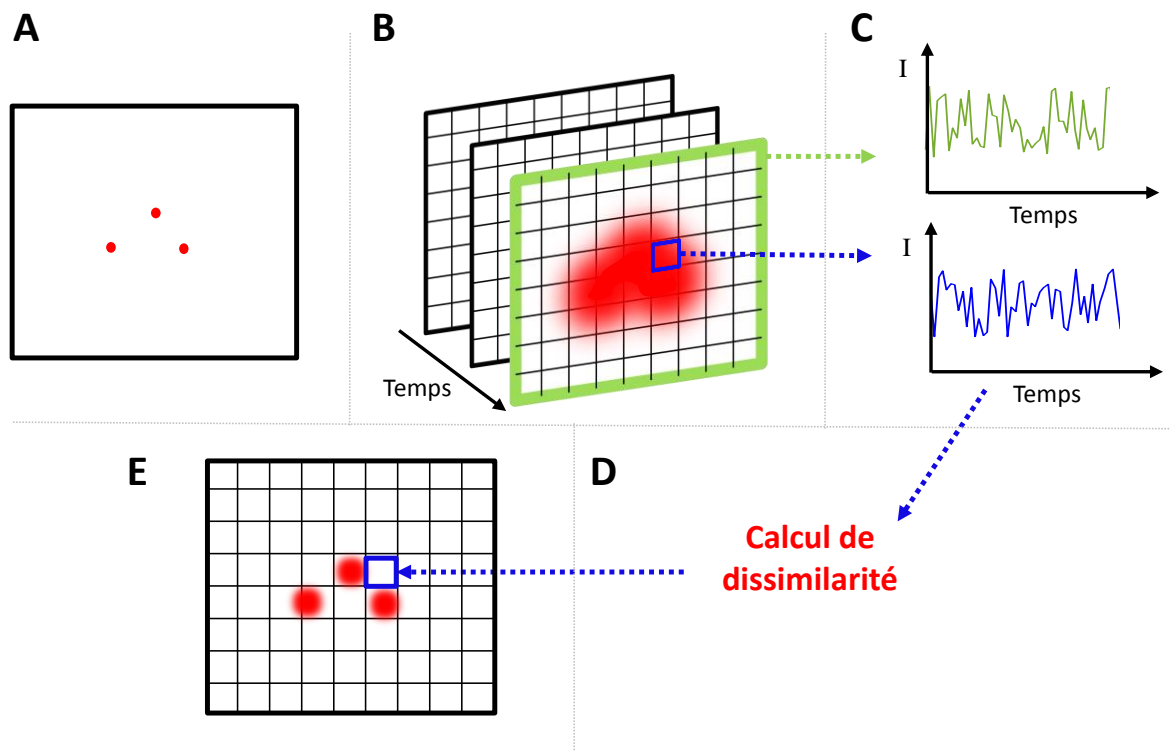


Figure 74 : Principe de MAPPIX, méthode d'analyse basée sur un calcul de dissimilarité entre deux fluctuations de fluorescence. (A) Trois sondes dont l'émission de fluorescence se recouvre. (B) Chaque pixel contient une fluctuation de fluorescence au cours du temps. (C) signal de fluctuation de fluorescence sur un pixel (bleu) et signal sur la moyenne des pixels (vert). (D) On transforme les signaux en vecteurs \vec{p}_i et \vec{r} afin de calculer leur dissimilarité. (E) L'image MAPPIX, composée des valeurs de dissimilarité trouvées pour chaque pixel. La valeur affectée à chaque pixel augmente avec la dissimilarité, donc avec la présence d'une fluctuation de fluorescence spécifique.

MAPPIX se base sur l'évaluation de la dissimilarité entre la fluctuation de fluorescence sous un pixel i au cours du temps $F(i,t)$ et la fluctuation de fluorescence moyenne. Celle-ci est calculée en considérant l'ensemble des pixels (N) de l'image ou de la zone de la zone de l'image considérée :

$$F_m = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N F(i, t) \quad (32)$$

Le résultat obtenu est donc une image représentant différentes valeurs numériques de dissimilarité. De manière générale, la dissimilarité peut être vue comme une mesure de la corrélation et de la distance entre deux vecteurs. Elle peut être estimée en utilisant différents critères, tous basés sur la corrélation, l'indépendance ou la norme. Le critère de dissimilarité proposé ici a été originellement utilisé pour sélectionner le spectre le plus dissimilaire au sein de mélanges spectroscopiques [152] pour ensuite être appliqué à l'identification de variables pures en imagerie hyperspectrale [153].

IV.3.2 Calcul de dissimilarité

Dans le cas de données de microscopie de fluorescence formées par K images, le signal associé à chaque pixel $F(i, t)$ est un vecteur \vec{p}_i de taille K . Les valeurs de fluctuations de fluorescence observées sont les composantes des vecteurs de chaque pixel \vec{p}_i . La moyenne de l'ensemble des vecteurs \vec{p}_i est notée \vec{r} et est normalisée à l'unité. La dissimilarité d_i d'un pixel i est définie ici comme le produit vectoriel du vecteur du pixel \vec{p}_i et du vecteur moyen \vec{r} pris sur l'ensemble des pixels, ce qui est représenté graphiquement **Figure 75**.

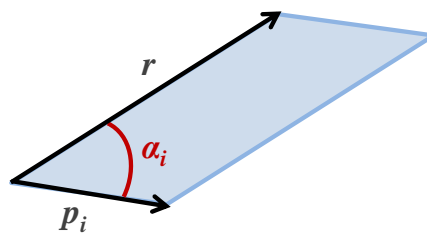


Figure 75 : Principe graphique de MAPPIX.

L'amplitude du produit vectoriel peut être interprétée comme la zone positive du parallélogramme ayant \vec{p}_i et \vec{r} pour cotés. Cette valeur peut tendre vers zéro lorsque les deux vecteurs ont la même direction ou lorsque l'un des deux a une faible norme. Plus

l'angle entre les deux vecteurs \vec{p}_i et \vec{r} est grand, plus la valeur de dissimilarité est grande. Il en va de même avec la norme du vecteur $||\vec{p}_i||$ (l'intensité du pixel). Le calcul du déterminant, proposé équation (33), est un moyen simple de réaliser le produit vectoriel représenté **Figure 75**.

$$d_i = \det(\vec{p}, \vec{r}) = ||\vec{p}_i|| \times ||\vec{r}|| \times \sin \alpha_i \quad (33)$$

Où la notation $||\vec{p}_i||$ correspond à la norme du vecteur prise dans la dimension du signal (on rappelle que $||\vec{r}|| = 1$) et α_i à l'angle entre le vecteur du pixel et le vecteur moyen. Avec un angle α_i constant, l'intensité du pixel d'origine rentre de façon linéaire dans le calcul de dissimilarité d_i .

IV.3.3 Discussion

MAPPIX est une approche visant à améliorer le contraste des images de microscopie de fluorescence. Ce qui va nous intéresser dans le cadre du développement de cette méthode, c'est l'obtention de faibles valeurs de dissimilarité dans 2 situations bien distinctes. La première correspond au cas d'un pixel présentant un signal de faible intensité (du bruit). Ce pixel possèdera une norme $||\vec{p}_i||$ très petite comparée au vecteur $||\vec{r}||$. La seconde situation correspond au cas d'un pixel présentant un signal dont la majeure partie provient du recouvrement de fluorescence des sondes situées sur des pixels voisins. Dans ce cas, \vec{p}_i sera très corrélé au vecteur \vec{r} (α_i faible). L'intensité MAPPIX sera donc réduite pour les pixels qui ne détectent que du recouvrement de fluorescence. Cette réduction va induire une augmentation de contraste dans l'image. Le contraste, entre deux sondes, peut être compris comme la différence d'intensité entre les maximums des PSF et la valeur située à mi-distance des deux sondes. Dans l'exemple **Figure 76**, l'amélioration de contraste est visible entre le pixel central et les deux pixels qui lui sont adjacents (à gauche et à droite).

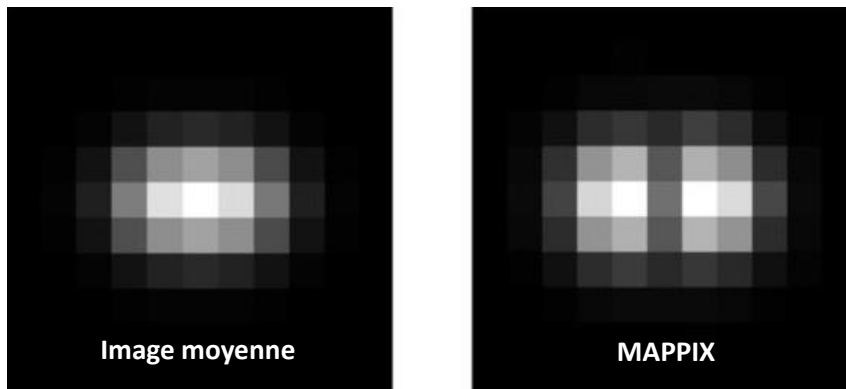


Figure 76 : Principe de MAPPIX. Image représentant 2 sondes sur des pixels séparés par un pixel vide.

MAPPIX va donc tendre à séparer des sondes très proches spatialement et dont les PSF se recouvrent. Cependant, l'amélioration apportée par cette méthode est limitée par la taille du pixel, elle-même déterminée par la caméra utilisée lors de l'expérience de microscopie de fluorescence en champ large. En effet, deux sondes fluorescentes peuvent être discriminées par MAPPIX seulement si elles sont séparées par un pixel dans lequel il n'existe pas de sonde, exemple **Figure 76**.

En pratique, il existe deux facteurs sur lesquels l'expérimentateur peut jouer selon les données à analyser. Ces facteurs sont le nombre d'images ainsi que la taille de l'image entrant dans le calcul de dissimilarité. Concernant le premier facteur, il est possible de calculer des dissimilarités sur des vecteurs de 1000 éléments (1000 images) mais il est également possible de le faire sur de plus petites séquences. Par exemple, l'analyse d'un jeu de données de 1000 images peut se faire par l'analyse de séquences successives de 10 images. Le résultat obtenu serait alors 100 images MAPPIX ensuite moyennées pour obtenir l'image finale. Dans le cas d'une courte séquence d'image, le vecteur \vec{r} de la moyenne des pixels est calculé à partir des images de la séquence. Cela peut permettre, par exemple, d'adapter la longueur des séquences utilisées à une dynamique cellulaire précise ou à la photo-physique de la sonde utilisée. Généralement, on peut anticiper que plus la séquence est courte et meilleur est le résultat. En effet, des différences significatives de signaux, observées sur quelques images, perdent de leur poids si elles rentrent dans un vecteur de plusieurs milliers d'images.

La taille de l'image considérée dans le calcul de MAPPIX est également importante. Le calcul peut se faire sur toute l'image (l'ensemble des pixels) ou localement (sur une plus petite partie de l'image). Comme pour les séquences, les différences entre les dissimilarités

observées sont plus grandes pour de plus petites parties d'images. Cependant, un point important est que dans le cas d'une découpe spatiale de l'image, le vecteur moyen \vec{r} sera différent pour chaque partie. Un calcul zone par zone est envisageable afin d'étudier des structures précises. En revanche, une reconstruction de l'image totale initiale à partir de l'obtention des cartes MAPPIX de chaque partie est à prendre avec précaution, car toutes les valeurs de dissimilarité ne sont pas calculées à partir du même vecteur de référence \vec{r} . Dans cette étude, les calculs ont été effectués sur séquences de 10 images pour des jeux de données de 1000 images et sur images entières.

IV.4 Etude sur données simulées

Nous allons montrer l'aptitude de MAPPIX à traiter des données de haute densité, c'est-à-dire dont le ratio r (voir équation (15)) est inférieur à 1 et dont le τ_{off} est inférieur au temps d'acquisition d'une image. Cela signifie que toutes les sondes seront visibles sur chaque image, émettant plus ou moins de photons mais toujours visibles. Dans de telles conditions, il y aura constamment plus d'une sonde allumée sous une zone limitée par la diffraction ce qui va rendre la localisation de molécule unique impossible.

IV.4.1 Résultats

Le premier résultat, obtenu pour la simulation 1 (**Figure 77**), permet de montrer la capacité de MAPPIX à séparer deux sondes fluorescentes proches d'une distance inférieure à la limite de diffraction. Ce résultat a été comparé avec ceux de SOFI à l'ordre 2 et 3. Les profils d'intensité normalisés sont montrés **Figure 77E**.

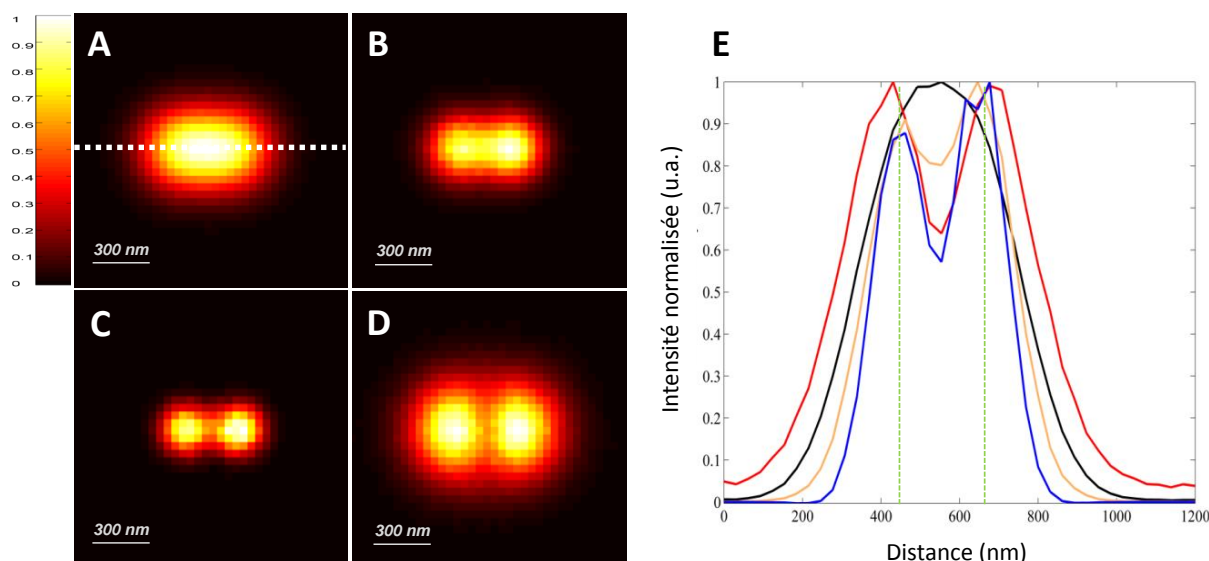


Figure 77 : Comparaison du résultat obtenu entre MAPPIX et SOFI sur la simulation 1. (A) Image moyenne de la simulation de 2 sondes fluorescentes proches de 210 nm ayant des PSF de 270 nm (FWHM). (B-D) Respectivement, les images obtenues après traitement par SOFI à l'ordre 2, SOFI à l'ordre 3 et MAPPIX. (E) Graphique représentant les profils d'intensités normalisés extraits de chaque image au niveau de la ligne en pointillé visible sur l'image A. Le profil noir correspond à l'image originale, les profils orange et bleu aux images de SOFI 2^{ième} et 3^{ième} ordre, le profil rouge à l'image MAPPIX et enfin les pointillés verts aux vraies positions des sondes fluorescentes.

Dans un premier temps, on peut observer que tous les résultats montrent une augmentation de résolution en séparant les 2 sondes. Dans un second temps, on peut observer les différences fondamentales entre ces deux méthodes. L'amélioration de résolution par le traitement SOFI est visible, particulièrement pour SOFI3. De son côté, MAPPIX induit une légère distorsion ainsi qu'un élargissement de l'image produite pour les données simulées à partir d'un faible nombre d'émetteurs. En effet, dans ce cas, le signal moyen est très spécifique. Nous verrons que ce n'est plus le cas pour les données réelles. L'amélioration se fait au niveau du recouvrement de l'émission de fluorescence des deux sondes, qui a été largement diminué par des valeurs de dissimilarité faibles, révélant ainsi leur présence.

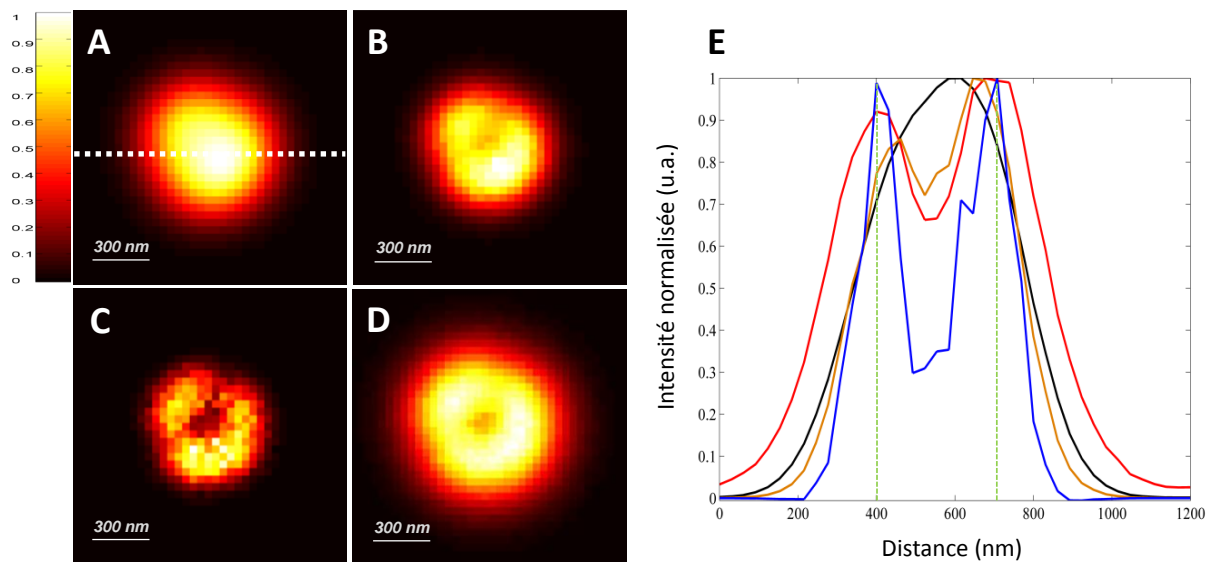


Figure 78 : Comparaison du résultat obtenu entre MAPPIX et SOFI sur la simulation 2. (A) Image moyenne de la simulation de 9 sondes fluorescentes positionnées autour d'un cercle de 300 nm de diamètre. (B-D) Respectivement, les images obtenues après traitement par SOFI à l'ordre 2, SOFI à l'ordre 3 et MAPPIX. (E) Graphique représentant les profils d'intensités normalisées extraits de chaque image au niveau de la ligne en pointillé visible sur l'image A. Le profil noir correspond à l'image originale, les profils orange et bleu aux images de SOFI 2^{ième} et 3^{ième} ordre, le profil rouge à l'image MAPPIX et enfin les pointillés verts aux vraies positions des sondes fluorescentes.

Les simulations 2 et 3 se composent respectivement d'un cercle de diamètre 300 et 210 nm (**Figure 78**, **Figure 79**), sur lesquels sont disposées de façon régulière 9 sondes fluorescentes. Tous les résultats obtenus sur le cercle de 300 nm de diamètre (**Figure 78**) montrent une amélioration de la résolution suffisante pour observer une forme ronde avec

un creux au centre. Le résultat obtenu par SOFI3 présente le meilleur contraste entre le cercle et le creux central. Les résultats obtenus pour la simulation 3 (**Figure 79**) montrent quant à eux des différences significatives entre SOFI et MAPPIX. On note que seule l'image MAPPIX révèle un creux net au centre de la structure (profil rouge, **Figure 79E**). Dans le cas de SOFI, aucune amélioration visible de la structure n'est obtenue.

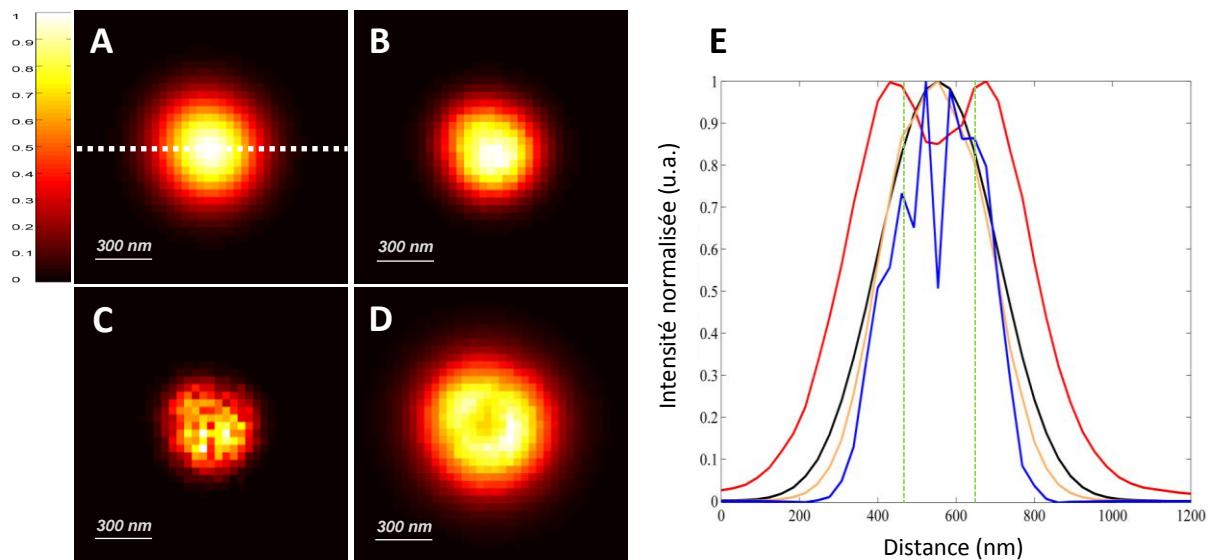


Figure 79 : Comparaison du résultat obtenu entre MAPPIX et SOFI sur la simulation 3. (A) Image moyenne de la simulation de 9 sondes fluorescentes positionnées autour d'un cercle de 210 nm de diamètre. (B-D) Respectivement, les images obtenues après traitement par SOFI à l'ordre 2, SOFI à l'ordre 3 et MAPPIX. (E) Graphique représentant les profils d'intensités normalisées extraits de chaque image au niveau de la ligne en pointillé visible sur l'image A. Le profil noir correspond à l'image originale, les profils orange et bleu aux images de SOFI 2^{ème} et 3^{ème} ordre, le profil rouge à l'image MAPPIX et enfin les pointillés verts aux vraies positions des sondes fluorescentes.

Afin d'étudier la capacité de MAPPIX à conserver les intensités des sondes de l'image d'origine, des tests ont été effectués sur la simulation 4 (**Figure 80**) et la simulation 5 (**Figure 81**), représentant respectivement 4 sondes de même intensité et d'intensités relatives différentes (1 / 0,75 / 0,5 / 0,25).

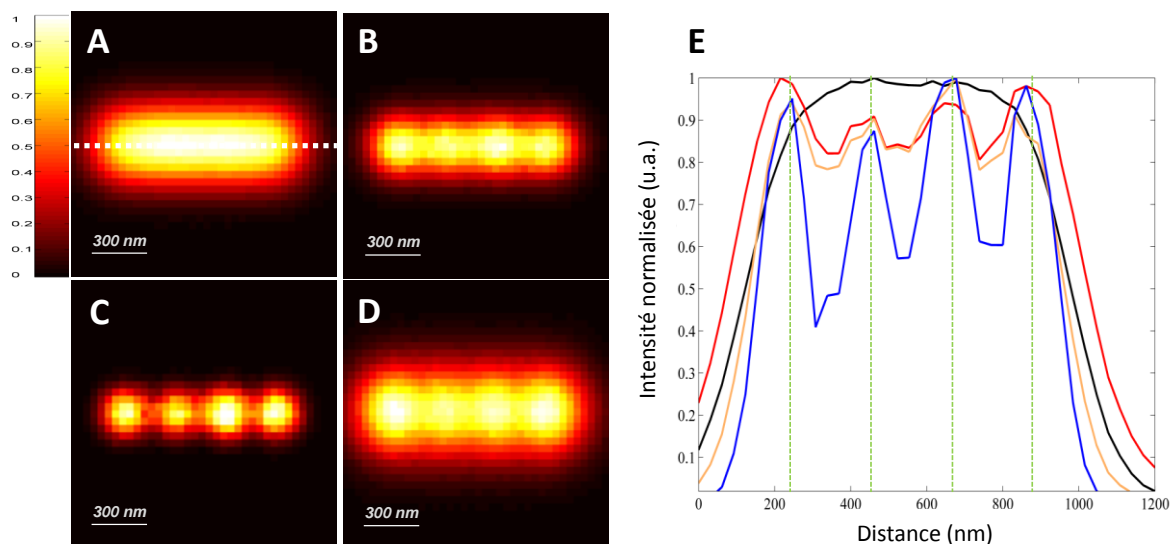


Figure 80 : Comparaison du résultat obtenu entre MAPPIX et SOFI sur la simulation 4. (A) Image moyenne de la simulation de 4 sondes fluorescentes sur une ligne, régulièrement espacées de 210 nm et de même intensité. (B-D) Respectivement, les images obtenues après traitement par SOFI à l'ordre 2, SOFI à l'ordre 3 et MAPPIX. (E) Graphique représentant les profils d'intensités normalisées extraits de chaque image au niveau de la ligne en pointillé visible sur l'image A. Le profil noir correspond à l'image originale, les profils orange et bleu aux images de SOFI 2^{ième} et 3^{ième} ordre, le profil rouge à l'image MAPPIX et enfin les pointillés verts aux vraies positions des sondes fluorescentes.

Dans le cas des sondes de même intensité, on constate que tous les résultats montrent une amélioration d'information. Comme pour les cas simples précédents, SOFI3 ressort comme étant la méthode la plus efficace en termes d'amélioration de résolution. MAPPIX et SOFI2 (**Figure 80E**) produisent des résultats équivalents.

Dans le cas de la simulation de sondes d'intensités relatives différentes (1 / 0,75 / 0,5 / 0,25), le résultat s'avère complètement différent (**Figure 81**). On constate que le résultat SOFI2 (**Figure 81B**) montre le même dégradé d'intensité que l'image originale avec la visualisation de la sonde la plus intense (tout à gauche). L'image SOFI3 (**Figure 81C**) va quant à elle permettre l'identification des 2 sondes du côté gauche de l'image. La troisième sonde n'est pas détectable et la plus faible sonde (tout à droite) a totalement disparu de l'image finale. On constate donc que l'analyse SOFI3 d'une image possédant des intensités de sondes hétérogènes induit la perte d'une partie de l'information initiale. Dans le cas de MAPPIX (**Figure 81D**), on observe une taille de PSF toujours comparable à celle de l'image originale. En revanche, on note que les 3 sondes les plus intenses sont visibles sur l'image

finale et qu'un étalement de fluorescence sur la droite laisse supposer la présence d'une ou plusieurs autres sources d'émission de fluorescence. Les mêmes remarques peuvent être faites en observant les coupes des différentes images (**Figure 81E**).

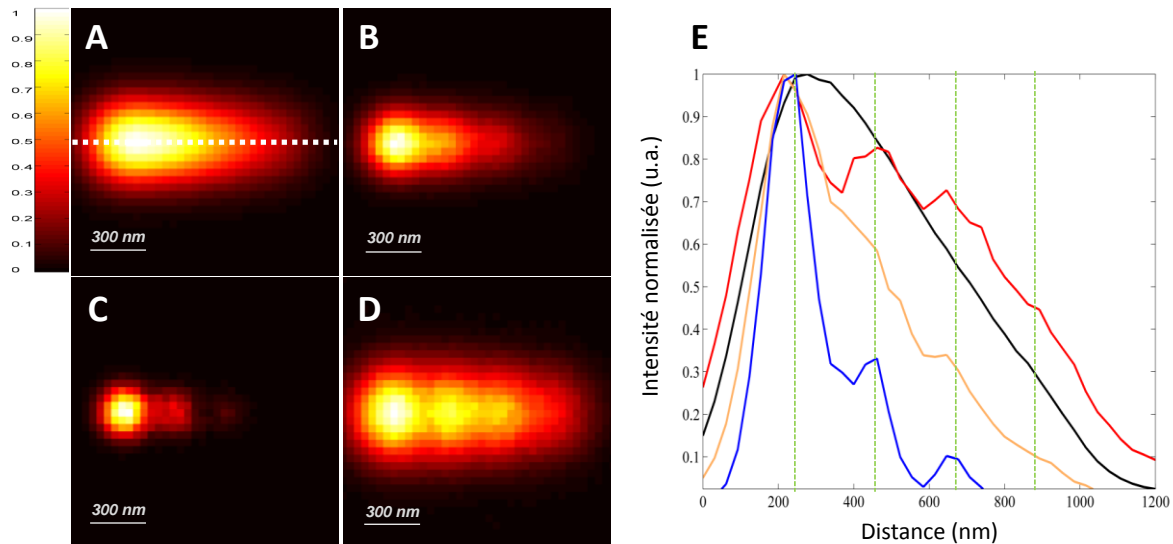


Figure 81 : Comparaison du résultat obtenu entre MAPPIX et SOFI sur la simulation 5. (A) Image moyenne de la simulation de 4 sondes fluorescentes sur une ligne, espacées régulièrement de 210 nm et d'intensités relatives différentes (1 / 0,75 / 0,5 / 0,25 de gauche à droite). (B-D) Respectivement, les images obtenues après traitement par SOFI à l'ordre 2, SOFI à l'ordre 3 et MAPPIX. (E) Graphique représentant les profils d'intensités normalisées extraits de chaque image au niveau de la ligne en pointillé visible sur l'image A. Le profil noir correspond à l'image originale, les profils orange et bleu aux images de SOFI 2^{ème} et 3^{ème} ordre, le profil rouge à l'image MAPPIX et enfin les pointillés verts aux vraies positions des sondes fluorescentes.

IV.4.2 Discussion

L'avantage de travailler sur la dissimilarité est de mieux conserver les intensités relatives des sondes de l'image originale, du fait de la linéarité entre les intensités initiales et les valeurs de dissimilarité de l'image finale. De cette façon, une large gamme d'intensité de fluorescence peut être traitée. De plus, ce concept permet également de diminuer l'impact du recouvrement de fluorescence à l'origine de la limite de diffraction, ce qui contribue à la bonne séparation de sondes proches spatialement.

Néanmoins, l'image MAPPIX ne peut guère être rationalisée en termes de gain de résolution, par rapport à l'image d'origine, étant donné qu'aucune mise en équation

mathématique de ce gain ne peut être établie. En revanche, on note que l'amélioration de contraste apporté par MAPPIX permet une qualité de séparation comprise entre celle apportée par SOFI2 et 3, ce qui est certainement la limite de la méthode, pour un temps de calcul similaire. Ainsi, 2 sondes fluorescentes séparées d'une distance plus faible que la limite de diffraction sont discernables tant qu'il y a suffisamment de pixel entre elles et que ces pixels ont une fluctuation d'intensité proche de celle du pixel moyen. Cette méthode permet donc l'analyse des fluctuations de fluorescence en imagerie biologique avec une sensibilité de l'ordre de la molécule unique et une résolution spatiale dépendante de la taille du pixel de l'image. Cependant, cette façon d'améliorer le contraste de l'image induit une distorsion au niveau de la forme de la PSF, lors du cas de 2 sondes avec un très fort recouvrement d'émission de fluorescence. Cette distorsion rend impossible la combinaison de MAPPIX avec une méthode de localisation classique. Cette première étape montre clairement une limite de MAPPIX en termes d'amélioration de résolution spatiale

Les analyses effectuées sur les simulations de cercle (simulations 2 et 3) montrent que des informations structurales peuvent être trouvées par application de MAPPIX bien qu'aucune amélioration théorique de la taille de la PSF des sondes ne soit apportée. Un autre avantage est que le traitement des données par MAPPIX conserve les intensités relatives des différentes sondes fluorescentes comprises dans l'image, contrairement à SOFI (élévation à la puissance n de la brillance de chaque sonde). Une meilleure conservation d'intensité, lors de l'analyse d'images possédant une grande gamme d'intensité peut donc être obtenue par application de MAPPIX.

IV.5 Etude sur données réelles

Les méthodes d'analyse pour l'imagerie de fluorescence dans des milieux biologiques nécessitent bien souvent l'emploi d'un grand nombre de sondes fluorescentes. De plus, l'aspect quantitatif des images super-résolues étant un point crucial en biologie, une attention toute particulière doit être portée à la robustesse des méthodes de traitement du signal concernant la restitution, au plus proche de la réalité, des intensités des différentes sondes de l'image.

IV.5.1 Préparation d'échantillons biologiques

Des cellules embryonnaires de rein humain (HEK-293T) ont été préparées par l'équipe de l'université de Leuven. Elles ont été cultivées dans un milieu de culture à base de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10 % de sérum fœtal de bovin et de la gentamicine (tous de marque GIBCO). 24 h avant l'analyse par microscopie, les cellules ont subi une transfection calcium-phosphate avec le plasmide pCDNA3, encodant la protéine fluorescente DAKAP-Dronpa [3]. La partie DAKAP étant une séquence permettant le ciblage spécifique de la membrane externe des mitochondries. Juste avant l'analyse par microscopie, les cellules ont été lavées 3 fois avec une solution de lavage de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) pour enfin être imagées dans 1 mL de HBSS dans une pièce à température ambiante.

IV.5.2 Conditions expérimentales

Les expériences d'imagerie sur cellules vivantes ont été réalisées sur un microscope Olympus Cell*TIRF équipé de sources laser à 488 et 405 nm, afin de pouvoir photo-commuter la protéine fluorescente DAKAP-Dronpa entre les états ON et OFF (voir **Figure 14**), d'un objectif Olympus x 150 d'ouverture numérique 1,45 et d'une EMCCD Hamamatsu. Les cellules ont été visualisées en mode épifluorescence avec le laser à 488 nm et des jeux de filtres adaptés. La puissance du laser a été mesurée juste au niveau de l'objectif et ajustée pour être comprise entre 1 et 2 mW. Un temps d'acquisition de 33 ms a été fixé ainsi qu'un gain de 300 pour l'EMCCD. Les données obtenues sont de taille 512 × 512 pixels, 1000 images avec une taille de pixel optique de 100 nm.

IV.5.3 Résultats

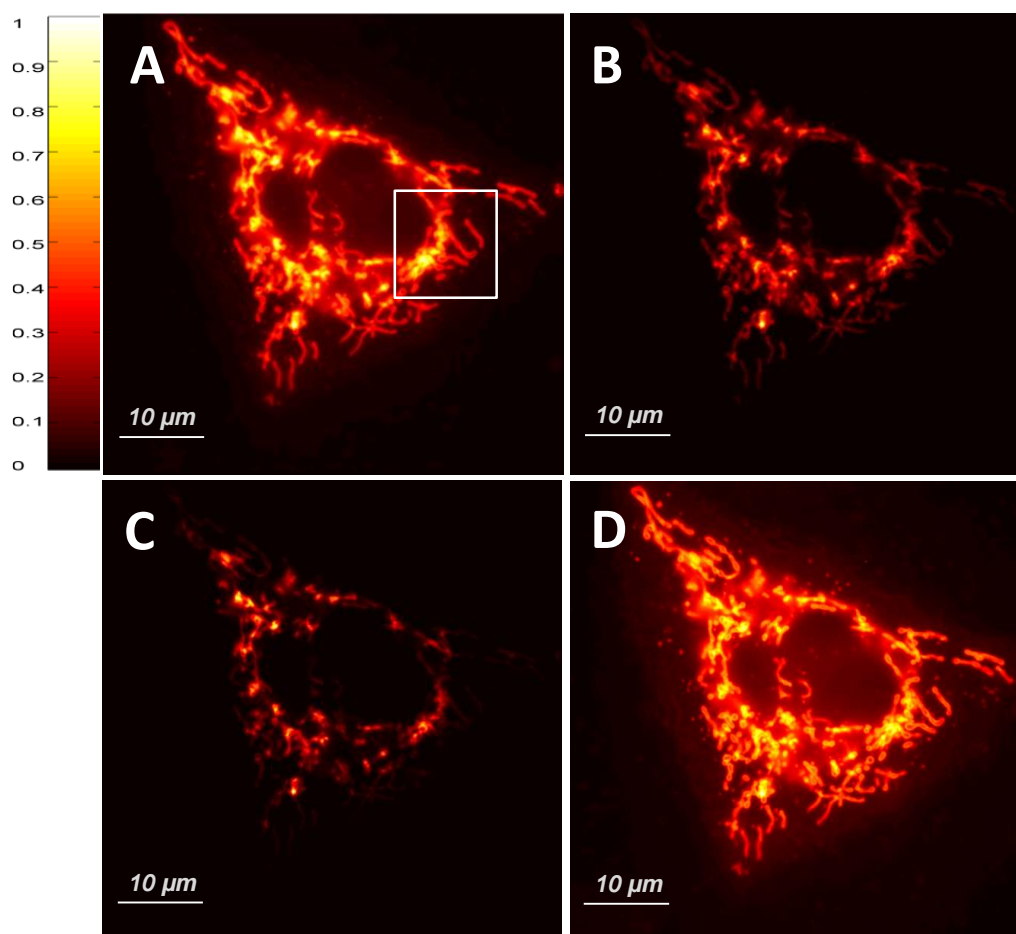


Figure 82 : Comparaison du résultat obtenu entre MAPPIX et SOFI sur les données réelles. (A) Image moyenne d'une cellule HEK. (B-D) Respectivement, les images obtenues après traitement par SOFI à l'ordre 2, et SOFI à l'ordre 3 et MAPPIX.

On peut voir **Figure 82A**, l'image moyenne des 1000 images du jeu de données original. Sur les **Figure 82B** et **Figure 82C**, correspondant respectivement aux résultats SOFI2 et 3, on note une correction du background ainsi qu'une augmentation importante de la résolution de l'image. Cependant, à cause de la variation importante des intensités relatives dans les données originales, on observe une perte de contraste dans certaines parties de l'image. Cette perte est importante dans l'image SOFI3 (**Figure 82C**). De plus le gain de résolution de SOFI2 est largement masqué par la trop grande différence créée entre faibles et fortes intensités. Par comparaison avec SOFI, MAPPIX montre une bonne conservation des intensités relatives de l'image originale.

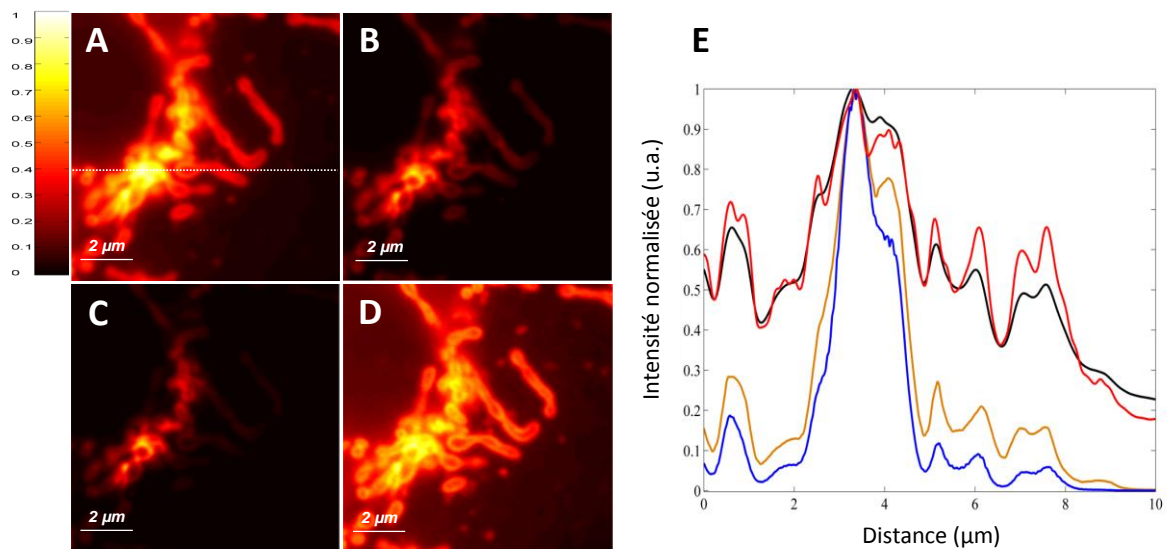


Figure 83 : Comparaison du résultat obtenu entre MAPPIX et SOFI sur les données réelles. (A) Image moyenne d'un zoom sur la cellule HEK, voir figure 10A. (B-D) Respectivement, les images obtenues après traitement par SOFI à l'ordre 2, SOFI à l'ordre 3 et MAPPIX. (E) Graphique représentant les profils d'intensités normalisées extraits de chaque image au niveau de la ligne en pointillé visible sur l'image A. Le profil noir correspond à l'image originale, les profils orange et bleu aux images de SOFI 2^{ème} et 3^{ème} ordre et le profil rouge à l'image MAPPIX.

Afin de mettre en avant les différences entre les résultats obtenus, nous nous concentrons sur une petite zone de cette image (**Figure 83**). Dans un premier temps, on observe pour SOFI2 et SOFI3 (profils jaune et bleu, **Figure 83E**) une augmentation de résolution via le rétrécissement de la largeur des pics. En revanche, on constate bien une perte importante d'intensité relative pour les pics les moins intenses. Par opposition, on constate une bonne conservation du contraste pour le profil de MAPPIX (profil rouge, **Figure 83E**). On note également l'apparition d'un deuxième maximum autour d'un micron.

Le choix du nombre d'images entrant dans le calcul de dissimilarité dépend des données à analyser (la vitesse de photo-commutation des sondes, le bruit de fond, l'autofluorescence, le bleaching, etc.). Généralement, par expérience sur différents jeux de données, l'analyse de séquences de plusieurs dizaines d'images successives permet d'obtenir de bons résultats. Afin de montrer l'influence de ce choix, les résultats obtenus en utilisant des séquences de 10, 50, 250 et 1000 images (jeu entier) sont comparés (**Figure 84**). Pour la séquence de 1000 images, la dissimilarité est calculée par rapport au pixel moyen sur

la totalité du jeu de données. Dans cette situation, les fluctuations dues au bruit de fond sont totalement comprises dans le pixel moyen ainsi que de longues variations tel que le bleaching. Ainsi on peut constater une très forte diminution du niveau de bruit, rendant l'image MAPPIX comparable à SOFI sur ce point. En revanche, le deuxième maximum sur le pic à gauche de la coupe (profil rouge, **Figure 84E**) n'est observé que sur les résultats par séquences de 10 images. L'augmentation du contraste, et le gain d'information qui en découle, dépendent donc de la taille de la séquence d'images considérée.

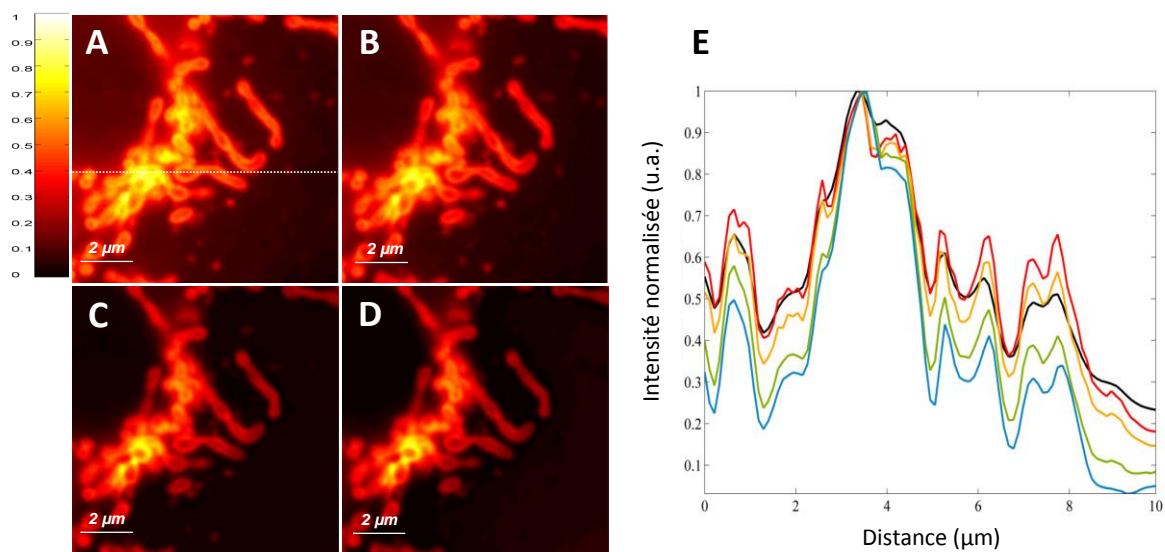


Figure 84 : Comparaison du résultat obtenu pour différents nombres d'images rentrant dans le calcul de MAPPIX sur données réelles. (A-D) Respectivement, les images obtenues après traitement MAPPIX par paquet de 10, 50, 250 et 1000 images. (E) Graphique représentant les profils d'intensités normalisées extraits de chaque image au niveau de la ligne en pointillé visible sur l'image A. Le profil noir correspond au signal de l'image originale. Les profils rouge, orange, vert et bleu correspondent respectivement au traitement MAPPIX des 1000 images du jeu de données par séquences de 10, 50, 250 et 1000 images.

Finalement, il est à noter qu'aucune modification de l'image, via des prétraitements, n'a été effectuée. Plus précisément, aucune correction de bruit, de ligne de base ou de mise à l'échelle des intensités n'a été utilisée lors de mes calculs. En effet, le choix de l'algorithme de prétraitement d'images peut fortement influencer sur la qualité de l'image super-résolue [154], ce qui peut biaiser la comparaison de méthode.

IV.6 Conclusion

Un programme de simulation de données de microscopie de fluorescence en champs large ainsi qu'une méthode de traitement d'image pour des données de haute densité été présentés dans ce chapitre.

Le développement de MAPPIX, une approche basée sur un calcul de dissimilarité entre pixels, a démontré que des approches de type traitement du signal peuvent être appliquées à l'imagerie de fluorescence super-résolue. MAPPIX représente une alternative aux méthodes de traitement statistique des fluctuations de fluorescence. Cette méthode permet une amélioration de résolution comparable à SOFI2. En revanche, la déformation de la PSF sur l'image finale empêche toute combinaison avec une technique de déconvolution ou de localisation ce qui est une limitation.

Le résultat de cette comparaison s'inverse lorsqu'il s'agit de traiter des données en condition de très haute densité (ex. données réelles). Il a été montré que MAPPIX peut mieux conserver les ratios d'intensité de l'image d'origine, évitant ainsi la perte de signaux de faibles intensités. Cela génère des images plus proches de la réalité, ce qui est essentiel lors d'études biologiques. Cette méthode est donc une bonne alternative dans le cadre d'imageries biologiques à des fins d'identification structurale ou d'analyses quasi-quantitatives, dans des conditions de fortes densités de sondes et de faibles fluctuations de fluorescence.

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'est intéressé dans un premier temps la compréhension et la caractérisation des phénomènes de transferts d'énergie entre les molécules d'une nanoparticule renfermant plus de 5000 molécules fluorescentes d'un dérivé de BODIPY. L'objectif est d'étudier l'intérêt et d'évaluer l'efficacité de l'utilisation de ces nanoparticules en imagerie biologique de super-résolution. Des transferts d'énergie de type migration par « *hopping* » (ou homo-FRET) et annihilation singulet-singulet ont été mis en évidence. Ces transferts d'énergie conduisent à l'observation pour une nanoparticule fluorescente individuelle de fluctuations de l'intensité de fluorescence au cours du temps. Néanmoins, aucune extinction totale de la fluorescence n'a pu être observée ce qui pose le problème de l'utilisation des méthodes classiques (PALM, STORM) de localisation de molécules uniques pour ce type de sondes. Nous avons donc été amenés, en parallèle, à développer une méthode (MAPPIX) de traitement des données d'imagerie de molécules uniques adaptée aux images présentant de très hautes densités d'émetteurs actifs.

L'étude de la photodynamique par spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps de nanoparticules fluorescentes en solution dans l'eau (**Chapitre II**) a montré qu'il existe une forme excimère, caractéristique de la présence d'agrégats. Les temps de vie observés sont multi-exponentiels traduisant une inhomogénéité de la distribution des molécules de BODIPY au sein des NPFs, avec un temps moyen d'une centaine de picosecondes. Des espèces noires sont responsables de la diminution du rendement quantique de fluorescence de la nanoparticule, estimée à 0,1, comparativement à celle des molécules qui la composent, autour de 0,75. Nous avons également étudié la possibilité de transferts d'énergie entre molécules au sein des nanoparticules fluorescentes. Des expériences d'anisotropie de fluorescence résolue en temps nous ont permis de caractériser un transfert d'énergie de type homo-FRET (migration) avec un temps caractéristique de 23 ps conduisant à une dépolarisation de l'émission de fluorescence de la NPF. En utilisant le formalisme du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), un rayon de Förster de 4,7 nm et une distance entre les molécules de BODIPY de 1,9 nm ont pu être déterminés.

Dans la littérature, il a été montré que le phénomène de clignotement d'une nanoparticule organique par transfert d'énergie interne dépend de la puissance de l'excitation lumineuse, et donc du nombre de molécules excitées par nanoparticule. Nous avons cherché à rationaliser cet effet en réalisant des expériences de spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde, faisant varier la puissance laser à longueur d'onde d'excitation donnée, pour obtenir en moyenne 10, 70, 150, 400 ou 1500 molécules excitées par nanoparticule et par impulsion. Les résultats ont permis de caractériser le transfert d'énergie par annihilation singulet-singulet avec un temps de 1,5 ps (pour la plus forte énergie), un rayon de Förster de 8,9 nm avec une distance de 2,7 nm entre les molécules. Ils confirment également que l'efficacité de ces transferts augmente avec la concentration de molécules BODIPY excitées au sein d'une nanoparticule, ce qui coïncide avec le fait que ces transferts surviennent entre deux molécules excitées. Enfin, nous avons développé une expérience de microscopie confocale de fluorescence de particule unique résolue en temps (réponse instrumentale de 50 picosecondes), afin d'étudier les nanoparticules individuellement (**Chapitre III**). Le but de cette expérience a été d'observer les variations temporelles de l'intensité de fluorescence émise par les nanoparticules. Pour cela, nous avons également fait varier la puissance d'excitation pour obtenir en moyenne 1, 10, 130 ou 1300 molécules par nanoparticule et par impulsion. Les résultats montrent l'apparition de clignotements rapides de l'intensité et des temps de vie très courts (sous les 100 picosecondes) avec l'augmentation de la puissance d'excitation. Ces temps de vie sont attribués aux transferts d'énergie caractérisés précédemment (« *hopping* » et annihilation singulet-singulet). Pour la puissance correspondant à environ 130 molécules excitées par nanoparticule et par impulsion, une variation importante de l'intensité de fluorescence est observable, laissant envisager leur potentiel d'utilisation pour de l'imagerie de fluorescence en super-résolution, sous réserve d'utiliser des méthodes de traitement adaptées aux données d'imagerie de haute-densité.

Nous avons proposé une méthode (MAPPIX) [11] de traitement des données d'imagerie de fluorescence de molécule unique en haute densité. Le calcul effectué est très rapide et repose sur un simple calcul de dissimilarité entre les signaux correspondants aux fluctuations observées pour les différents pixels (**Chapitre IV**). Afin de caractériser la méthode, un programme de simulation d'images de fluorescence, basée sur la photo-

physique de molécules uniques, a été utilisé. Les résultats obtenus ont montré une amélioration de résolution comparable à celle obtenue par la méthode SOFI2. Les images offrent un meilleur contraste et conservent les intensités relatives des sondes constituant l'image. Néanmoins, cette amélioration s'accompagne d'une déformation de la forme de la PSF, ce qui est clairement une limitation puisque cela empêche toute combinaison de MAPPIX avec une technique de déconvolution ou de localisation. En revanche, nous avons pu montrer, lors de l'analyse de données réelles de cellules embryonnaires HEK, une amélioration significative des résultats obtenues, mettant en évidence des informations structurales qu'il n'était pas possible d'obtenir par ailleurs.

Suite à ces travaux, des expériences sur différentes concentrations en BDPMA au sein des NPFs pourraient permettre d'obtenir une extinction de fluorescence plus importante et ainsi faciliter et améliorer le phénomène de clignotement des NPFs. Une fois les paramètres optimaux déterminés, la capacité des NPFs à traverser les membranes biologique par diffusion rend possible la réalisation d'images en milieux biologiques. Les méthodes de super-résolution tel que MAPPIX qui, contrairement à la plupart des méthodes actuelles, ne nécessite pas d'extinction totale de la fluorescence des sondes sont parfaitement adaptées à ce type d'études. Il serait donc intéressant d'appliquer MAPPIX sur des images biologiques de NPFs.

Annexe 1 : Comptage de photons uniques corrélés en temps

La fluorescence résolue en temps par comptage de photons uniques TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) est une technique qui nécessite l'utilisation de lasers pulsés générant des impulsions de très courtes durées (quelques dizaines de femtosecondes). Ces impulsions induisent le peuplement des niveaux excités des molécules fluorescentes présentes dans les échantillons. Vient ensuite une désexcitation de ces niveaux produisant, en partie, une émission de fluorescence. La façon la plus simple de suivre ce déclin de fluorescence consisterait à suivre le flux de lumière émis dans le temps à l'aide d'une électronique ultra-rapide. Cependant la résolution temporelle requise est difficile à atteindre avec les équipements traditionnels, tel qu'un oscilloscope rapide par exemple. De plus, la quantité de photons émise est trop faible pour générer un signal représentatif du flux de lumière.

Le principe de la technique du comptage de photons uniques corrélés en temps repose sur le fait que la probabilité de détecter un photon de fluorescence à l'instant t , après l'impulsion d'excitation, est proportionnelle à l'intensité de fluorescence à cet instant. Concrètement, une expérience en TCSPC commence avec la détection du pulse laser réalisée à l'aide d'une photodiode ou directement d'un signal de sortie fourni par le laser (trigger), définissant un temps zéro (START). A partir de cette référence temporelle, le système déclenche un « chronomètre » jusqu'à la détection du premier photon par le détecteur placé sur le trajet optique de la fluorescence. Au premier photon détecté, le chronomètre s'arrête (STOP) et le temps Δt mesuré est enregistré. La démarche est ensuite reproduite pour chaque pulse laser afin d'accumuler les temps des différents événements.

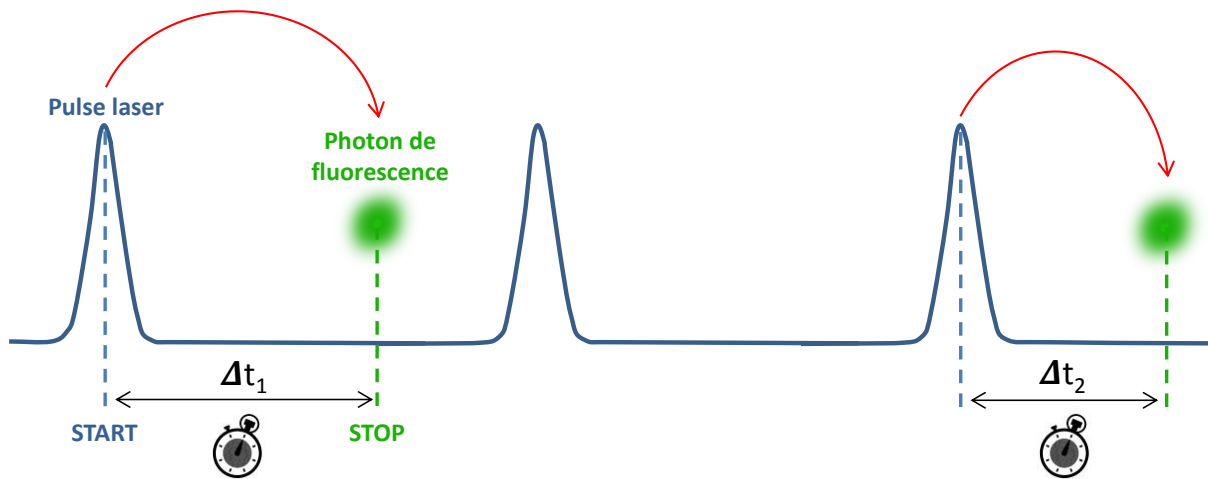


Figure 85 : Schéma de détection d'un photon (évènement) suivant la méthode TCSPC. Adaptée de [155].

L'émission d'un photon de fluorescence est un phénomène probabiliste et indépendant. Lorsqu'un grand nombre d'évènements est enregistré, il devient possible de reconstruire statistiquement un déclin et d'obtenir la courbe qui aurait été obtenue par le suivi analogique du signal.

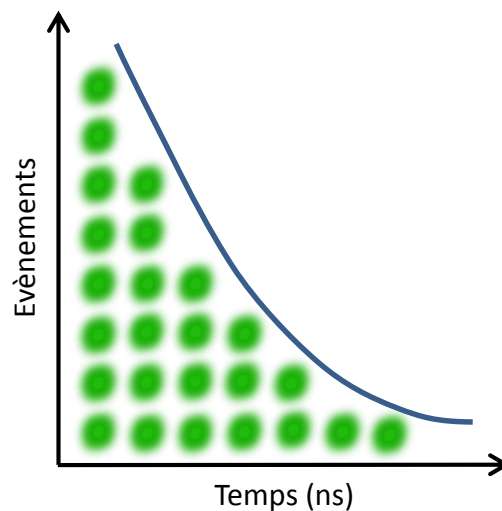


Figure 86 : Schéma du déclin de fluorescence reconstruit sur la base des évènements enregistrés. Adaptée de [155].

La détection d'un photon par le détecteur induit un temps-mort (Δt_{mort}) pendant lequel le système est inopérant. Ce phénomène est susceptible de fausser la statistique de comptage. En effet, si deux photons sont émis pendant la période de mesure, seul le premier sera pris en compte (effet pile-up). Pour éviter ce biais, la puissance du laser sur l'échantillon

doit être choisie afin de limiter la probabilité d'émission de deux photons dans la période de mesure ainsi que le nombre d'impulsions laser faisant l'objet d'une détection. Ce nombre d'impulsions est choisi en fonction du temps mort du détecteur généralement fixé dans un intervalle de 1 à 2 %.

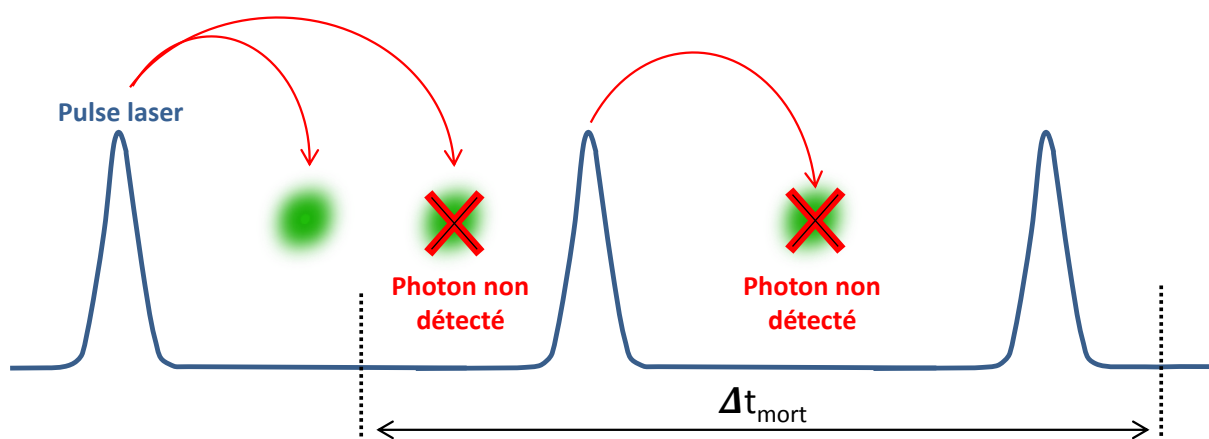


Figure 87 : Schéma représentant le temps mort du détecteur à l'origine de l'effet pile-up. Adaptée de [155].

Il faut noter que le déclin de fluorescence n'est pas directement obtenu par cette technique. En effet le signal mesuré correspond en fait à la convolution du déclin avec la réponse instrumentale de l'appareil (IRF). En pratique, il est préférable d'acquérir préalablement l'IRF à l'aide d'une solution diffusante (sans émission de fluorescence) afin de déconvoluer le signal de fluorescence obtenu sur les échantillons. L'IRF est sensible aux réglages du montage expérimental et dépend de la qualité de l'alignement du faisceau optique.

L'émission de fluorescence depuis l'état S_1 suit une loi du premier ordre. La durée de vie de fluorescence d'un composé est dépendante de son environnement. C'est pourquoi les temps de vie caractéristiques des composés de références sont toujours donnés en solution, pour un solvant spécifique et à température ambiante. Généralement, l'émission de fluorescence d'un composé seul en solution décroît de façon mono-exponentielle. Cependant, la présence de plusieurs espèces (excimère, agrégation de molécules...) ne permet généralement pas la modélisation du signal par un déclin mono-exponentielle. Dans de tels cas, une modélisation par une somme d'exponentielles a été choisie.

$$I(t) = \sum_i A_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (34)$$

Où I correspond à l'intensité de fluorescence mesurée, A au coefficient préexponentiel et τ au temps de vie de fluorescence. Les paramètres A_i et τ_i sont alors déterminés suivant la méthode des moindres carrés non linéaire [156]. La valeur du χ^2 permet de juger de la qualité du modèle mathématique appliqué au déclin. Une valeur pratique traduisant la bonne qualité de la modélisation sera généralement comprise entre 0.8 et 1.2. Les temps de vie ainsi trouvés sont donnés pour une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une polarisation à l'angle magique (54,7 °). Les déclin ont été traités respectivement via le logiciel FluoFit version 4.6.6 et le logiciel SymPhoTime version 2.1 de PicoQuant.

Afin de valider le montage expérimental, la mesure de la Coumarine 153, une molécule standard [157] dont le temps de vie en solution dans le méthanol est connu ($\tau = 4,3 \pm 0,2$ ns) a été réalisée (**Figure 88**). Une valeur de $4 \pm 0,2$ ns a été trouvée avec l'utilisation d'un modèle mono-exponentiel ($\chi^2 = 0,997$) et avec déconvolution du déclin par l'IRF expérimentale.

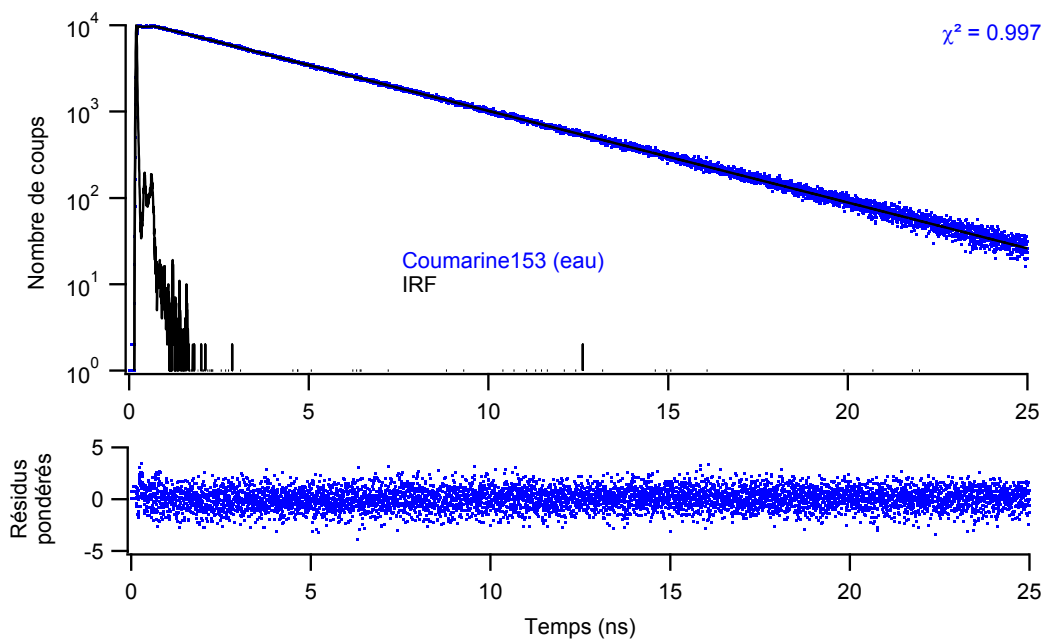


Figure 88 : Déclin de fluorescence et ajustement avec une fonction mono-exponentielle de la Coumarine 153 dans le méthanol. La qualité des ajustements est représentée par leurs résidus pondérés.

Annexe 2 : Code Matlab

Simulation d'images

```
function [ standdev, y, data, ligne_colonne, meanframe, telapsed ] = simulmap2 ( npixels,  
nframes, nemitters, sigma, FrameTime, Ton, Toff, EMgain, elecnoise, Qyield, survivaltime );
```

```
tstart = tic; % calcul du temps écoulé
```

```
% npixels = le nombre de pixel d'un côté d'une carte carrée, 30 pour une carte 30*30.
```

```
% nframes = le nombre d'images du jeu de données, exemple 1000
```

```
% nemitters = le nombre de sondes lors d'une répartition aléatoire
```

```
% sigma = le sigma de la formule: FWHM=2.35*sigma
```

```
% Frametime = le temps d'acquisition d'une image
```

```
% Ton = le temps que la sonde va passer à l'état ON
```

```
% Toff = le temps que la sonde va passer à l'état OFF
```

```
% EMgain = le gain de rapport signal sur bruit apporté par une EMCCD
```

```
% elecnoise = le bruit d'électron provenant de la caméra
```

```
% Qyield = rendement quantique de fluorescence
```

```
% survivaltime = le temps de survivabilité de la sonde
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% POSITIONS %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
cercle11 = [];
```

```
cercle12 = [];
```

```
cent2 = [];
```

```
cent1 = [];
```

```
r = 5; % choix du rayon du cercle en pixel
```

```
for o = 0:0.0628:2*pi; % choix du nombre de sonde sur le cercle
```

```
cercle11 = [cercle11;r*cos(o)]; % création des coordonnées (x,y) des sondes
```

```
cercle12 = [cercle12;r*sin(o)];
```

```
end
```



```

cercle11 = cercle11+20;
cercle12 = cercle12+20;
cent2 = [cercle11];
cent1 = [cercle12];
ligne_colonne=[cent2,cent1];    % vecteur des positions des sondes

% probabilité pour une sonde de passer de l'état OFF à ON
PON = ((1/Toff)/((1/Toff)+(1/Ton)));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% ETATS DES SONDES AU TEMPS 0 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
calculstate = rand(size(cent1,1),1);    % établissement sonde par sonde
State=ones(size(cent1,1),1);
for i = 1:size(cent1,1);
    if calculstate(i,1) < PON;
        State(i,1) = 1;
    else
        State(i,1) = 0;
    end
end
BleachOrNot = ones(size(cent1,1),1);    % 1 = active // 0 = bleached

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% IMAGE PAR IMAGE %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for j=1:nframes

% vecteur de la somme des temps passé ON pour chaque sonde
TotalTimeON = zeros(size(cent1,1),1);
oneframe=zeros(npixels,npixels);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% SONDE PAR SONDE %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for i = 1:size(cent1,1);
    StartTime = 0;                % photo-commutation commence à t = 0
    EndTime = FrameTime;          % temps d'une image

```

```
CurrentTime = StartTime;
```

```
while i % boucle infinie jusqu'à la fin du temps d'une image (ex: 30ms)
```

```
RemainingTime = (EndTime-CurrentTime);
```

```
if State(i,1) == 1;           % tirage des Ton et Toff  
    FractionTime = min(exprnd(Ton),RemainingTime);
```

```
else
```

```
    FractionTime = min(exprnd(Toff),RemainingTime);
```

```
end
```

```
if State(i,1) == 1;           % la somme des temps ON sur une image  
    TotalTimeON(i,1) = TotalTimeON(i,1) + FractionTime;
```

```
end
```

```
CurrentTime = CurrentTime + FractionTime;
```

```
if CurrentTime < EndTime;
```

```
    if State(i,1) == 1;       % la sonde passe de ON à OFF
```

```
        State(i,1) = 0;
```

```
        if FractionTime > exprnd(survivaltime); % cas ou la sonde meurt
```

```
            BleachOrNot(i,1) = 0;
```

```
        end
```

```
    else
```

```
        State(i,1) = 1; % la sonde passe de OFF à ON
```

```
    end
```

```
else
```

```
    if State(i,1) == 1;       % conservation de l'état pour débiter l'image  
        suivante
```

```
        State(i,1) = 1;
```

```
    else
```

```
        State(i,1) = 0;
```

```

end
break
end
end
end

%%%%%%%%%%%%%% REPARTITION DES PHOTONS SUR L'IMAGE %%%%%%%%%%%%%%%
onframe=zeros(npixels,npixels);

for x=1:npixels;                                % pour chaque pixel
for y=1:npixels;
for k=1:size(cent1,1);                          % pour chaque sonde
    if BleachOrNot(k,1) == 0;
        TotalTimeON(k,1) = 0;
    else
        TotalTimeON(k,1) = TotalTimeON(k,1);
    end
    A = TotalTimeON(k,1);
    A = A*10;                                    % passage de « ms » à « photons »
    A = A*Qyield;                               % application du rendement quantique.

% répartition des photons selon une distribution de loi Normale
ERFpixel = (normcdf(x + 0.5, cent2(k), sigma) - normcdf(x - 0.5, cent2(k), sigma)) * (normcdf(y
+ 0.5, cent1(k), sigma) - normcdf(y - 0.5, cent1(k), sigma)));

    Value = ERFpixel*A;                          % intensité du pixel
    onframe(x,y) = onframe(x,y) + Value;        % ajout du pixel a l'image
end
end
end

```

```

Allframes(:,j) = oneframe;           % ajout de chaque image du jeu de donnée
end
y=mean(TotalTimeON,1);              % nombre de photon moyen par sonde
standdev=std(TotalTimeON);          % écart type

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% POST TRAITEMENT %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
poissondata = poisrnd(Allframes); % bruit de photons, selon une distribution de Poisson
l=ones(npixels,npixels,nframes);
l=l+Background;
l=poissrnd(l);
poissondata=poissondata+l;

%EMgain va multiplier le signal d'un certain facteur, selon une distribution Gamma
EMdata=gamrnd(poisondata,EMgain,npixels,npixels,nframes);

% bruit d'électrons induit par la caméra selon une distribution Normale
data=normrnd(EMdata,elecnoise,npixels,npixels,nframes);

% moyenne de toute les images
meanframe = mean(data,3);
figure;imagesc(meanframe)
telapsed = toc(tstart);
end

```

MAPPIX

```
function [ Xdis ] = dissimilaritymaps( data,ncum )
```

```
%data = données de microscopie sous la forme « n*n*X ».
```

```
%ncum = la taille du vecteur entrant dans le calcul de dissimilarité (nombre d'images). La  
taille dans la troisième dimension de data (X) doit être divisible par ce nombre.
```

```
%Xdis: résultat, jeu de donnée MAPPIX de la forme « n*n*(X/ncum) ».
```

```
ncum2=ncum-1;
```

```
[nrows ncol nframes]=size(data);
```

```
nblocks=nframes/ncum;
```

```
ind=[];
```

```
wdisloc=zeros(nrows,ncol,nblocks);
```

```
for i=1:ncum:nframes
```

```
    disp(i)
```

```
    X=data(:, :, i:i+ncum2);
```

```
    [w y objmat]=dismspe(X,nrows,ncol,ncum);
```

```
    ind=[ind,i];
```

```
    wdisloc(:, :, length(ind))=w;
```

```
end
```

```
Xdis=wdisloc;
```

```
mx=mean(Xdis,3);
```

```
end
```

```
%Calcul de dissimilarité en prenant le vecteur moyen comme référence.
```

```
function [w wgt objmat]=dismspe(X,del1,del2,del3)
```

```
Xunf=reshape(X,del1*del2,del3);
```

```
[nrow,ncol]=size(Xunf);
```

```
base1=mean(Xunf);           %Vecteur moyen.
```

```
objmat=base1./norm(base1);           %Normalisation du vecteur moyen.
y=zeros(1,del3);
wgt=zeros(nrow,1);

for ij=1:nrow
matrix=[Xunf(ij,:);objmat];
wgt(ij,1)=det(matrix*matrix');
end

w=reshape(wgt,del1,del2);
end
```


Annexe 3 : Communications scientifiques

Publications

- 1) C. Ruckebusch, R. Bernex, F. Allegrini, M. Sliwa, J. Hofkens et P. Dedecker, *Mapping Pixel Dissimilarity in Wide-Field Super-Resolution Fluorescence Microscopy*. Analytical Chemistry, 2015. 87(9): p. 4675-4682.
- 2) S. Hugelier, J. de Rooi, R. Bernex, S. Duwé, O. Devos, M. Sliwa, P. Dedecker, P. H. C. Eilers et C. Ruckebusch, *Sparse deconvolution of high-density super-resolution images*. Scientific Reports, 2016. 6: p. 21413.

Oraux

- 1) C. Ruckebusch, R. Bernex, M. Sliwa, F. Allegrini, J. de Rooi et P. H.C. Eilers, *Strategies for single-molecule fluorescence imaging data analysis*, Chemometrics in Analytical Chemistry (CAC), Juin 2014, Richmond, Virginie (USA).
- 2) C. Ruckebusch, M. Sliwa, R. Bernex, R. Metivier, J. De Rooi, P.H.C Eilers, P. Dedecker et J. Hofkens, *A chemometric approach to single-molecule superresolution imaging. From spatial to spectral selectivity*, International Association of Spectral Imaging (IASIM), Décembre 2014, Rome (Italie).
- 3) C. Ruckebusch, M. Sliwa, R. Bernex, F. Allegrini, P. Dedecker et J. Hofkens, *Mapping signal dissimilarity in super-resolution microscopy*, Quantitative Bioimaging (QBI), Janvier 2015, Paris (France).

Affiches

- 1) R. Bernex, F. Allegrini, M. Sliwa, P. Dedecker et C. Ruckebusch, *Signal dissimilarity for functional superresolution. can it be useful ?*, 20th International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences", Septembre 2014, Berlin (Allemagne).
- 2) R. Bernex, F. Allegrini, M. Sliwa, P. Dedecker et C. Ruckebusch, *Mapping pixel dissimilarity in super-resolution imaging*, International Association of Spectral Imaging (IASIM), Juillet 2016, Chamonix (France).

Références bibliographiques

1. Moerner, W.E. and L. Kador, *Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid*. Physical Review Letters, 1989. **62**(21): p. 2535-2538.
2. Hell, S.W. and J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. Optics Letters, 1994. **19**(11): p. 780-782.
3. Dedecker, P., et al., *Widely accessible method for superresolution fluorescence imaging of living systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(27): p. 10909-10914.
4. Fernandez-Suarez, M. and A.Y. Ting, *Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(12): p. 929-943.
5. Grazon, C., et al., *Ultrabright BODIPY-Tagged Polystyrene Nanoparticles: Study of Concentration Effect on Photophysical Properties*. The Journal of Physical Chemistry C, 2014. **118**(25): p. 13945-13952.
6. Reisch, A., et al., *Collective fluorescence switching of counterion-assembled dyes in polymer nanoparticles*. Nat Commun, 2014. **5**.
7. Dertinger, T., et al., *Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(52): p. 22287-22292.
8. Zhu, L., et al., *Faster STORM using compressed sensing*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 721-723.
9. Min, J., et al., *FALCON: fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data*. Sci. Rep., 2014. **4**.
10. Hugelier, S., et al., *Sparse deconvolution of high-density super-resolution images*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 21413.
11. Ruckebusch, C., et al., *Mapping Pixel Dissimilarity in Wide-Field Super-Resolution Fluorescence Microscopy*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(9): p. 4675-4682.
12. Galilée, *l'occholino, un microscope composé d'une lentille convexe et d'une autre concave* 1609.
13. Hooke, R., *Micrographia*. 1665.

14. Cinetielle, D., <https://sites.google.com/site/sciencesnaturellescinetielle/cours/svt-6e/2013-2014/1-1>.
15. Valeur, B., *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
16. Gunewardene, Mudalige S., et al., *Superresolution Imaging of Multiple Fluorescent Proteins with Highly Overlapping Emission Spectra in Living Cells*. *Biophysical Journal*, 2011. **101**(6): p. 1522-1528.
17. ZEISS, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>.
18. Würth, C., et al., *Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples*. *Nat. Protocols*, 2013. **8**(8): p. 1535-1550.
19. Berezin, M.Y. and S. Achilefu, *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging*. *Chemical reviews*, 2010. **110**(5): p. 2641-2684.
20. Ong, W.Q., et al., *Heavy water: a simple solution to increasing the brightness of fluorescent proteins in super-resolution imaging*. *Chemical Communications*, 2015. **51**(70): p. 13451-13453.
21. Zhang, X., et al., *Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016.
22. Shemiakina, I.I., et al., *A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1204.
23. Testa, I., et al., *Spatial control of pa-GFP photoactivation in living cells*. *J Microsc*, 2008. **230**(Pt 1): p. 48-60.
24. Monici, M., *Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications*, in *Biotechnology Annual Review*. 2005, Elsevier. p. 227-256.
25. Chen, X., et al., *Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives*. *Chemical Reviews*, 2012. **112**(3): p. 1910-1956.
26. López Arbeloa, F., et al., *Structural, photophysical and lasing properties of pyrromethene dyes*. *International Reviews in Physical Chemistry*, 2005. **24**(2): p. 339-374.
27. López Arbeloa, F., et al., *Photophysical and lasing properties of pyrromethene 567 dye in liquid solution.: Environment effects*. *Chemical Physics*, 1998. **236**(1-3): p. 331-341.

28. Arbeloa, F.L., P.R. Ojeda, and I.L. Arbeloa, *Flourescence self-quenching of the molecular forms of Rhodamine B in aqueous and ethanolic solutions*. *Journal of Luminescence*, 1989. **44**(1): p. 105-112.
29. Mujumdar, R.B., et al., *Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters*. *Bioconjugate Chemistry*, 1993. **4**(2): p. 105-111.
30. Seybold, P.G., M. Gouterman, and J. Callis, *Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes*. *Photochemistry and Photobiology*, 1969. **9**(3): p. 229-242.
31. Cubitt, A.B., L.A. Woollenweber, and R. Heim, *Chapter 2: Understanding Structure—Function Relationships in the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein*, in *Methods in Cell Biology*, F.S. Kevin and A.K. Steve, Editors. 1998, Academic Press. p. 19-30.
32. Iss,
http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/LifetimeDataFluorophores.html.
2016.
33. Dabbousi, B.O., et al., *(CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997. **101**(46): p. 9463-9475.
34. Han, K.Y., et al., *Metastable Dark States Enable Ground State Depletion Microscopy of Nitrogen Vacancy Centers in Diamond with Diffraction-Unlimited Resolution*. *Nano Letters*, 2010. **10**(8): p. 3199-3203.
35. Resch-Genger, U., et al., *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. *Nat Meth*, 2008. **5**(9): p. 763-775.
36. Varun, K.A.S., V.Z. Andrei, and M.G. Ewa, *Luminescent nanoparticles and their applications in the life sciences*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2013. **25**(19): p. 194101.
37. Michalet, X., et al., *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics*. *Science (New York, N.Y.)*, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
38. Nicolas, J., et al., *Quantum dot-loaded PEGylated poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for in vitro and in vivo imaging*. *Soft Matter*, 2011. **7**(13): p. 6187-6193.
39. Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2010. **368**(1915): p. 1333-1383.

40. Derfus, A.M., W.C.W. Chan, and S.N. Bhatia, *Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots*. Nano Letters, 2004. **4**(1): p. 11-18.
41. Cho, S., et al., *Simple super-resolution live-cell imaging based on diffusion-assisted Förster resonance energy transfer*. Scientific Reports, 2013. **3**: p. 1208.
42. Förster, *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **437**(1): p. 55-75.
43. Hofkens, J., et al., *Revealing competitive Förster-type resonance energy-transfer pathways in single bichromophoric molecules*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(23): p. 13146-13151.
44. Nettels, D., et al., *Excited-state annihilation reduces power dependence of single-molecule FRET experiments*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(48): p. 32304-32315.
45. Yang, R.-H., et al., *A Ratiometric Fluorescent Sensor for AgI with High Selectivity and Sensitivity*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(10): p. 2884-2885.
46. Lemmetyinen, H., et al., *Kinetic study of monomer and excimer fluorescence of pyrene-substituted phosphatidylcholine in phosphatidylcholine bilayers*. The Journal of Physical Chemistry, 1989. **93**(20): p. 7170-7175.
47. Yoo, H., et al., *Excimer Formation Dynamics of Intramolecular π -Stacked Perylenediimides Probed by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(11): p. 3939-3944.
48. MicroscopyU, <http://www.microscopyu.com/galleries/fluorescence/cells.html>.
49. Inc, O.A., <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/filters.html>. 2012.
50. Mattheyses, A.L., S.M. Simon, and J.Z. Rappoport, *Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist*. Journal of Cell Science, 2010. **123**(21): p. 3621-3628.
51. Turrel-Cuzin, C., <http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?rubrique102>. 2012.
52. Orrit, M. and J. Bernard, *Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p -terphenyl crystal*. Physical Review Letters, 1990. **65**(21): p. 2716-2719.
53. Kron, S.J. and J.A. Spudich, *Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(17): p. 6272-6276.

54. Airy, G.B., *On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture*. 1835: printed at the Pitt Press, by J. Smith.
55. Inc, O.A., <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/numaperture.html>. 2012.
56. Stefani, F.D., J.P. Hoogenboom, and E. Barkai, *Beyond quantum jumps: Blinking nanoscale light emitters*. *Physics Today*, 2009. **62**(2): p. 34-39.
57. Kohn, F., et al., *Parameters influencing the on- and off-times in the fluorescence intensity traces of single cyanine dye molecules*. *Journal of Physical Chemistry A*, 2002. **106**(19): p. 4808-4814.
58. Weston, K.D. and S.K. Buratto, *Millisecond intensity fluctuations of single molecules at room temperature*. *Journal of Physical Chemistry A*, 1998. **102**(21): p. 3635-3638.
59. Ambrose, W.P., et al., *SINGLE-MOLECULE DETECTION AND PHOTOCHEMISTRY ON A SURFACE USING NEAR-FIELD OPTICAL-EXCITATION*. *Physical Review Letters*, 1994. **72**(1): p. 160-163.
60. Bell, T.D.M., et al., *Electron transfer at the single-molecule level in a triphenylamine-perylene imide molecule*. *Chemphyschem*, 2005. **6**(5): p. 942-948.
61. Yeow, E.K.L., et al., *Characterizing the fluorescence intermittency and photobleaching kinetics of dye molecules immobilized on a glass surface*. *Journal of Physical Chemistry A*, 2006. **110**(5): p. 1726-1734.
62. Hoogenboom, J.P., et al., *Power-Law-Distributed Dark States are the Main Pathway for Photobleaching of Single Organic Molecules*. *Physical Review Letters*, 2005. **95**(9): p. 097401.
63. Zondervan, R., et al., *Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2003. **107**(35): p. 6770-6776.
64. Dempsey, G.T., et al., *Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging*. *Nature methods*, 2011. **8**(12): p. 1027-1036.
65. Lippincott-Schwartz, J. and G.H. Patterson, *Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging*. *Trends in Cell Biology*, 2009. **19**(11): p. 555-565.
66. Welman, A., et al., *Two-color photoactivatable probe for selective tracking of proteins and cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(15): p. 11607-11616.
67. Dedecker, P., et al., *Subdiffraction imaging through the selective donut-mode depletion of thermally stable photoswitchable fluorophores: Numerical analysis and*

- application to the fluorescent protein dronpa*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(51): p. 16132-16141.
68. Habuchi, S., et al., *Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(27): p. 9511-9516.
 69. Loos, D., et al., *Single-Molecule Spectroscopy Selectively Probes Donor and Acceptor Chromophores in the Phycobiliprotein Allophycocyanin*. Biophysical Journal, 2004. **87**(4): p. 2598-2608.
 70. Gustafsson, M.G.L., *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. Journal of Microscopy, 2000. **198**(2): p. 82-87.
 71. Rego, E.H., et al., *Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(3): p. E135-E143.
 72. Jarnestad, J., <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/nobel-prize-in-chemistry-for-achievements-in-super-resolution-microscopy/>. Science Lab, 2014.
 73. Imaging, S.V., <https://svi.nl/STEDMicroscopy>. 2016.
 74. Wijetunge, L.S., et al., *Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy Reveals Nanoscale Defects in the Developmental Trajectory of Dendritic Spine Morphogenesis in a Mouse Model of Fragile X Syndrome*. The Journal of Neuroscience, 2014. **34**(18): p. 6405-6412.
 75. Lau, L., et al., *STED Super-resolution Microscopy in Drosophila Tissue and in Mammalian Cells*. Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering, 2011. **7910**: p. 79101N.
 76. Hell, S.W., *Toward fluorescence nanoscopy*. Nat Biotech, 2003. **21**(11): p. 1347-1355.
 77. Hofmann, M., et al., *Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(49): p. 17565-17569.
 78. Muller, C.B. and J. Enderlein, *Image scanning microscopy*. Phys Rev Lett, 2010. **104**(19): p. 198101.
 79. Betzig, E., et al., *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-5.

80. Hess, S.T., T.P.K. Girirajan, and M.D. Mason, *Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy*. *Biophysical Journal*, 2006. **91**(11): p. 4258-4272.
81. Rust, M.J., M. Bates, and X.W. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. *Nature Methods*, 2006. **3**(10): p. 793-795.
82. Heilemann, M., et al., *Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes*. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2008. **47**(33): p. 6172-6176.
83. Van De Linde, S., et al., *Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes*. *Nature Protocols*, 2011. **6**(7): p. 991-1009.
84. Shroff, H., et al., *Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics*. *Nature Methods*, 2008. **5**(5): p. 417-423.
85. Patterson, G., et al., *Superresolution imaging using single-molecule localization*, 2010. p. 345-367.
86. Heilemann, M., et al., *Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009. **48**(37): p. 6903-6908.
87. Allen, J.R., S.T. Ross, and M.W. Davidson, *Single molecule localization microscopy for superresolution*. *Journal of Optics (United Kingdom)*, 2013. **15**(9).
88. Stefan, W.H., et al., *The 2015 super-resolution microscopy roadmap*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015. **48**(44): p. 443001.
89. van de Linde, S., et al., *The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging*. *Journal of Biotechnology*, 2010. **149**(4): p. 260-266.
90. Kampmann, M., et al., *Mapping the orientation of nuclear pore proteins in living cells with polarized fluorescence microscopy*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(6): p. 643-649.
91. Reisch, A. and A.S. Klymchenko, *Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging*. *Small*, 2016. **12**(15): p. 1968-92.
92. Holden, S.J., S. Uphoff, and A.N. Kapanidis, *DAOSTORM: An algorithm for high-density super-resolution microscopy*. *Nature Methods*, 2011. **8**(4): p. 279-280.
93. Babcock, H., Y.M. Sigal, and X. Zhuang, *A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy*. *Optical Nanoscopy*, 2012. **1**(1): p. 1-10.

94. Quan, T., et al., *High-density localization of active molecules using Structured Sparse Model and Bayesian Information Criterion*. Optics Express, 2011. **19**(18): p. 16963-16974.
95. Wang, Y., et al., *PALMER: A method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy*. Optics Express, 2012. **20**(14): p. 16039-16049.
96. Mukamel, Eran A., H. Babcock, and X. Zhuang, *Statistical Deconvolution for Superresolution Fluorescence Microscopy*. Biophysical Journal, 2012. **102**(10): p. 2391-2400.
97. Babcock, H.P., et al., *Fast compressed sensing analysis for super-resolution imaging using L1-homotopy*. Optics Express, 2013. **21**(23): p. 28583-28596.
98. Sage, D., et al., *Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy*. Nat Meth, 2015. **12**(8): p. 717-724.
99. Holden, S. and D. Sage, *Imaging: Super-resolution fight club*. Nat Photon, 2016. **10**(3): p. 152-153.
100. Cox, S., et al., *Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics*. Nature Methods, 2012. **9**(2): p. 195-200.
101. Hebert, B., S. Costantino, and P.W. Wiseman, *Spatiotemporal Image Correlation Spectroscopy (STICS) Theory, Verification, and Application to Protein Velocity Mapping in Living CHO Cells*. Biophysical Journal, 2005. **88**(5): p. 3601-3614.
102. Geissbuehler, S., C. Dellagiacomma, and T. Lasser, *Comparison between SOFI and STORM*. Biomedical Optics Express, 2011. **2**(3): p. 408-420.
103. Dertinger, T., et al., *Achieving increased resolution and more pixels with Superresolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI)*. Optics Express, 2010. **18**(18): p. 18875-18885.
104. Huss, A. and J. Enderlein. *Stochastic optical fluctuation imaging*. 2012.
105. Dertinger, T., et al., *Superresolution Optical Fluctuation Imaging with Organic Dyes*. Angewandte Chemie-International Edition, 2010. **49**(49): p. 9441-9443.
106. Moeyaert, B. and P. Dedecker, *pcSOFI as a Smart Label-Based Superresolution Microscopy Technique*, in *Photoswitching Proteins: Methods and Protocols*, S. Cambridge, Editor. 2014, Springer New York: New York, NY. p. 261-276.
107. Vandenberg, W., et al., *Model-free uncertainty estimation in stochastic optical fluctuation imaging (SOFI) leads to a doubled temporal resolution*. Biomedical Optics Express, 2016. **7**(2): p. 467-480.

108. Jiang, S., et al., *Enhanced SOFI algorithm achieved with modified optical fluctuating signal extraction*. Optics Express, 2016. **24**(3): p. 3037-3045.
109. Grazon, C., et al., *Ultrabright Fluorescent Polymeric Nanoparticles Made from a New Family of BODIPY Monomers*. Macromolecules, 2013. **46**(13): p. 5167-5176.
110. Wolfbeis, O.S., *An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging*. Chemical Society Reviews, 2015. **44**(14): p. 4743-4768.
111. PIARD, et al., *Photoswitching in diarylethene nanoparticles, a trade-off between bulk solid and solution: towards balanced photochromic and fluorescent properties*. Vol. 33. 2009, Paris, FRANCE: CNRS. 7.
112. Zhu, M.-Q., et al., *Reversible Fluorescence Switching of Spiropyran-Conjugated Biodegradable Nanoparticles for Super-Resolution Fluorescence Imaging*. Macromolecules, 2014. **47**(5): p. 1543-1552.
113. Métivier, R., et al., *Fluorescence Photoswitching in Polymer Matrix: Mutual Influence between Photochromic and Fluorescent Molecules by Energy Transfer Processes*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(27): p. 11916-11926.
114. Su, J.F., T; Placial, JP; Onodera, T; Suzuki, R; Oikawa, H; Brosseau, A; Brisset, F; Pansu, R; Nakatani, K; Metivier, R, *Giant Amplification of Photoswitching by a Few Photons in Fluorescent Photochromic Organic Nanoparticles*. Angewandte Chemie - International Edition, 2016. **55**: p. 3662-3666.
115. Li, K. and B. Liu, *Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(18): p. 6570-6597.
116. Trofymchuk, K., et al., *Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots*. Nanoscale, 2014. **6**(21): p. 12934-12942.
117. Behnke, T., et al., *Simple strategies towards bright polymer particles via one-step staining procedures*. Dyes and Pigments, 2012. **94**(2): p. 247-257.
118. Wagh, A., S.Y. Qian, and B. Law, *Development of Biocompatible Polymeric Nanoparticles for in Vivo NIR and FRET Imaging*. Bioconjugate Chemistry, 2012. **23**(5): p. 981-992.
119. Martín, V., et al., *Photophysical and Lasing Properties of Rhodamine 6G Confined in Polymeric Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(10): p. 3926-3933.
120. Monguzzi, A., et al., *Laser dye doped nanoparticles for highly photostable optical nanoamplifiers*. RSC Advances, 2012. **2**(31): p. 11731-11736.

121. Würthner, F., T.E. Kaiser, and C.R. Saha-Möller, *J-Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(15): p. 3376-3410.
122. Jelley, E.E., *Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State*. Nature, 1936. **138**: p. 1009-1010.
123. Pucci, A. and G. Ruggeri, *Mechanochromic polymer blends*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(23): p. 8282-8291.
124. An, B.-K., et al., *Enhanced Emission and Its Switching in Fluorescent Organic Nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(48): p. 14410-14415.
125. Wu, W.-C., et al., *Enhancement of Aggregation-Induced Emission in Dye-Encapsulating Polymeric Micelles for Bioimaging*. Advanced Functional Materials, 2010. **20**(9): p. 1413-1423.
126. Li, K., et al., *Organic Dots with Aggregation-Induced Emission (AIE Dots) Characteristics for Dual-Color Cell Tracing*. Chemistry of Materials, 2013. **25**(21): p. 4181-4187.
127. Meallet-Renault, R., et al., *Novel BODIPY preparations from sterically hindered pyrroles. Synthesis and photophysical behavior in solution, polystyrene nanoparticles, and solid phase*. Russian Journal of General Chemistry, 2008. **78**(11): p. 2247-2256.
128. Reisch, A., et al., *Charge-Controlled Nanoprecipitation as a Modular Approach to Ultrasmall Polymer Nanocarriers: Making Bright and Stable Nanoparticles*. ACS Nano, 2015. **9**(5): p. 5104-5116.
129. Tian, Z., A.D. Shaller, and A.D.Q. Li, *Twisted perylene dyes enable highly fluorescent and photostable nanoparticles*. Chemical Communications, 2009(2): p. 180-182.
130. Lin, H., et al., *Collective Fluorescence Blinking in Linear J-Aggregates Assisted by Long-Distance Exciton Migration*. Nano Letters, 2010. **10**(2): p. 620-626.
131. Bout, D.A.V., et al., *Discrete Intensity Jumps and Intramolecular Electronic Energy Transfer in the Spectroscopy of Single Conjugated Polymer Molecules*. Science, 1997. **277**(5329): p. 1074-1077.
132. Hofkens, J., et al., *Probing Photophysical Processes in Individual Multichromophoric Dendrimers by Single-Molecule Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(38): p. 9278-9288.
133. Cichos, F., C. von Borczyskowski, and M. Orrit, *Power-law intermittency of single emitters*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2007. **12**(6): p. 272-284.

134. Colby, K.A., et al., *Electronic Energy Migration on Different Time Scales: Concentration Dependence of the Time-Resolved Anisotropy and Fluorescence Quenching of Lumogen Red in Poly(methyl methacrylate)*. The Journal of Physical Chemistry A, 2010. **114**(10): p. 3471-3482.
135. Ghiggino, K.P., et al., *The Dynamics of Electronic Energy Transfer in Novel Multiporphyrin Functionalized Dendrimers: A Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(12): p. 2596-2606.
136. Flors, C., et al., *Energy and Electron Transfer in Ethynylene Bridged Perylene Diimide Multichromophores*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(12): p. 4861-4870.
137. Grazon, C., *Elaboration of BODIPY fluorescent nanoparticules via a RAFT polymerisation in miniemulsion : synthesis, characterisation and surface functionalisation*, 2012, École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan.
138. Grazon, C., et al., *One-Pot Synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT Miniemulsion Polymerization Using a Phase Inversion Process*. Macromolecular Rapid Communications, 2011. **32**(9-10): p. 699-705.
139. Whited, M.T., et al., *Symmetry-breaking intramolecular charge transfer in the excited state of meso-linked BODIPY dyads*. Chemical Communications, 2012. **48**(2): p. 284-286.
140. Würth, C., et al., *Determination of the absolute fluorescence quantum yield of rhodamine 6G with optical and photoacoustic methods – Providing the basis for fluorescence quantum yield standards*. Talanta, 2012. **90**: p. 30-37.
141. Alvarez, M., et al., *Photophysical and laser emission studies of 8-polyphenylene-substituted BODIPY dyes in liquid solution and in solid polymeric matrices*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2008. **7**(7): p. 802-813.
142. Vu, T.-T., *Optimization of the fluorescence properties of BODIPY derivatives by tuning the nature of the substituents*, 2011, École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan.
143. Masuo, S., et al., *Multichromophoric Dendrimers as Single-Photon Sources: A Single-Molecule Study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(43): p. 16686-16696.
144. Debus, B., et al., *Multivariate curve resolution — alternating least squares to cope with deviations from data bilinearity in ultrafast time-resolved spectroscopy*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2013. **128**: p. 101-110.

145. Groot, M.-L., et al., *Radical Pair Quantum Yield in Reaction Centers of Photosystem II of Green Plants and of the Bacterium Rhodobacter sphaeroides. Saturation Behavior with Sub-picosecond Pulses*. The Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(39): p. 7869-7873.
146. Ribierre, J.C., et al., *Influence of the dendron chemical structure on the photophysical properties of bisfluorene-cored dendrimers*. The Journal of Chemical Physics, 2008. **128**(20): p. 204703.
147. MATLAB. The Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, USA
148. Dedecker, P., et al., *Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for superresolution microscopy*. Journal of biomedical optics, 2012. **17**(12): p. 126008.
149. Barrett, H.H., et al., *Maximum-Likelihood Methods for Processing Signals From Gamma-Ray Detectors*. IEEE Transactions on Nuclear Science, 2009. **56**(3): p. 725-735.
150. Basden, A.G., C.A. Haniff, and C.D. Mackay, *Photon counting strategies with low-light-level CCDs*. Monthly Notices of the Royal Astronomical Society, 2003. **345**(3): p. 985-991.
151. Plakhotnik, T., A. Chennu, and A.V. Zvyagin, *Statistics of single-electron signals in electron-multiplying charge-coupled devices*. IEEE Transactions on Electron Devices, 2006. **53**(4): p. 618-622.
152. Cuesta Sánchez, F., et al., *Orthogonal projection approach applied to peak purity assessment*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(1): p. 79-85.
153. Windig, W., 2.17 - *Two-Way Data Analysis: Detection of Purest Variables A2 - Brown, Steven D*, in *Comprehensive Chemometrics*, R. Tauler and B. Walczak, Editors. 2009, Elsevier: Oxford. p. 275-307.
154. Hoogendoorn, E., et al., *The fidelity of stochastic single-molecule super-resolution reconstructions critically depends upon robust background estimation*. Scientific Reports, 2014. **4**.
155. GmbH, P., https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf. 2014.
156. Eaton, D.F., *Recommended methods for fluorescence decay analysis*, in *Pure and Applied Chemistry* 1990. p. 1631.
157. Boens, N., et al., *Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(5): p. 2137-2149.

