Thèse de doctorat

Spécialité : Sciences Physiques

présentée et soutenue publiquement par

Marie-Pierre Adam

pour obtenir le grade de Docteur de L'Ecole Normale Supérieure de Cachan

Le 28 Octobre 2013

Développements de microscopies optiques pour l'imagerie super-résolue de nanocristaux de diamant fluorescents comme rapporteurs d'anomalies fonctionnelles du neurone.

devant le jury composé de :

M. Christophe Dujardin	Président de jury
Mme. Maïté Coppey-Moisan	Examinateur
M. Jean-Jacques Greffet	Examinateur
Mme. Sandrine Lévêque-Fort	Rapporteur
M. Xavier Quélin	Rapporteur
M. François Treussart	Directeur de thèse
M. Michel Simonneau	Co-directeur de thèse

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit est le fruit d'un travail collectif, auquel a contribué un grand nombre de personnes que j'ai côtoyé pendant ces trois années de thèse, à Cachan et ailleurs. Ce fut un réel plaisir de partager avec vous tous les heures en salle de manip, les discussions scientifiques ou non scientifiques, autour d'un café, d'un chocolat, ou d'un gâteau au Rhum. Toutes vos contributions ont apporté une grande valeur ajoutée à ce manuscrit, et je tiens à vous en remercier chaleureusement ici.

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier mes deux directeurs de thèse, Michel Simonneau et mon encadrant principal François Treussart. François, je te suis très reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée et de la grande autonomie dont j'ai pu profiter le long de ces trois années. J'ai beaucoup appris en travaillant avec toi, tant sur un plan expérimental que sur des notions plus théoriques, grâce à ta grande culture scientifique, mais aussi grâce à tes collaborations très riches, qui m'ont permis de rencontrer différentes équipes et de participer à des études très variées. Merci également pour ta disponibilité, notamment pendant la rédaction de la thèse, et pour ces trois années ô combien enrichissantes.

Michel, tu m'as fait découvrir les neurosciences, un domaine complètement nouveau pour moi. C'est avec une infinie patience que tu sais transmettre tes connaissances, même quand tu t'adresses à des physiciens novices comme moi, et pour ça je te remercie. D'autre part, ton optimisme à toute épreuve fut d'un grand réconfort pour affronter les obstacles et imprévus liés au travail avec des cellules vivantes. Je suis très heureuse d'avoir pu participer à cette aventure avec ton équipe.

J'ai été accueillie pour ses trois années de thèse, dans un laboratoire formidable, et je souhaiterais exprimer toute ma gratitude à Isabelle Ledoux-Rak, la directrice du LPQM, qui a toujours su me témoigner son soutien.

Un grand merci également à Sandrine Lévêque-Fort et Xavier Quélin d'avoir rapporté avec soin ce travail de thèse, ainsi qu'à Jean-Jacques Greffet, Maïté Coppey-Moisan et Christophe Dujardin d'avoir accepté de faire partie du jury.

Un large pan de mon travail de thèse fut axé sur la microscopie STED, et m'a conduite à rencontrer différentes équipes entre Palaiseau et l'Allemagne. Je tiens à remercier tout d'abord Stefan Hell et Silvia Arroyo-Camejo pour leur excellent accueil à Göttingen, à l'Institut Max Planck pour la Biophysique et la Chimie, où j'ai eu le plaisir de travailler pendant quelques mois. En particulier, Silvia, tu as montré dès le début de notre collaboration énormément d'enthousiasme et d'implication dans ce projet. Ta rigueur scientifique, ta persévérance nous ont permis d'en dénouer les nœuds, toujours dans une atmosphère extrêmement conviviale et je t'en remercie. Je garde de très bon souvenirs des moments passés en salle de manip puis à l'extérieur, et je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite de ta thèse.

Pour les simulations numériques, nous avons bénéficié de l'aide de Jean-Paul Hugonin, Mondher Besbes et Jean-Jacques Greffet, du Laboratoire Charles Fabry. Avec beaucoup de gentillesse, ils ont mené à bien autant de calculs qu'il y a eu de rebondissements et d'expériences contradictoires dans ce projet, et je les en remercie grandement. Jean-Jacques, je te suis reconnaissante aussi pour les longues et nombreuses discussions que nous avons eues, avant de finalement comprendre le fin mot de l'histoire.

Pour conclure notre étude sur les nanoparticules de diamant, nous avons eu besoin de la microscopie électronique. Je voudrais adresser un grand merci à Felicitas Predel et Peter Van Aken, du Centre de microscopie électronique de Stuttgart, pour les très belles images qu'ils nous ont fournies, ainsi qu'à Sophie Meuret, Luiz Tizei et Mathieu Kociak, du Laboratoire de Physique des Solides d'Orsay, pour leur aide dans nos investigations et les discussions que nous avons eues.

En ce qui concerne les applications à la biologie, je souhaiterais remercier tout d'abord les membres de l'équipe de Michel, et particulièrement Aude-Marie Lepagnol-Bestel, qui a réalisé un grand nombre de cultures cellulaires, avant que Simon Haziza ne prenne la relève. Un grand merci à tous les deux, l'exercice de préparation de neurones primaires est loin d'être aisé et demande beaucoup de pratique.

C'est avec Jacques Botsoa que j'ai partagé la salle de manip lors de mon stage de Master, et fait mes premières images de cellules, puis Xuan-Loc Le a rejoint l'équipe pendant un an. Loc, tu as été d'une grande aide pour les différents montages optiques de l'équipe, nos discussions et tes nombreuses idées m'ont beaucoup fait avancer et je t'en remercie. Je me souviendrai des longues heures dans le noir à dénicher les diamants en mouvement dans les cellules. Aujourd'hui, Simon, Sophie et Nitin ont amélioré la méthode et poursuivent ce travail, je leur souhaite beaucoup de succès.

Au cours de la thèse, j'ai eu la chance de participer à certains projets en marge de mon projet principal. Ce fut très enrichissant pour moi, et je suis reconnaissante pour le très bon accueil que ces équipes m'ont offert. Merci à Yvan Rehor et Ptr Cigler, de l'Institut de Chimie organique et Biochimie de l'Académie de Sciences de la République tchèque, pour leur collaboration très productive et chaleureuse.

J'ai une pensée également pour l'équipe de l'Institut Gustave Roussy, et notamment Anna Al Haddad et Jean-Rémi Bertrand, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et dont la collaboration a abouti à de jolis résultats, bien qu'ils ne figurent pas dans le manuscrit.

Pour la majorité des expériences réalisées lors de cette thèse, nous avons eu recours à un grand nombre de particules de diamant fluorescentes, et je voudrais exprimer ma gratitude aux équipes qui nous les ont généreusement procurées pendant ces trois années. Merci à Géraldine Dantelle et Sandrine Perruchas du laboratoire de Physique et de la Matière Condensée, et merci à Huan-Cheng Chang de l'Institut de Sciences Atomique et Moléculaire de Taipei. Je souhaite remercier également Yan-Kai Tzeng pour son très bon accueil à Taipei, où j'ai séjourné deux semaines au début de ma thèse.

J'ai eu le bonheur de travailler dans un environnement très agréable, et de côtoyer jour après jour, dans les couloirs de l'ENS Cachan, des personnes remarquables que j'aimerais remercier vivement. En particulier, je tiens à saluer les autres membres de l'équipe Nanophotonique quantique, et notamment Jean-François Roch et Vincent Jacques pour les discussions que nous avons partagées, leurs conseils avisés, leur soutien.

Merci à Loïc, qui m'a guidée avec bienveillance dans le labo et initiée aux joies de l'AFM notamment, à la fabrication d'échantillon, puis aux pneus psychopathes aussi. Merci à Ludo, pour son attention, ses gâteaux savoureux et ses anecdotes croustillantes. Merci à Anaïs surtout, voisine à Alesia comme sur la table optique, avec qui j'ai partagé les joies, les cafés, la musique, les galères et les chocolats. Dommage qu'on n'ai jamais

sauté sur notre table finalement. J'ai une pensée aussi pour les stagiaires, Marie, Louise, Géraud, Amaudric, qui m'ont épaulée pendant quelques mois. Et puis vous les djeun's, Jean-Philippe, Thomas, Margarita, Pierre, qui avez pris grand soin de vos anciens surtout dans les derniers mois, je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite pour les années à venir.

Un grand merci aux autres membres du LPQM, et notamment Clément, rayon de soleil du labo, organisateur en chef des barbecues, parties de foot et sushi clubs. Nos pauses cafés ont toujours été d'un grand réconfort, comme les parties de volley avec Yi et Qinggele, les midis sushi avec Iryna, Xiao, Trang, etc... Merci aussi à Joseph Lautru, pour les lames bien utiles qu'il grave et revêt d'or, bien que je le fasse fondre parfois.

Je suis reconnaissante également envers le département de Physique, où j'ai eu un grand plaisir à enseigner, grâce à Emmanuelle Deleporte qui m'a confié un monitorat, et à apprendre aussi. Je remercie les enseignants et responsables techniques, toujours disponibles et souriants, Jean-Baptiste, Jean, Luc, Jean-Luc, Emmanuel et enfin Christian, qui m'a notamment transmis quelques rudiments en mécanique, non sans casse. Puis merci infiniment à Zina, pour tous les services rendus quotidiennement, ainsi que Gynette du LPQM, Christine Rose et Sophie Garus de l'école doctorale.

Enfin, je souhaiterais adresser ces dernières lignes à tous ceux qui m'ont entourée et soutenue depuis trois ans et plus encore, dans les heures passées en dehors du labo. Je pense tout d'abord à ma famille, que je remercie affectueusement, et surtout mes p'tites sœurs chéries, pour leur écoute attentive même quand il s'agit de physique.

De Vda à Palaiseau et Orsay, en passant par Versailles, puis Paris, ces trois années n'auraient pas été pareilles sans la présence solide des amis, des potes, des copines. Mille mercis aux dagovéraniennes, aux super copines, à la bande de Bures et nos virées chez Georges ou au Mad Maker, aux karaokés, aux quiz, puis aux bières du dimanche soir, quand on y arrive. Une dédicace spéciale à toute l'équipe de volley de Cachan, et son soutien infaillible, avec un léger goût de citron vert.

Je voudrais remercier tout particulièrement mes deux colocs, Mimi et Olichou, nos p'tits diners, les pique-niques sur le toit et les soirées déguisées vont beaucoup me manquer. Un énorme merci aux autres toits qui m'ont accueillie, nourrie et tenue chaud, la coloc de PdV et l'ex maison de Cachan. Cédric et Delph vous êtes top, tout comme votre poulet coco, Peyo et Guim's ne soyez pas jaloux j'adore aussi vos pâtes bolo, mais je dois dire que je préfère par dessus tout ton poulet au citron Lucas.

Je vous embrasse.

Table des matières

Remerciements **3**

Table des matières **11**

Introduction **13**

1 Réalisation d'un microscope STED, résolu en dessous de la limite de diffraction, pour les centres NV du diamant **21**

1.1 Principe de la microscopie STED 22

1.1.1 Réduction du volume de fluorescence 22

1.1.2 Emission stimulée 23

1.1.3 Application de la technique STED à l'imagerie du centre NV^- dans le diamant 26

1.2 Réalisation du microscope STED 27

1.2.1 Montage 27

1.2.2 Mise en évidence de l'émission stimulée 29

1.2.3 Structuration du faisceau 30

1.3 Résultats 33

1.3.1 Diamant massif 33

1.3.2 Microscopie STED appliquée à des nanoparticules de diamant fluorescentes 34

1.4 Conclusion 37

2 Imagerie de centres NV dans des nanoparticules de diamant par microscopie STED **39**

2.1 Imagerie de centres NV uniques dans des nanodiamants de différentes tailles 40
2.1.1 Identification des ND contenant un centre NV unique et mesure de leur taille . . . 40
2.1.2 Images STED de centres NV dans des nanodiamants . . . 43
2.1.3 Observations complémentaires et discussion . . . 47
2.1.4 Interprétation des résultats . . . 50
2.2 Imagerie STED de nanodiamants contenant plusieurs centres colorés NV 52
2.2.1 Images STED . . . 52
2.2.2 Détermination de la présence de cristaux uniques . . . 54
2.2.3 Interprétation finale . . . 63
2.3 Conclusion . . . 66

3 Application des nanodiamants fluorescents à l'étude du trafic dans les dendrites de neurones primaires d'embryons de souris. 69
3.1 Anomalies de trafic dans les neurones . . . 70
3.2 Internalisation de ND dans les neurones et localisation intracellulaire . . 71
3.2.1 Internalisation spontanée des ND dans des neurones primaires de souris . . . 71
3.2.2 Recherche de colocalisation des ND avec des compartiments vésiculaires post-Golgi . . . 77
3.3 Étude du trafic de nanodiamants dans les dendrites . . . 82
3.3.1 Microscope pour l'observation des neurones vivants . . . 83
3.3.2 Étude des trajectoires : types de mouvement, vitesse et processivité 86
3.3.3 Le mouvement est dépendent du réseau de microtubules : expérience du Nocodazol . . . 90
3.3.4 Discussion et nouvelles stratégies en cours de développement . . . 92

4 Contribution à l'étude de la fonctionalisation des nanodiamants fluorescents par des biomolécules 93
4.1 Enrobage des nanodiamants par une coquille de silice fonctionnalisée . . 94
4.2 Analyse de la fonctionnalisation par fluorescence, sur ND unique . . . 95
4.3 Fraction de ND ne contenant pas de centres NV . . . 97
4.3.1 Non-emission des nanodiamants fonctionalisés (Zh10-FC) dans le canal rouge . . . 97
4.3.2 Emission des nanodiamants entourés de silice (Zh10-PEG) dans le canal vert . . . 98

Conclusion **101**

A Évolution des populations d'un système à 4 niveaux en présence des faisceaux d'excitation et STED (régime impulsionnel). **105**

B Evolution des populations d'un système à 4 niveaux en présence des faisceaux d'excitation et STED (régime continu). **109**

C Propriétés photophysiques des centres NV **111**

C.1 Absorption et émission des centres NV 111

C.2 Comparaison de la fluorescence d'un centre NV avec une molécule et un cristal semi-conducteur 112

Bibliographie **123**

Résumé/Abstract **124**

Introduction

Le travail de thèse que j'ai effectué au laboratoire de photonique quantique et moléculaire (LPQM) sous la direction de François Treussart, s'inscrit dans la thématique d'utilisation de nanocristaux de diamant fluorescents en biologie, notamment en imagerie cellulaire. Cette activité s'est développée au LPQM grâce aux collaborations avec des équipes de biologistes et de chimistes, et notamment avec l'équipe de Michel Simonneau qui co-encadre cette thèse. L'équipe de Michel Simonneau appartient au Centre de Psychiatrie et Neurosciences (CPN), qui est une unité mixte INSERM et Université Paris Descartes U894, localisée à l'hôpital Sainte-Anne à Paris. Cette équipe s'intéresse depuis quelques années plus particulièrement à **l'identification de variants rares de gènes** impliqués dans des pathologies neuropsychiatriques, qui ont une répercussion sur le fonctionnement neuronal.

L'analyse de ce fonctionnement au niveau cellulaire a été largement développée grâce à l'utilisation de molécules fluorescentes, pouvant cibler des compartiments cellulaires par immunomarquage ou bien être directement produits par la cellule après transfection d'un plasmide codant pour une protéine de fusion avec une protéine fluorescente telle que la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Plus récemment, l'utilisation de **nanoparticules fluorescentes** est apparue comme alternative prometteuse, permettant de pousser les limites de la microscopie de fluorescence. En effet, la principale limitation des fluorophores est leur courte durée d'observation, de l'ordre quelques secondes, avant leur photoblanchiement irréversible, alors que les nanoparticules inorganiques telles que les nanocristaux semi-conducteurs (QDots) cœur-coquille de type CdSe/ZnS sont photostables pendant plusieurs heures [1, 2]. De ce fait, les nanoparticules fluorescentes sont particulièrement bien adaptées pour des suivis sur le long terme [3, 4], pour l'imagerie *in vivo* [5, 6].

Malgré des atouts certains, les QDots ont encore au moins deux défauts qui freinent

certaines de leurs applications : (i) leur intensité de fluorescence est intermittente (scintillement) et est aussi fortement dépendante de l'environnement physicochimique [7] ; (ii) des études indiquent que les QDots présentent une plus forte toxicité cellulaire que les particules composées de carbone par exemple [8, 9], en raison probablement de la présence de métaux lourds dans leur composition. Ainsi, des nanoparticules qui seraient dépourvues de ces défauts tout en conservant une brillance comparable à celle des QDots, présentent-elle un intérêt certain pour l'imagerie en biologie.

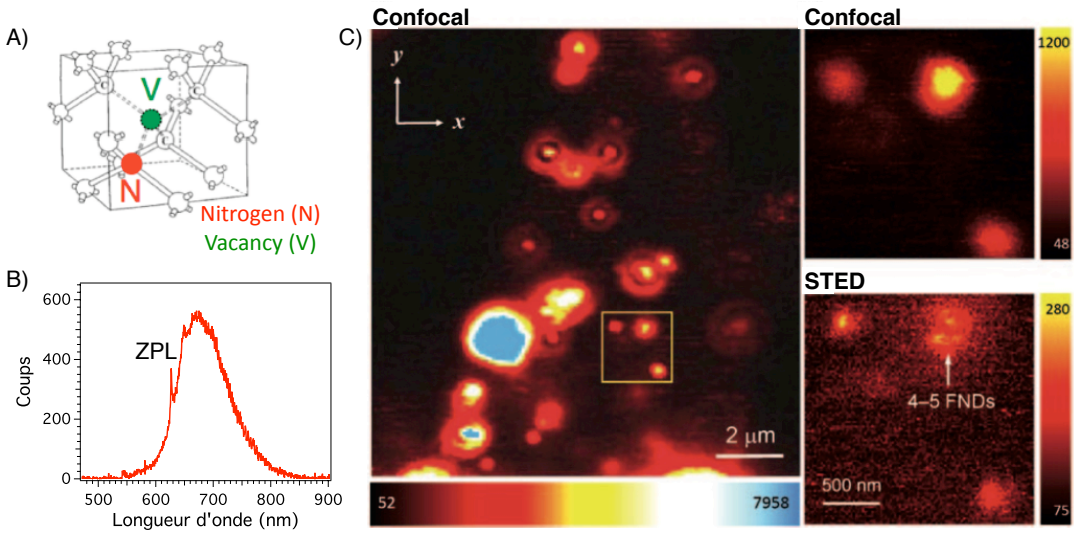

Figure 1 : *A) Centre coloré azote-lacune (NV) dans la maille de diamant. En première approximation, le centre NV peut être considéré comme un émetteur à deux niveaux qui absorbe dans le vert et ré-émet dans le rouge, comme le montre le spectre d'émission en figure B). La raie zéro-phonon (*Zero Phonon Line*, ZPL) de la forme négativement chargée NV^- se trouve autour de 637 nm. C) Images de fluorescence confocales et STED (résolution $\approx$ 40 nm) de nanodiamants fluorescents (contenant des centres NV) dans une culture de cellules HeLa, issues de la Ref. [10]. L'image STED permet de révéler la présence d'agrégats de nanodiamants.*

C'est dans ce contexte que nos équipes utilisent des **nanocristaux de diamant** qui sont rendus fluorescents (*Fluorescent NanoDiamond*, FND) par la création au sein de la maille cristalline de centres colorés azote-lacune (*Nitrogen Vacancy*, NV). Le centre coloré NV du diamant est un défaut du diamant dans lequel deux atomes de carbone voisins sont substitués, l'un par un atome d'azote et une lacune [1], comme illustré sur la Figure 1-A) et B). L'une des nombreuses propriétés remarquables du centre NV est

1. L'azote est un atome impureté naturellement présent dans le diamant, tandis que la lacune est créée artificiellement par irradiation à l'aide d'un faisceau de particules énergétiques. L'optimisation des paramètres d'irradiation et de traitement de surface a permis la production en masse de FND très brillants et compatibles pour les observations cellulaires [11]

d'être parfaitement photostable, même à température ambiante, ce qui représente un avantage majeur pour le suivi sur le long terme et pour la microscopie super-résolue STED (*STimulated Emission Depletion*), qui nécessite de très fortes puissances d'excitation lumineuse [12]. La microscopie STED a d'ailleurs déjà été appliquées aux FND internalisés dans des cellules en culture, dans une expérience pionnière où cette technique a permis de révéler que selon leur chimie de surface, ils pouvaient former de petits agrégats une fois internalisés (Fig. 1-C)).

Avec l'équipe de Michel Simonneau nous proposons d'essayer d'identifier des variants génétiques rares par la recherche de leur impact morphologique et/ou fonctionnel en utilisant les nanodiamants fluorescents :

1. *impact morphologique* : nous recherchons des anomalies **d'organisation macromoléculaire** dans les épines dendritiques, où se déroule la communication chimique entre neurones,
2. *impact fonctionnel* : nous recherchons des **anomalies de trafic** dendritique (à l'intérieur des dendrites, mais aussi au niveau des récepteurs membranaires de neurotransmetteurs).

Pour commencer à explorer ces questions, nous avons développé et utilisé *deux dispositifs de microscopies optiques* adaptés à l'observation des FND, dans des cultures primaires de neurones dissociés du cortex d'embryons de souris : (i) l'un résolu en dessous de la limite de diffraction (microscope STED), pour imager l'organisation macromoléculaire, et (ii) l'autre, de microscopie à champ large en illumination par réflexion totale interne (TIRF) pour le suivi du déplacement des FND avec une grande sensibilité et grande précision de positionnement, les neurones étant maintenus vivants durant les observations grâce à une chambre d'incubation.

Stratégie pour l'étude de l'organisation macromoléculaire au sein des épines dendritiques

Les neurones sont des cellules dont le corps cellulaire, de diamètre allant de la dizaine à la centaine de microns, possèdent de très nombreuses et très longues ramifications, l'axone et les dendrites. La zone d'interaction fonctionnelle entre deux neurones implique les terminaisons de prolongement dits axonaux (éléments présynaptiques) et des éléments dits dendritiques (structures postsynaptiques), comme représentés sur la Figure 2.

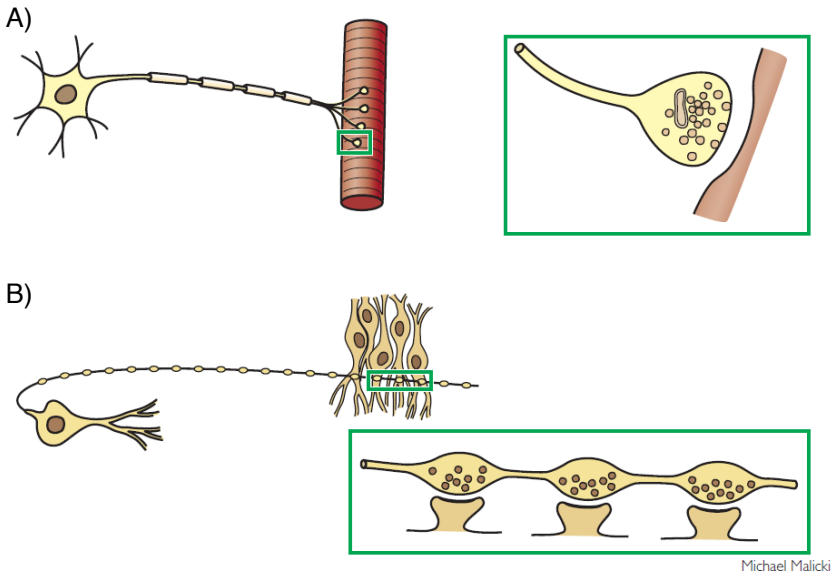

Figure 2 : *Organisation générale des synapses (d'après la Ref. [13]). A) Organisation des synapses du système nerveux périphérique entre motoneurone et fibre musculaire. B) Organisation des synapses du système nerveux central entre l'axone d'un neurone pyramidal CA3 de l'hippocampe et les dendrites de neurones CA1 de l'hippocampe. Les morphologies diffèrent mais l'organisation moléculaire est conservée.*

La majorité des contacts synaptiques ont lieu au niveau des épines dendritiques, qui sont des petites excroissances qui apparaissent le long des dendrites. Leur morphologie est semblable à celle d'un champignon : elles sont constituées d'une "tête" et d'un "cou". La longueur moyenne d'une épine est d'environ 1 micron et la largeur du cou de l'ordre de la centaine de nanomètres. Il existe cependant une très grande variété de tailles et formes d'épines, que l'on qualifie alors de "minces" ou "trapues", et leur morphologie évolue lors du développement du neurone [14–16]. Les épines de la première catégorie, les épines "minces", participent grandement à la plasticité synaptique en changeant de forme avec l'activité des synapses, et sont souvent associée à la capacité d'apprentissage du cerveau. Le diamètre de la tête influe sur la concentration de récepteurs AMPA, qui communiquent avec la synapse, et la longueur ainsi que diamètre du cou influencent la dynamique du Ca^{2+} postsynaptique, régulée par les récepteurs NMDA. La morphologie des épines est donc un indicateur de l'activité synaptique, et peut ainsi révéler des anomalies fonctionnelles des neurones [17, 18]. Des liens entre morphologie des épines et maladies neurodégénératives ont notamment été mis en évidence dans le cas de la maladie d'Alzheimer [19, 20], de la schizophrénie [21], ou bien de retards mentaux [22, 23].

La famille de protéines Homer, située principalement dans les structures postsynaptiques, joue un rôle crucial dans la maturation et l'architecture des épines dendri-

tiques [24, 25]. Dans leur forme longue, ces protéines s'organisent en tétramères [26] pour établir des liaisons avec des récepteurs participant à l'activité synaptique tels que les récepteurs à glutamate métabotropiques (mGluR), les récepteurs à IP_3, ou les récepteurs à NMDA [27, 28]. La forme courte (Homer1a) ne peut pas établir ces liaisons, et régule alors l'activité synaptique induite par la forme longue d'Homer, en réduisant le nombre de protéines synaptiques et la taille des épines [29]. La proportion de chaque forme d'Homer pourrait être révélée par l'imagerie de son organisation à l'échelle macromoléculaire. Pour cela, il est possible de recourir à des techniques de microscopie optique résolue en dessous de la limite de diffraction.

Ainsi la microscopie STORM (*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*), qui est l'une des techniques "champ large" reposant sur la super-localisation de molécules fluorescentes individuelles activées de façon stochastique, a été utilisée récemment pour imager à haute résolution plusieurs molécules de la région synaptique, dont Homer [30]. Deux autres techniques de microscopie super-résolue se sont aussi avérées très utiles pour imager à une résolution de l'ordre de 20 nm la morphologie des épines dendritiques : la microscopie PALM (*Photo-Activated Localisation Microscopy*) [31], très proche dans son principe du STORM, et la microscopie STED (*STimulated Emission Depletion*) [32] qui est une technique de microscopie à balayage, point à point. Ces travaux révèlent de nombreux détails de la structure des épines, comme la longueur et la largeur du cou ou bien le diamètre de la tête, ainsi que leurs évolutions dans le temps.

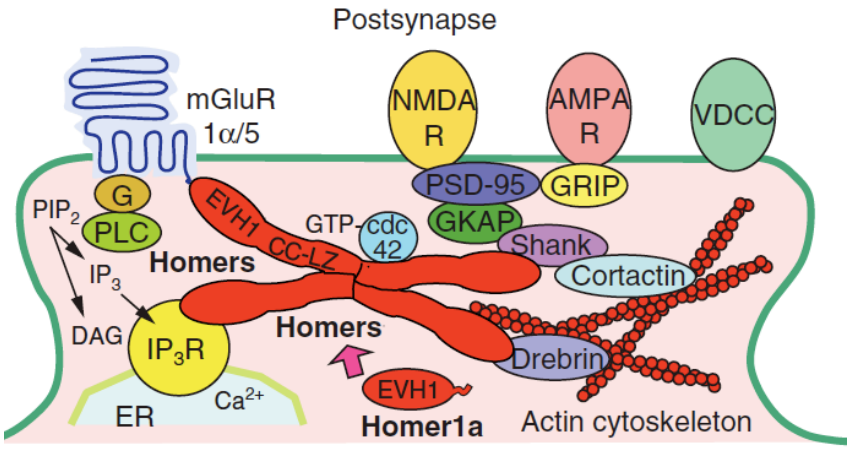

Figure 3 : *Schéma d'une densité post-synaptique, extrait de la Ref. [25]. Les protéines Homer (en rouge) sont organisées en tétramères dans leur forme longue et sont isolées dans la forme courte Homer1a. Le schéma montre leurs interactions avec les autres protéines de la région post-synaptique et les récepteurs synaptiques (mGluR, AMPA, NMDA...).*

La microscopie STED, inventée par Stefan Hell [33, 34], s'est révélée être un outil puissant pour imager des fluorophores avec une résolution nanométrique, notamment les centres colorés NV du diamant en raison de leur parfaite photostabilité sous une forte intensité d'excitation lumineuse. Une résolution record de 8 nm a ainsi été obtenue dans un échantillon de diamant macroscopique [12], améliorée ensuite à 2,4 nm en utilisant une lentille solide à immersion [35]. C'est pour cette raison que nous proposons de cibler la protéine Homer à l'aide des nanocristaux de diamant contenant des centres NV, afin de pouvoir imager l'organisation macromoléculaire de cette protéine par microscopie STED. L'objectif principal de ma thèse fut alors la construction d'un microscope STED destiné à l'imagerie des nanodiamants fluorescents. La réalisation de ce microscope et la caractérisation de ses performances font l'objet du Chapitre 1.

Du fait de la taille sub-longueur d'onde des nanodiamants, on peut se demander si la résolution du microscope STED, fortement dépendante de la structure de l'un des faisceaux d'illumination l'excitation, sera aussi bonne que dans le diamant macroscopique, au point par exemple de pouvoir résoudre plusieurs centres colorés au sein d'une même nanoparticules. Nous avons étudié cette question en collaboration étroite avec l'équipe de Stefan Hell (Institut Max Planck pour la biophysique et la chimie) à Göttingen et celle de Jean-Jacques Greffet (Laboratoire Charles Fabry) à Palaiseau, et les résultats de cette étude sont présentés dans Chapitre 2.

Nous n'avons à ce jour pas accompli la tâche de fonctionnalisation des nanodiamants permettant de cibler la protéine Homer, mais nous avons débuté la collaboration avec des équipes de chimistes pour qu'ils réalisent une accroche covalente de biomolécules (anticorps et peptides) sur des nanodiamants fluorescents. Le Chapitre 4 présente notre contribution à l'une de ces collaborations.

Stratégie pour l'étude du trafic dans les dendrites

La plasticité synaptique, ainsi qu'un certain nombre de fonctions neuronales dépendent fortement du bon fonctionnement des régions de contacts synaptiques, lié notamment à la morphologie des épines comme nous venons de le souligner, mais également au trafic intracellulaire dans l'axone et les dendrites. En effet, pour maintenir le développement des neurones et leur fonction, des macromolécules synthétisées dans le cytoplasme près du noyau cellulaire tels que des ARN messagers, des complexes protéiques, ou bien des vésicules membranaires, ont besoin d'être transportés jusqu'aux extrémités des épines [36]. La taille très longue des neurones en comparaison des autres cellules,

jusqu'à un mètre de long, rend ce trafic et sa régulation complexe. Il est assuré dans l'axone et les dendrites par le réseau de microtubules, qui transporte les cargos par le biais de moteurs moléculaires que sont la kinésine et la dynéine, tandis que la myosine assure le transport le long des filaments d'actine dans les épines dendritiques.

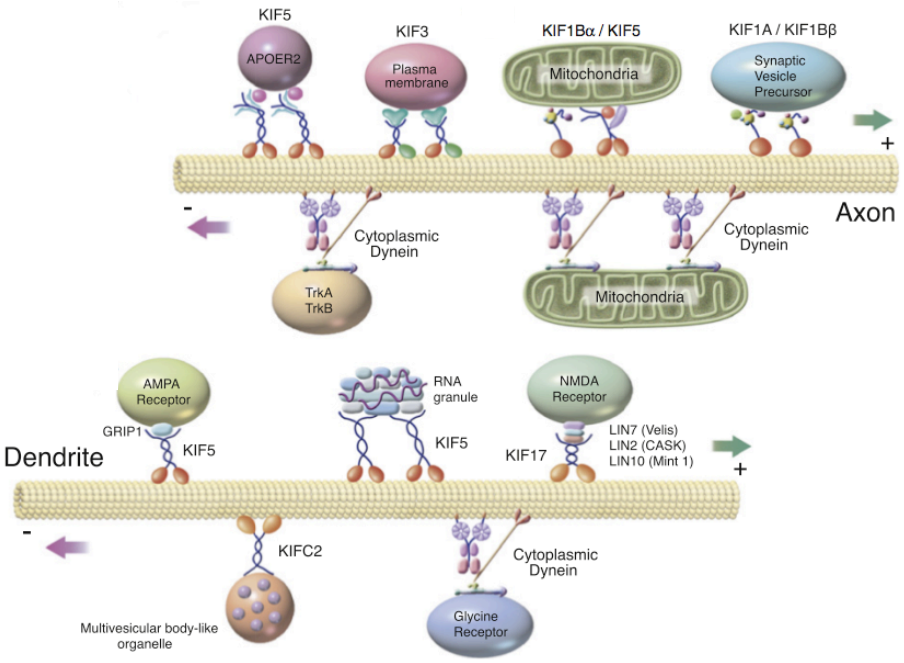

Figure 4 : *Schéma du transport intracellulaire dans les neurones, extrait de la Ref. [36]. Les différentes kinésines (FIF5, KIF3, KIF1A, ...) assurent le transport antérograde des multiples cargos le long des microtubules, tandis que la dynéine et la kinésine KIFC2 garantissent le transport rétrograde. Sur les axones, ces cargos correspondent à des vésicules contenant l'APOER2, de la membrane plasmique, des mitochondries et aussi des précurseurs des vésicules synaptiques. Le long des dendrites, on a des cargos distincts pour les sous-unités des récepteurs des neurotransmetteurs, les granules d'ARNs et les mitochondries (comme pour l'axone).*

Des dérèglements de ces trafics peuvent engendrer des anomalies morphologiques et des dysfonctionnements synaptiques entrainant un phénotype caractéristique de maladies neuropsychiatriques. L'équipe de Michel Simonneau a notamment mis en évidence, dans un modèle cellulaire murin du syndrome de l'X fragile, un trafic de granules d'ARN anormal, supporté par la kinésine KIF3C [37]. Il a été aussi démontré qu'une mutation de la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) qui régule l'expression de l'ARN, était liée à des dysfontionnements et à une perte de plasticité synaptique, pouvant entraîner le syndrome de l'X fragile [38]. Plusieurs études ont montré que la mutation d'un seul nucléotide du gène SLC25A12, codant pour un cargo mitocondrial, était reliée aux troubles autistiques. L'équipe de M. Simonneau a observé la sur-expression de cette

protéine dans certaines parties du cerveau d'autistes (*post-mortem*), et a montré dans un modèle cellulaire que des variations de l'expression de SLC25A12 s'accompagnaient de modifications de la longueur des dendrites et de la mobilité des mitochondries [39]. Enfin, des trafics anormaux liés à l'hyperphosphorylation de la protéine tau MAP ont aussi été rapportés dans le cas de la maladie d'Alzheimer [40–42].

Ces exemples soulignent que des anomalies de trafic intracellulaire sont souvent corrélées à des phénotypes de maladies neuro-psychiatriques. Aussi l'étude de ce trafic peut s'avérer être un outil de diagnostic de l'impact fonctionnel de variants rares identifiés par les techniques de séquençage à haut débit.

Les nanodiamants fluorescents constituent un nanotraceur de choix pour une telle étude en raison de l'absence de toxicité cellulaire et de leur stabilité d'émission parfaite (pas de blanchiment, ni scintillement). Dans le Chapitre 3, je décris mon implication dans les premières phases de cette étude, consistant en (i) l'évaluation de l'efficacité d'internalisation de nanodiamants dans des cultures de neurones primaires dissociés du cortex d'embryons de souris, (ii) la mise en place d'un microscope de fluorescence champ large équipé d'un incubateur pour l'étude de neurones vivants, et enfin (iii) l'analyse des premières trajectoires de vésicules contenant les nanodiamants et qui se déplacent dans les dendrites.

Comme indiqué plus haut, le Chapitre 4 évoque ma contribution à l'étude de premiers lots de nanodiamants fluorescents fonctionalisables par des molécules d'intérêt biologique. Pour conclure, je rappelle les résultats principaux obtenus dans le cadre de cette thèse et je présente les prolongements en cours de ce travail et ses perspectives.

⋆ ⋆ ⋆

1 Réalisation d'un microscope STED, résolu en dessous de la limite de diffraction, pour les centres NV du diamant

Sommaire

1.1 Principe de la microscopie STED 22

1.1.1 Réduction du volume de fluorescence 22

1.1.2 Emission stimulée 23

1.1.3 Application de la technique STED à l'imagerie du centre NV^- dans le diamant 26

1.2 Réalisation du microscope STED 27

1.2.1 Montage 27

1.2.2 Mise en évidence de l'émission stimulée 29

1.2.3 Structuration du faisceau 30

1.3 Résultats 33

1.3.1 Diamant massif 33

1.3.2 Microscopie STED appliquée à des nanoparticules de diamant fluorescentes 34

1.4 Conclusion 37

Ce chapitre décrit la mise en place d'un microscope de fluorescence à balayage résolu en dessous de la limite de diffraction de type STED (*STimulated Emission Depletion*), dédié à l'imagerie des centres NV dans le diamant. Nous présentons les difficultés rencontrées et les performances obtenues. Nous avons construit un système en régime d'excitation laser continue, avec une puissance de faisceau STED maximale d'environ 200 mW (à la longueur d'onde de 735 nm), limitée par le laser qui était à notre disposition. La taille minimale de spot obtenue à cette puissance maximale est d'environ 50 nm, en accord avec les études publiées par l'équipe de Stefan Hell (Max Planck for BioChemical Physics, Göttingen, Allemagne), pionnière de cette technique d'imagerie.

1.1 Principe de la microscopie STED

1.1.1 Réduction du volume de fluorescence

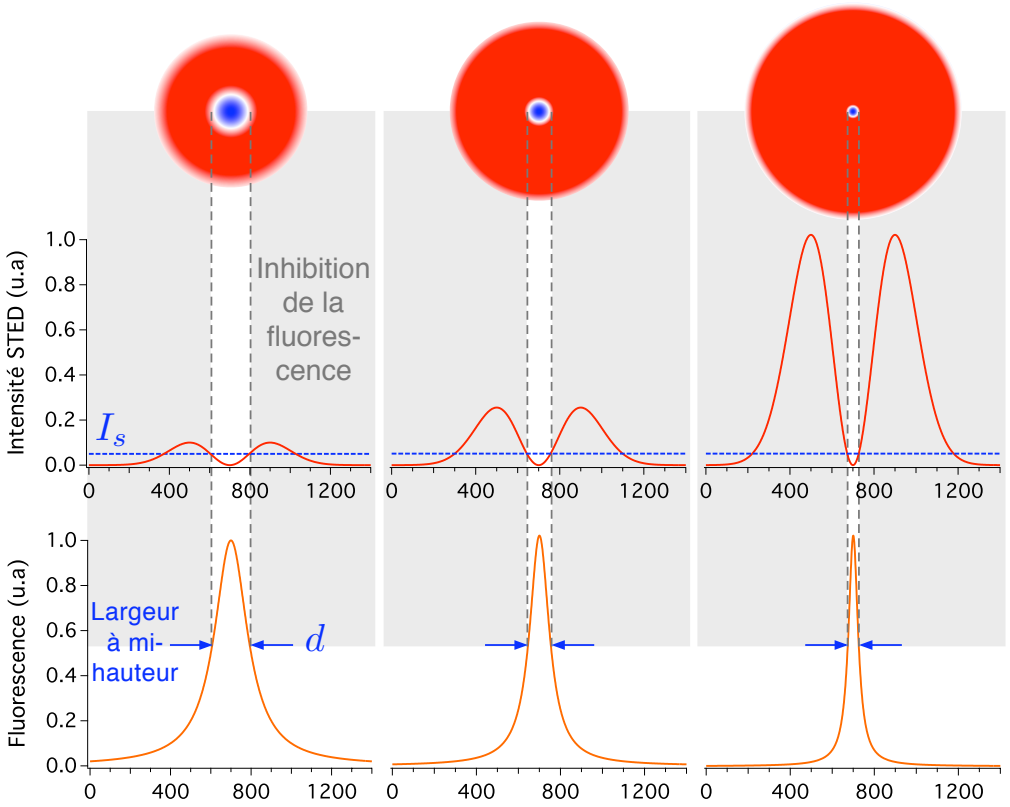

Figure 1.1 : *Schéma de principe de la microscopie STED. Dans la partie supérieure sont représentées des images 2D d'anneaux géométriquement identiques mais dont l'intensité crête augmente de gauche à droite. En dessous sont représentées des coupes radiales de chaque anneau. L'axe des abscisses est gradué en nm, et correspond à une taille "typique" d'anneau, et l'axe des ordonnées est l'intensité du faisceau STED. On représente sur ces coupes une intensité seuil, noté I_s, qui correspond à l'intensité du faisceau STED nécessaire pour diminuer par deux l'intensité de fluorescence maximale du fluorophore. Enfin, la partie inférieure montre les coupes radiales des volumes de fluorescence autorisés par chaque profil d'intensité STED. Ces coupes sont représentées par des fonctions Lorentziennes, normalisées à 1, et graduées également en nm. On voit que plus le gradient d'intensité STED est fort, plus le seuil est atteint rapidement et plus la largeur à mi-hauteur du volume de fluorescence est petite.*

Le STED est une technique de microscopie de fluorescence à balayage dont le principe est d'inhiber la fluorescence d'un émetteur à l'aide d'un faisceau structuré spatialement en forme d'anneau, dit faisceau STED. La fluorescence n'est possible qu'au centre de cet anneau, où l'intensité du faisceau STED est la plus faible, et est inhibée dans les zones

d'intensité plus forte. Plus le gradient radial d'intensité du faisceau STED est grand, plus le volume où la fluorescence est possible est faible, et donc plus la résolution est grande (Fig.1.1).

En théorie, si l'on pouvait augmenter sans limite la puissance du faisceau STED, on pourrait sans limite réduire le volume de fluorescence au plus proche de zéro. En pratique, la puissance finie des sources lasers et les imperfections lors de la création du faisceau structuré limitent la résolution à l'échelle nanométrique.

1.1.2 Emission stimulée

Il existe plusieurs processus permettant d'inhiber la fluorescence, tels que l'utilisation d'un état métastable ayant un temps de relaxation très long (*Ground State Depletion* [33]) ou bien le dépeuplement par émission stimulée (STED [34]). Pour n'importe quelle transition à deux niveaux, on peut choisir une longueur d'onde, décalée vers le rouge, pour laquelle le faisceau STED va stimuler la transition, sous réserve que la puissance soit suffisante. L'émission stimulée, de même longueur d'onde que le faisceau STED, est ensuite éliminé à l'aide d'un filtre interférentiel, pour ne laisser passer que la fluorescence vers les détecteurs.

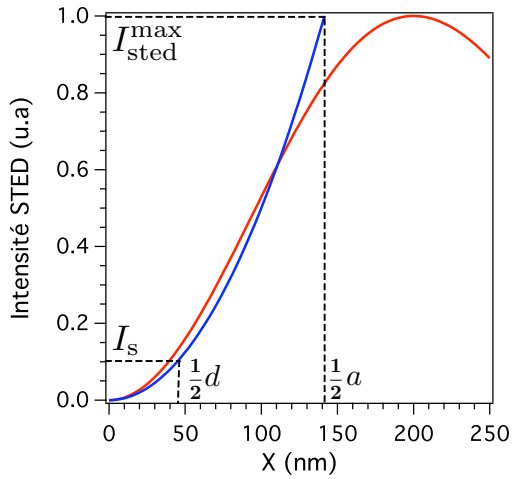

Figure 1.2 : *Modélisation de l'anneau formé par le faisceau STED au foyer de l'objectif de microscope. En rouge, la fonction "réelle" normalisée à $I_{\text{sted}}^{\max}$ et en bleu sa modélisation parabolique. On note sur le graphe les abscisses $\frac{1}{2}d$ et $\frac{1}{2}a$ qui correspondent respectivement aux abscisses pour lesquelles le polynôme atteint les valeurs I_s et $I_{\text{sted}}^{\max}$.*

Afin d'évaluer la résolution que l'on peut obtenir en fonction de la puissance du faisceau STED, on commence par modéliser le "creux" de l'anneau par une loi parabolique [34, 43] :

$$I_{\text{sted}}(x) = I_{\text{sted}}^{\max}\left(\frac{2x}{a}\right)^2 \tag{1.1}$$

où $I_{\text{sted}}^{\max}$ est l'intensité STED maximale et $\frac{1}{2}a$ l'abscisse pour laquelle cette intensité maximale est atteinte par le polynôme d'interpolation (Fig. 1.1.2).

Il s'agit maintenant de déterminer la **fraction de fluorescence résiduelle** η en présence du faisceau STED d'intensité I_{sted}, par rapport au cas sans faisceau STED. Cette grandeur diffère pour le régime d'excitation impulsionnelle et continue (voir Annexes A et B). Elle est notée respectivement $\eta_{\text{pulse}}(x)$ et $\eta_{\text{cw}}(x)$ à la distance x du centre du spot, et vaut :

$$\eta_{\text{pulse}}(x) = \exp\left[-\ln 2 \cdot \frac{I_{\text{sted}}(x)}{I_{\text{s, pulse}}}\right] \quad \begin{cases} = 1 \text{ quand } I_{\text{sted}} = 0 \\ = 1/2 \text{ quand } I_{\text{sted}} = I_{\text{s}} \\ = 0 \text{ quand } I_{\text{sted}} = \infty \end{cases} \tag{1.2}$$

$$\eta_{\text{cw}}(x) = \frac{1}{1 + \dfrac{I_{\text{sted}}(x)}{I_{\text{s,cw}}}} \quad \begin{cases} = 1 \text{ quand } I_{\text{sted}} = 0 \\ = 1/2 \text{ quand } I_{\text{sted}} = I_{\text{s}} \\ = 0 \text{ quand } I_{\text{sted}} = \infty \end{cases} \tag{1.3}$$

On a introduit les quantités $I_{\text{s,pulse}}$ et $I_{\text{s,cw}}$ qui sont les intensités STED nécessaires pour dépeupler l'état excité de moitié. Elles dépendent toutes les deux principalement de la section efficace σ de la transition d'émission stimulée à la fréquence ν_{sted} du faisceau STED, mais s'écrivent différemment :

$$I_{\text{s,pulse}} = \ln 2 \cdot \frac{h\nu_{\text{sted}}}{\sigma\tau_{\text{sted}}} \tag{1.4}$$

$$I_{\text{s,cw}} = \frac{h\nu_{\text{sted}}}{\sigma\tau_{\text{f}}} \tag{1.5}$$

où τ_{sted} est la durée de l'impulsion en régime impulsionnel, τ_{f} la durée de vie de l'état excité et h la constante de Planck.

Soit $d^{\text{sted}}_{\text{pulse}}$ et $d^{\text{sted}}_{\text{cw}}$ les largeurs à mi-hauteur (FWHM) des spots de fluorescence en présence du faisceau STED. En remplaçant $I_{\text{sted}}(x)$ par sa fonction parabolique approchée (1.1), on obtient :

$$\eta_{\text{pulse}}\left(\frac{d^{\text{sted}}_{\text{pulse}}}{2}\right) = \frac{1}{2} \;\Rightarrow\; I_{\text{sted}}\left(\frac{d^{\text{sted}}_{\text{pulse}}}{2}\right) = I_{\text{s,pulse}} \;\Rightarrow\; d^{\text{sted}}_{\text{pulse}} = a\sqrt{\left(\frac{I_{\text{s,pulse}}}{I^{\text{max}}_{\text{sted}}}\right)} \tag{1.6}$$

$$\eta_{\text{cw}}\left(\frac{d^{\text{sted}}_{\text{cw}}}{2}\right) = \frac{1}{2} \;\Rightarrow\; I_{\text{sted}}\left(\frac{d^{\text{sted}}_{\text{cw}}}{2}\right) = I_{\text{s,cw}} \;\Rightarrow\; d^{\text{sted}}_{\text{cw}} = a\sqrt{\left(\frac{I_{\text{s,cw}}}{I^{\text{max}}_{\text{sted}}}\right)} \tag{1.7}$$

Ces deux largeurs FWHM correspondent à la largeur du spot de fluorescence (partie non-inhibée par le faisceau STED) dans le cas où le faisceau d'excitation de la fluorescence est une onde plane (i.e. ne dépend pas de x). En effet, les grandeurs $\eta_{\text{pulse}}(x)$ et $\eta_{\text{cw}}(x)$

calculées en annexe ne tiennent pas compte de la variation en x du faisceau d'excitation, qui peut être approché, au foyer de l'objectif, par une gaussienne de largeur FWHM d^{exc} dépendant de son ouverture numérique et de la longueur d'onde d'excitation. Cette dépendance spatiale du spot d'excitation aura pour effet de diminuer la largeur du spot de fluorescence en mode STED, bien qu'à très forte puissance STED son influence devienne négligeable.

On considère $\mathcal{I}(x)$ le profil d'illumination du faisceau d'excitation au foyer de l'objectif qui résulte du produit des profils d'illumination des faisceaux d'excitation $\mathcal{I}_{\mathrm{exc}}(x)$ et STED $\mathcal{I}_{\mathrm{sted}}(x)$:

$$\mathcal{I}(x) = \mathcal{I}_{\mathrm{exc}}(x) \cdot \mathcal{I}_{\mathrm{sted}}(x) \tag{1.8}$$

Or :

$$\mathcal{I}_{\mathrm{exc}}(x) = \exp\left[-\ln 2 \cdot \left(\frac{2x}{d^{\mathrm{exc}}}\right)^2\right] \tag{1.9}$$

Pour trouver la largeur FWHM totale d, dans le cas impulsionnel et continu, on résout l'équation :

$$\mathcal{I}\left(\frac{d}{2}\right) = \frac{1}{2} \tag{1.10}$$

Et on trouve :

$$d_{\mathrm{pulse}} = \frac{d^{\mathrm{exc}}}{\sqrt{1 + \left(\frac{d^{\mathrm{exc}}}{a}\right)^2 \cdot \left(\frac{I_{\mathrm{sted}}^{\max}}{I_{\mathrm{s,pulse}}}\right)^2}} \tag{1.11}$$

$$d_{\mathrm{cw}} = \frac{d^{\mathrm{exc}}}{\sqrt{2\ln 2 + \left(\frac{d^{\mathrm{exc}}}{a}\right)^2 \cdot \left(\frac{I_{\mathrm{sted}}^{\max}}{I_{\mathrm{s,pulse}}}\right)^2}} \tag{1.12}$$

Si on fait l'approximation que $d^{\mathrm{exc}} \approx a$ et $2\ln 2 \approx 1$, on trouve dans les deux cas :

$$d \approx \frac{d^{\mathrm{exc}}}{\sqrt{1 + \left(\frac{P_{\mathrm{sted}}}{P_{\mathrm{s}}}\right)^2}} \tag{1.13}$$

On obtient ainsi une relation approchée entre la largeur FWHM d et la puissance du faisceau STED P_{sted}. P_{sted} est la puissance moyenne du faisceau STED et P_{s} la puissance nécessaire pour dépeupler l'état excité de la moitié de sa population. La relation 1.13 indique également qu'une puissance infinie donne accès à une résolution qui tend vers 0.

1.1.3 Application de la technique STED à l'imagerie du centre NV^- dans le diamant

Le centre NV^- est un défaut dans la maille du diamant, où deux atomes de carbone adjacents sont substitués par un atome d'azote (*Nitrogen*) et une lacune (*Vacancy*) qui partagent une charge électronique excédentaire. Les niveaux d'énergie de cet électron peuvent être modélisés en première approximation par ceux d'un système à deux niveaux, qui absorbe dans le vert et ré-émet dans le rouge. La principale caractéristique de cet émetteur est sa parfaite photostabilité à température ambiante. Il ne présente ni clignotement ni photoblanchiment même à des puissances d'excitation laser très supérieures à la puissance de saturation, ce qui en fait un très bon candidat pour des techniques de microscopie employant de fortes puissances comme le STED.

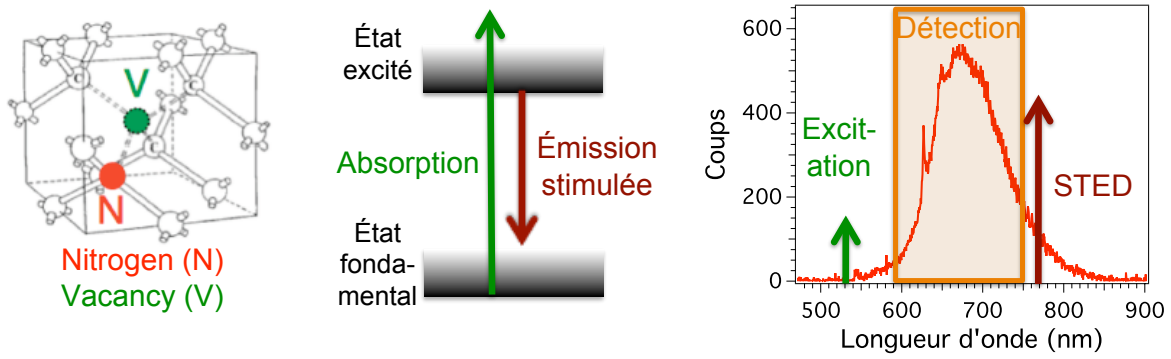

Figure 1.3 : *Centre NV^- du diamant. A) Localisation du centre NV^- dans la maille de diamant. B) Modélisation des niveaux d'énergie électroniques du centre NV^- par un système à deux niveaux. C) Spectre d'un centre NV^- enregistré à température ambiante, montrant les longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence (532 nm), de l'émission stimulée (735 nm) et la bande de détection.*

Le spectre du centre NV^- présente une raie zéro-phonon à 637 nm et un élargissement, dû aux interactions électron-phonon, qui est maximal à 700 nm et s'étend jusqu'à 800 nm. On a donc un large choix de longueur d'onde, entre 700 nm et 800 nm, pour stimuler la transition niveau excité → niveau fondamental. Si généralement des sources laser impulsionnelles permettent d'atteindre des intensités crêtes plus importantes, et donc des résolutions records en dessous de 10 nm [12], des résolutions comparables ont été obtenues avec des sources continues [44]. C'est ce dernier choix, simple car l'on possédait déjà la source, que l'on a fait pour notre montage.

1.2 Réalisation du microscope STED

1.2.1 Montage

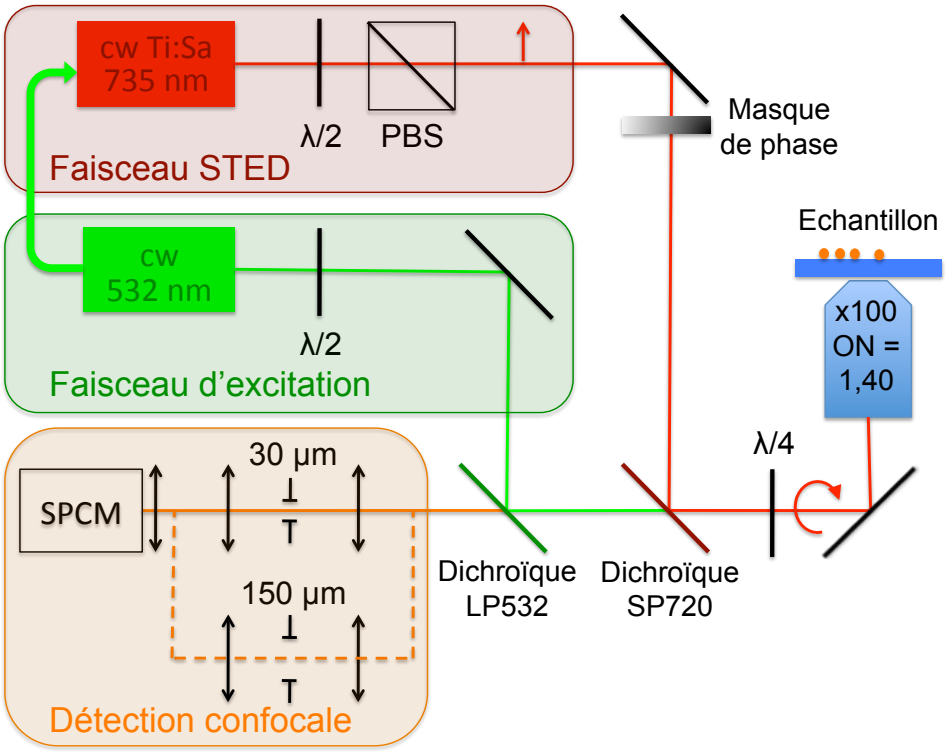

Figure 1.4 : *Schéma simplifié du montage de microscopie STED construit à l'ENS Cachan. "PBS" et "SPCM" sont les abréviations pour un cube séparteur de polarisation (*Polarized Beam Splitter*) et un détecteur de photons uniques (*Single Photon Counting Module*).*

La base d'un microscope STED est celle d'un microscope de fluorescence confocal à balayage, sur lequel on vient rajouter une ligne laser de dépeuplement du niveau excité, le faisceau STED. Il y a donc sur notre montage (Fig.1.4) deux lignes laser, le faisceau d'excitation et le faisceau STED, focalisés par un objectif de microscope de grande ouverture numérique au foyer duquel est placé l'échantillon, posé sur une platine de translation piezo-électrique. L'image de fluorescence est obtenue par collection du signal de manière confocale en balayant point par point l'échantillon.

Ligne du faisceau STED

Le laser de dépeuplement que l'on a choisi est un laser à cristal de saphir dopé avec des ions titane (Ti:Sa) émettant continûment, et qui a été construit au laboratoire

Charles Fabry de l'Institut d'Optique (Palaiseau). Il comporte un filtre de Lyot qui permet d'accorder la longueur d'onde d'émission du laser entre 720 nm et 765 nm. On a choisi de se placer autour de $\lambda_{\text{sted}} = 735$ nm, qui correspond à un bon compromis entre la puissance délivrée par le laser et la taille de la fenêtre spectrale de détection. Le milieu amplificateur est pompé par un laser continu à 532 nm de puissance 6,5 W (Verdi, Coherent Inc., USA). C'est ce même laser, dont on prélève 4%, qui sert de faisceau d'excitation de la fluorescence du centre NV. Une fois fibré pour réaliser un filtrage spatial, le faisceau STED a une puissance de 200 mW en sortie de fibre. La ligne laser est ensuite constituée d'un système afocal pour égaler la taille du faisceau avec celle de la pupille d'entrée de l'objectif et pour collimater au mieux le faisceau; un couple lame $\lambda/2$ + cube séparateur de polarisation permettant de changer la puissance du faisceau et d'imposer une polarisation linéaire; et enfin le masque de phase qui assure un retard hélicoïdal 0-2π.

Il a été montré que pour annuler la composante longitudinale (le long de la direction de propagation) du champ électrique au foyer de l'objectif de microscope, il faut transformer la polarisation linéaire en circulaire, ce qui est fait avec une lame $\lambda/4$ placée juste avant l'objectif de microscope. De plus, il faut que l'hélicité de la polarisation circulaire soit identique à celle de la lame de phase pour annuler l'intensité totale au foyer de l'objectif [45]).

Ligne du faisceau d'excitation

Le faisceau laser d'excitation de la fluorescence est également fibré, puis suivi d'un système afocal ajustable, permettant de superposer longitudinalement (dans la direction de propagation) les points de focalisation des deux faisceaux, excitation et STED, afin que l'émetteur soit excité et stimulé de façon optimale. En effet, l'objectif de microscope est très ouvert (ON = 1,4) et bien que corrigé de la plupart des aberrations, il possède un peu d'aberrations chromatiques entre 532 nm et 735 nm. Pour que le faisceau d'excitation soit focalisé dans le même plan que le faisceau STED, il faut sur notre montage qu'il soit légèrement divergent. Enfin, on place une lame $\lambda/2$ afin d'adapter la polarisation du faisceau d'excitation à l'orientation des dipôles d'absorption du centre NV.

Détection confocale

Le signal que l'on détecte est celui qui est transmis par les deux filtres séparateurs dichroïques combinés, c'est-à-dire la fluorescence dont les longueurs d'onde sont comprises entre 532 et 720 nm. Il existe ensuite deux voies de détection:

— la voie pour l'imagerie avec un trou de diamètre 30 μm qui sélectionne uniquement le centre de la tache d'Airy, *i.e.* il exclut le premier lobe

— une voie servant à l'alignement du montage et qui possède un trou de diamètre 150 μm, laissant ainsi passer toute la tache d'Airy.

Après filtrage confocal, le signal est focalisé sur une photodiode à avalanche en mode de comptage de photons (module SPCM, Perkin-Elmer). La voie d'alignement permet de mesurer la fonction PSF(x, y, z) (*Point Spread Function*) de réponse impulsionnelle du microscope, à l'aide d'un échantillon de billes d'or diffusantes. L'alignement est optimal lorsque la PSF est la plus symétrique possible.

1.2.2 Mise en évidence de l'émission stimulée

Avant de mettre en forme le faisceau STED, il faut s'assurer que la fluorescence du centre NV^- est inhibée efficacement par le faisceau à la longueur d'onde λ_{sted}. Pour cela, on superpose les deux faisceaux (λ_{sted} et $\lambda = 532$ nm) sans mise en forme (de formes gaussiennes donc), et on mesure l'intensité de la fluorescence émise par un centre NV^- lorsque qu'on augmente la puissance du faisceau STED.

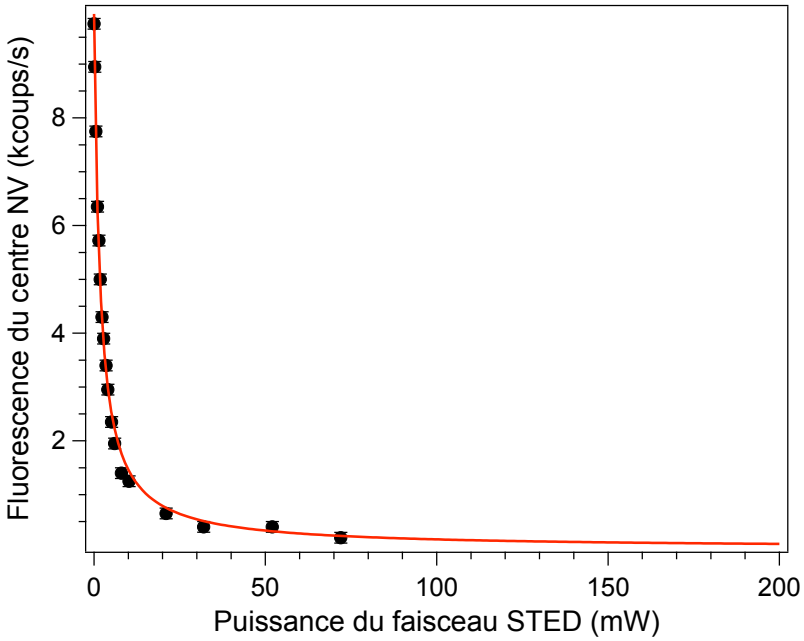

Figure 1.5 : *Extinction de la fluorescence d'un centre NV^- unique dans un échantillon de diamant massif, en fonction de la puissance du faisceau STED continu. Les puissances laser sont mesurées juste avant l'objectif de microscope. La puissance du faisceau d'excitation à 532 nm est fixée à $P_{exc} = 80\,\mu W$. La courbe rouge correspond à l'ajustement par la fonction (1.14).*

Pour cette expérience nous avons utilisé un échantillon de diamant de forme parallélépipédique, de taille millimétrique qu'on nommera pas la suite **diamant "massif"**, de la société Element Six Ltd (Acot, UK) obtenu par synthèse CVD (*Chemical vapor deposition*) et de type IIa (i.e. la concentration en impuretés d'azote et autres est inférieure au ppm). Cet échantillon a l'avantage de n'avoir que des centres NV individuels bien séparés les uns des autres. L'échantillon est placé directement au contact de l'huile utilisée pour l'objectif de microscope à immersion et on cherche des centres colorés NV en déplaçant la platine piézo-électrique d'environ 5 μm par rapport à la surface du diamant (soit à une profondeur réelle d'environ 15 μm dans le diamant, en prenant en compte la réfraction). On place dans la voie de détection deux filtres consécutifs, un filtre passe-bande centré en 670 nm et de largeur 80 nm (HQ670/80 M, Chroma) qui sélectionne la fluorescence du centre NV et élimine en partie le faisceau STED transmis ainsi que le faisceau d'excitation, et un filtre passe-haut de coupure 720 nm (FF01-720/SP, Semrock) qui élimine le reste de faisceau STED. On mesure ainsi jusqu'à 70 kcoups/s pour un centre NV unique à saturation. Cependant, pour mesurer l'efficacité d'extinction par le faisceau STED (Figure 1.5), on utilise une puissance d'excitation à 532 nm suffisamment faible par rapport à celle de saturation ($P_{\text{exc}} = 80$ μW, donnant une intensité d'émission ≈ 10 kcoups/s), et on augmente progressivement la puissance du faisceau STED.

En régime continu, l'intensité de fluorescence I_{fluo} du centre NV^- en présence du faisceau STED est donnée, d'après l'équation (1.3), par:

$$I(x) = \frac{I^0_{\text{fluo}}}{1 + P_{\text{sted}}(x)/P_{\text{s}}} \tag{1.14}$$

où I^0_{fluo} est l'intensité de fluorescence à puissance STED nulle et $P_{\text{s, cw}}$ est ici encore la puissance STED nécessaire pour diviser par 2 la population de l'état excité.

La relation (1.14) est utilisée pour ajuster la courbe expérimentale de la figure 1.5, donnant: $I^0_{\text{fluo}} = 9565 \pm 95$ coups/s et $P_{\text{s}} = 1,22 \pm 0,03$ mW.

1.2.3 Structuration du faisceau

L'inhibition de la fluorescence du centre NV^- par le faisceau STED ayant été mise en évidence, il reste maintenant à le mettre en forme pour diminuer la résolution du microscope. À une puissance STED donnée, plus le gradient radial d'intensité au foyer de l'objectif est grand, meilleure est la résolution. Nous cherchons donc à avoir une intensité au centre de l'anneau qui tend vers zéro. Il existe principalement deux sources d'imperfections qui détruisent la qualité du "zéro": les **aberrations** et la **polarisation**

inadaptée dans le plan focal de l'objectif.

Afin d'observer et d'évaluer les aberrations optiques ainsi que la qualité du "zéro" du faisceau STED, nous mesurerons la PSF du microscope confocal pour les deux faisceaux d'excitation (vert et rouge). Dans le cas du microscope confocal, la PSF est équivalente au profil d'intensité du faisceau d'excitation au foyer de l'objectif et on peut la mesurer par exemple en y plaçant un objet quasi-ponctuel (taille $\ll \lambda_{exc}$) qui absorbe ou réfléchit le faisceau d'excitation. Nous utilisons ici des nanobilles d'or d'environ 80 nm de diamètre, qui réfléchissent aussi bien le vert (excitation) que le rouge (STED).

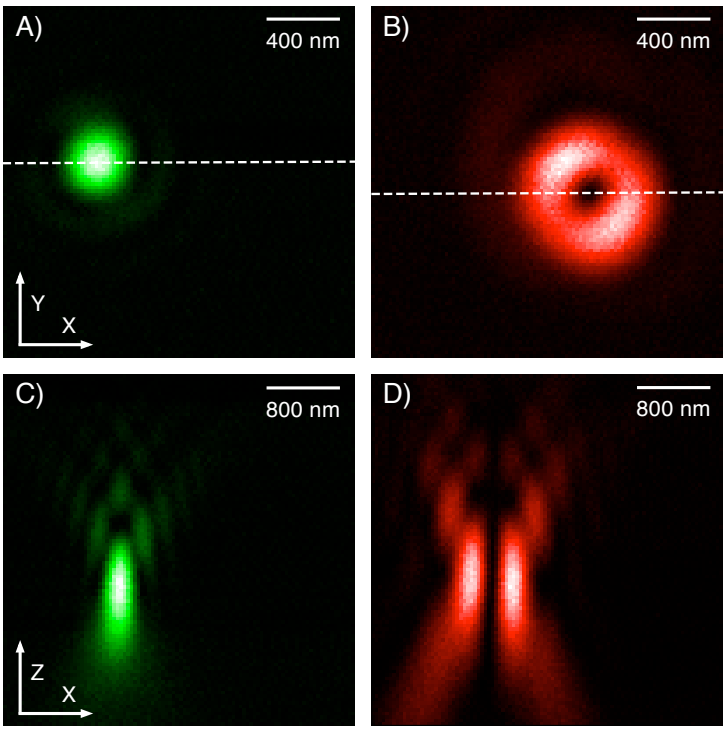

Figure 1.6 : *PSF du microscope pour le faisceau d'excitation (vert) et le faisceau STED (rouge), après optimisation des positions du masque de phase et de la lame $\lambda/4$ (voir Fig. 1.4. A) et B) sont respectivement les PSF dans le plan de l'échantillon (xy) des faisceaux d'excitation (vert) et STED (rouge). Les pointillés blancs représentent les axes de coupe où ont été prises les deux autres images. C) et D) sont les PSF longitudinales (dans la direction de propagation z). Les quatre images correspondent à la diffusion des faisceaux par une nanobille d'or placée au foyer de l'objectif, détectée à travers la voie de détection confocale possédant le plus large trou, dite voie d'alignement. Les billes ont été déposées à la tournette sur une lamelle de verre qui est ensuite plaquée sur une lame de verre avec un film d'huile d'adaptation d'indice entre les deux afin d'éviter une forte réflexion à l'interface verre/air.*

Aberrations

Afin que les interférences créées par le masque de phase soient destructives tout le long de l'axe optique, il faut impérativement conserver la symétrie du déphasage lorsqu'on focalise par l'objectif. Toutes les aberrations asymétriques, de type coma ou astigmatisme, sont donc un obstacle pour obtenir un bon "zéro". Ce sont des aberrations de champ et d'excentrement que l'on peut donc éviter en travaillant avec un faisceau parallèle et centré par à rapport à l'axe de propagation (identique à celui de l'objectif).

Une fois que l'alignement sur l'axe est satisfaisant, il reste généralement de l'aberration sphérique. Grâce à sa symétrie sphérique, le "zéro" de l'anneau ne sera pas affecté. Par contre, elle aura tendance à allonger le faisceau dans l'axe z et donc à diminuer l'intensité maximale disponible au foyer de l'objectif. Pour réduire les aberrations sphériques, certains objectifs sont munis de bagues d'adaptation qui permettent de changer le point de fonctionnement de l'objectif (en général pour travailler à différentes températures ou avec des épaisseurs de lamelles de verre différentes). Il arrive qu'une position de cette bague permette de minimiser les aberrations sphériques pour la longueur d'onde du faisceau STED. Autrement, il est possible de les réduire en faisant varier l'indice de réfraction de l'huile d'immersion.

Sur la figure 1.6, on note la présence non négligeable d'aberrations sphériques. Cependant, les résultats qui font l'objet de la prochaine section montrent qu'elles n'ont pas eu de conséquences notables sur les résolutions obtenues, semblables à celles obtenues sur d'autres microscopes STED à des puissances similaires.

Polarisation

Pour obtenir un fort gradient radial d'intensité, il faut annuler l'intensité totale du faisceau STED au centre du spot de focalisation. Comme nous l'avons déjà indiqué dans le §1.2.1, il faut pour cela que le faisceau STED ait une polarisation circulaire de même hélicité que celle du masque de phase [45]. Une lame $\lambda/4$, placée juste avant l'objectif dans une monture, permet la rotation autour de deux axes, l'un colinéaire au faisceau et l'autre dans un plan orthogonal au faisceau afin de rattraper de petits écarts de phase. L'optimisation des angles de la lame $\lambda/4$ est faite quantitativement à l'aide d'un analyseur linéaire tournant (mis en rotation par un moteur) et d'une photodiode positionnée juste avant l'objectif de microscope. Après optimisation, on obtient typiquement l'anneau de la figure 1.7 ayant un contraste de 0.98 et 0.99 dans les directions x et y.

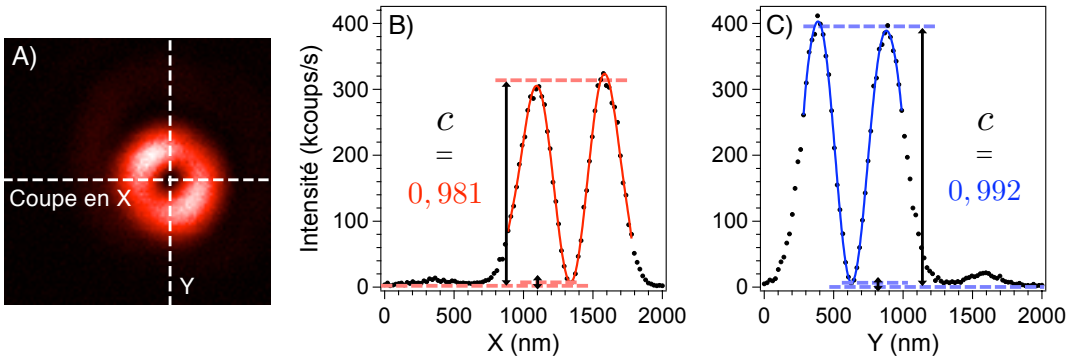

FIGURE 1.7 : *Contraste de l'anneau STED suivant les deux directions latérales x et y. A) PSF du faisceau STED dans le plan (xy). B) et C) sont respectivement les coupes suivant x et y de la figure A), marquées par les pointillés blancs. Les données expérimentales sont modélisées par un polynôme afin de mesurer les valeurs maximales et minimales de l'intensité de l'anneau et d'évaluer le contraste c correspondant.*

1.3 Résultats

Nous venons de détailler dans la section précédente la réalisation et l'alignement du microscope, il s'agit à présent d'évaluer les performances, en matière de résolution, du système que l'on a construit. Ces mesures ont été réalisées dans un premier temps en utilisant des centres NV isolés dans un échantillon de diamant "massif" puis avec des centres NV contenus dans des nanocristaux de diamant.

1.3.1 Diamant massif

On utilise le même échantillon de diamant que pour la mesure de l'extinction de la fluorescence contenant des centres NV isolés (Fig. 1.5). À pleine puissance du faisceau STED (environ 200 mW) on obtient une largeur de spot FWHM $\approx$ 50 nm, à comparer à la largeur du spot en mode confocal, de l'ordre de 230 nm (Fig. 1.8). On remarque que la résolution obtenue sur l'axe des y est un peu plus petite que celle sur l'axe des x. Ce résultat est en accord avec les mesures de profils et de contraste de l'anneau STED (Fig.1.6), qui n'est pas tout à fait de symétrie sphérique.

La dépendance de la largeur à mi-hauteur d avec la puissance du faisceau STED suit la relation (1.13) comme le montre la figure 1.9. L'ajustement donne ici encore des valeurs légèrement différentes sur les axes

$$\text{des } x : \begin{cases} d_c = 240 \pm 5 \text{ nm} \\ P_s = 18,2 \pm 1,5 \text{ mW} \end{cases} \qquad \text{et des } y : \begin{cases} d_c = 259 \pm 6 \text{ nm} \\ P_s = 10,6 \pm 0,8 \text{ mW} \end{cases} .$$

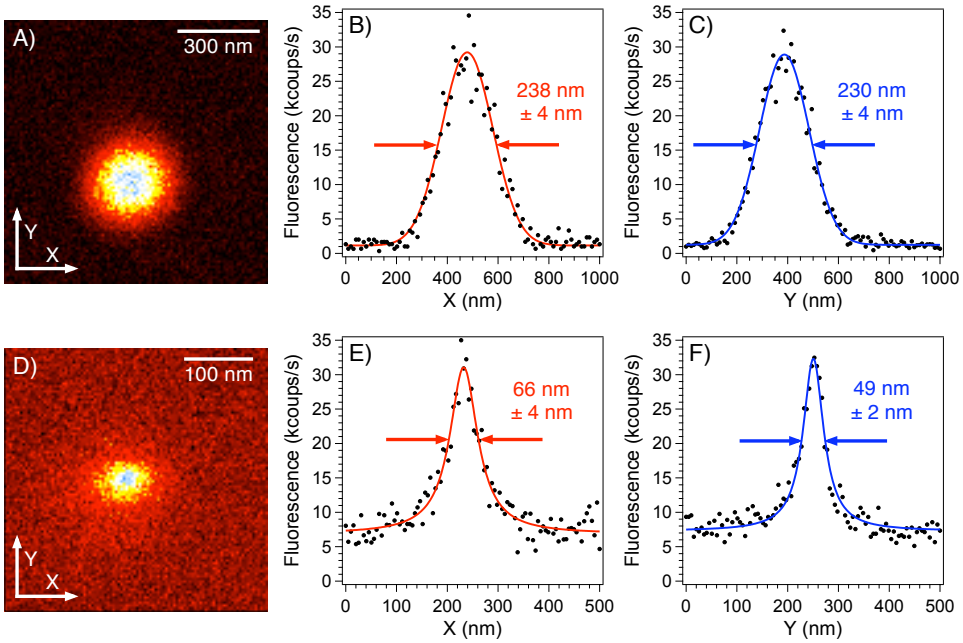

Figure 1.8 : *Comparaison des images d'un centre NV unique obtenues par microscopies confocale et STED. A) Image confocale d'un centre NV unique pour une puissance d'excitation $P_{\text{exc}} = 150\ \mu W$. B) et C) sont les coupes faites au centre du spot selon les axes x et y de l'image confocale. Les deux courbes en traits continus rouge et bleu (resp. x et y) sont les ajustements gaussiens dont on a extrait les largeurs à mi-hauteur avec leurs incertitudes telles qu'elles sont définies par le logiciel IgorPro (WaveMetrics, USA). D) est l'image STED pour une puissance $P_{\text{sted}} = 190\ mW$ et la même puissance d'excitation que l'image confocale. E) et F) sont les coupes x et y de l'image STED faites au centre du spot selon les axes x et y de l'image et ajustées cette fois avec une fonction Lorentzienne.*

Ces résultats obtenus dans le diamant "massif" sont en accord avec ceux de la littérature à puissance laser continue égale [44]. En vue d'application à l'imagerie cellulaire, il est maintenant intéressant de tester les performances de notre microscope STED pour des centres NV dans des **nanocristaux de diamant** (ND).

1.3.2 Microscopie STED appliquée à des nanoparticules de diamant fluorescentes

Fabrication des ND fluorescents

Les nanocristaux de diamant synthétiques de différentes granulométries sont disponibles commercialement (Van Moppes & Sons S.A., Genève). Ceux que nous utilisons pour nos expériences ont été produits par broyage de microcristaux synthétisés dans des presses haute-pression (≈ 6 GPa) et à haute température (1700 K) [méthode de produc-

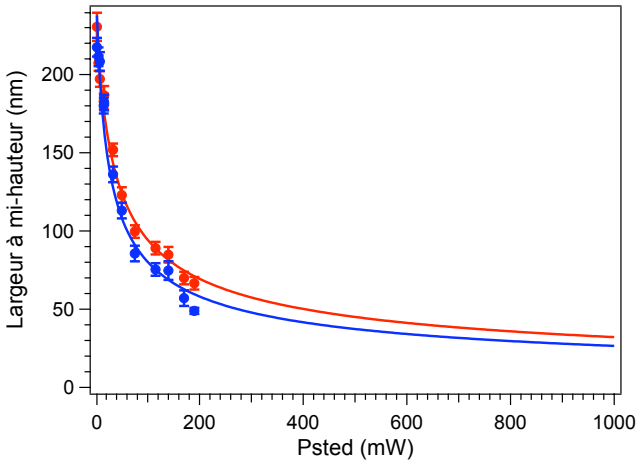

Figure 1.9 : *Largeur à mi-hauteur d'un spot produit par un centre NV unique dans un cristal de diamant "massif", en fonction de la puissance du faisceau STED. En rouge est représentée la résolution selon l'axe x et en bleu celle selon l'axe y. Les mesures ont été ajustées à l'aide de la relation (1.13). Les paramètres d'ajustement sont donnés dans le corps du texte.*

tion HPHT]. Ils contiennent l'atome d'azote comme impureté substitutionnelle la plus abondante, en concentration ≈ 150 ppm, mais ces ND ne sont naturellement pas fluorescents. Pour créer un centre NV, il faut créer une lacune en site substitutionnel adjacent à un atome d'azote. Notre équipe a développé et optimisé un procédé de fabrication de ND fluorescents en collaboration avec le laboratoire Physique de la Matière Condensée de l'école Polytechnique, et avec le laboratoire Capteur Diamant du CEA-LIST à Saclay [46,47], afin de contrôler le nombre d'émetteurs créés dans la particule et leur charge (Fig. 1.10).

Des nanodiamants HPHT de taille (mesurée par microscopie électronique) garantie inférieure à 50 nm (SYP-0.05, Van Moppes & Sons S.A.) ont été irradiés avec un faisceau d'électrons d'énergie 13.9 MeV, pendant 20 min, à l'aide de l'accélérateur linéaire SAPHIR du CEA-LIST à Saclay. La dose appliquée n'est malheureusement pas connue faute d'appareil pour la mesurer, mais nos travaux antérieurs ont montré que cette durée d'irradiation conduisait à la formation de 0 à 3 centres par nanodiamant, selon leur taille [46]. Après oxydation à l'air, les ND sont redispersés dans l'eau dé-ionisée à l'aide d'ultrasons, à une concentration de l'ordre de 1 mg/ml. La suspension aqueuse est ensuite déposée à la tournette sur une lamelle de quartz. L'avantage du quartz est que l'intensité d'autofluorescence pour une excitation à la longueur d'onde 532 nm est 3 à 5 fois inférieure à celle d'une lamelle de verre BK7, ce qui facilite grandement l'observation d'émetteurs uniques. En revanche, l'épaisseur et l'indice de réfraction sont différents

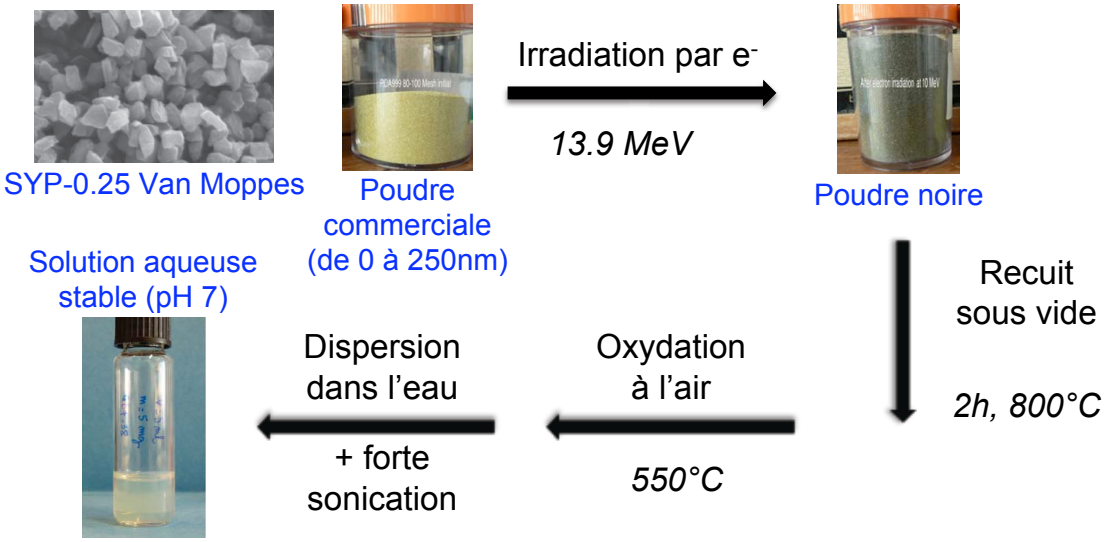

Figure 1.10 : *Procédé utilisé pour la création de centres colorés NV dans des nanocristaux de diamant utilisés dans les expériences de microscopie STED. Les lacunes sont créées par irradiation des nanodiamants à l'aide d'un faisceau d'électrons d'énergie* ≈ 14 *MeV. Le recuit permet la migration des lacunes au sein de la maille cristalline, conduisant à la formation du complexe N-V thermodynamiquement stable, lorsqu'elle rencontre un atome d'azote. Enfin, l'oxydation à l'air permet de retirer la couche de graphite créée par les deux opérations précédentes, stabilisant ainsi l'état de charge du centre NV et son intensité de fluorescence en réduisant la densité d'états pièges de la charge et de défauts responsables de désexcitations non radiatives.*

(environ 200 μm, $n_{\text{lame}} = 1.46$), et non adaptés aux objectifs de microscope à immersion que nous utilisons et qui sont corrigés pour la traversée d'une lamelle de BK7. Pour une technique de microscopie telle que le STED, où les ouvertures numériques sont grandes et où il est capital de s'affranchir au maximum des aberrations, cette faible différence de trajet optique est néanmoins une difficulté.

La figure 1.11 regroupe 5 exemples d'images obtenues sur le montage STED. Dans tous les cas observés, la largeur des spots FWHM à pleine puissance STED est réduite par rapport à l'image confocale mais reste toujours supérieure à ce qui a été mesuré avec l'échantillon de diamant massif dans la section précédente. De plus, on note une forte disparité des tailles de spots FWHM d'une particule à l'autre.

Ces premières observations laissent penser que l'imagerie de centres NV au sein de nanoparticules de diamant par microscopie STED n'est pas identique à celle de centres NV dans un cristal massif. Nous nous sommes alors interrogés sur les possibles limitations de cette technique dans les nanodiamants.

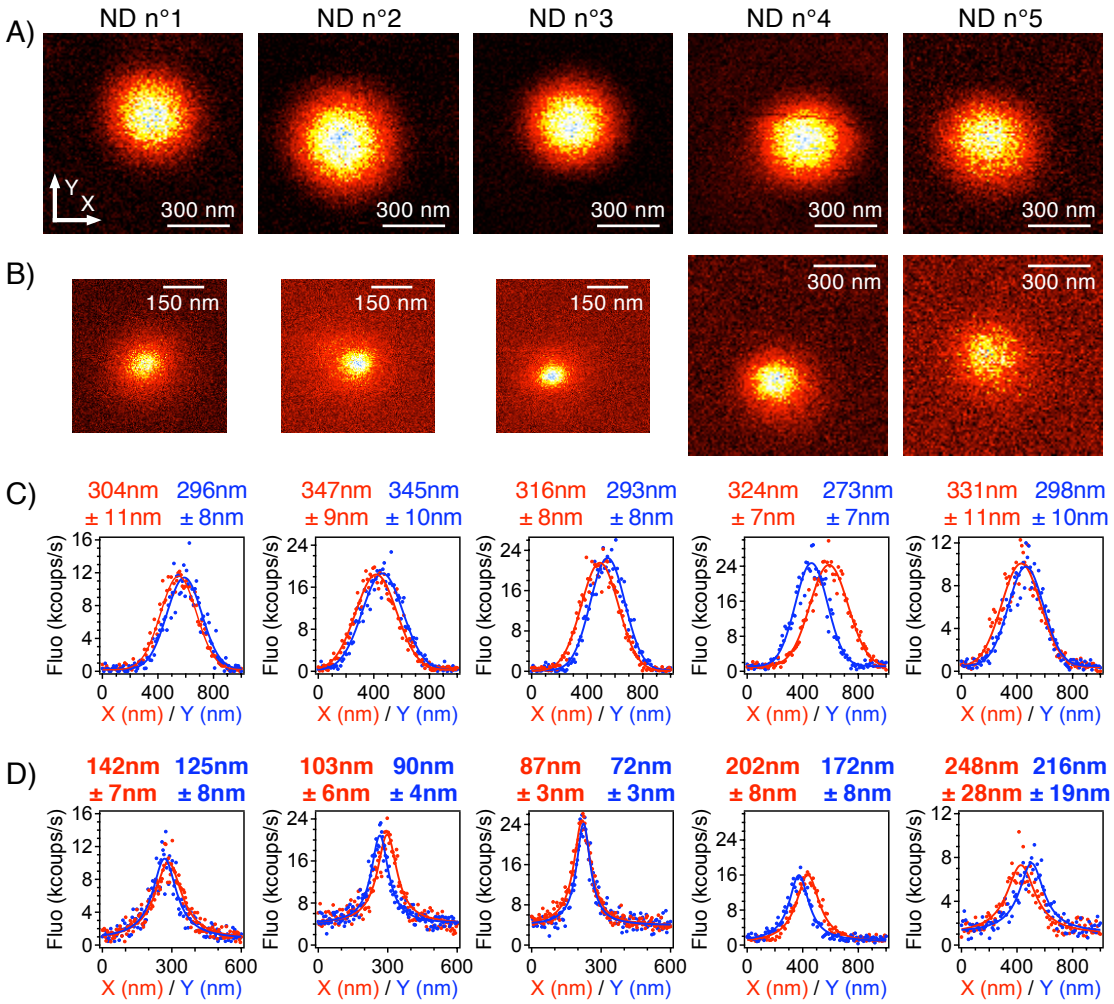

Figure 1.11 : *Comparaison des images confocales et STED pour 5* **nanodiamants** *contenant des centres NV. A) Les 5 images confocales et B) les 5 images STED. C) et D) sont les coupes dans les axes x (rouge) et x (bleu) des images confocales et STED, prises au centre des spots. Chaque profil confocal est ajusté par une gaussienne, dont les largeurs à mi-hauteur ainsi que les incertitudes (donnée par IgorPro) sont notées au dessus de la coupe. Chaque profil STED est ajusté par une Lorentzienne, et les largeurs à mi-hauteur avec leurs incertitudes sont également notées au dessus de la coupe.*

1.4 Conclusion

Si la microscopie STED atteint aujourd'hui des records de résolution, approchant le nanomètre, grâce aux centres NV dans des cristaux de diamant massif [35], il n'y a pas de résultats comparables au sein de nanoparticules de diamant. Dans cette partie, décrivant les mécanismes qui permettent à la microscopie STED de réduire drastiquement la limite de résolution d'un microscope de fluorescence, nous avons vu l'importance de créer un très fort gradient de champ autour de l'émetteur que l'on souhaite résoudre. En effet,

c'est le passage d'une intensité quasi nulle au centre du faisceau structuré, à l'intensité seuil I_s, en seulement quelques nanomètres ($d/2$), qui assure une résolution de cet ordre de grandeur (d).

Or, les nanodiamants couramment utilisés pour des applications d'imagerie cellulaire sont en général des objets de taille < 100 nm, bien inférieure à la longueur d'onde du faisceau structuré STED utilisé pour dépeupler l'état excité du centre NV (735 - 775 nm). Il n'est pas du tout évident que le gradient, ou la structure du faisceau STED se conserve à l'intérieur de la nanoparticule, où sont logés les centres NV.

En collaboration avec notre équipe, Mondher Besbes, Jean-Paul Hugonin et Jean-Jacques Greffet (Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique) ont calculé la répartition spatiale du faisceau STED (structuré en anneau) à l'intérieur de nanoparticules de diamant [48]. La description de ce modèle et les expériences mises en place pour confirmer ses prédictions font l'objet du prochain chapitre.

⋆ ⋆ ⋆

2 Imagerie de centres NV dans des nanoparticules de diamant par microscopie STED

Sommaire

2.1 Imagerie de centres NV uniques dans des nanodiamants de différentes tailles 40

2.1.1 Identification des ND contenant un centre NV unique et mesure de leur taille 40

2.1.2 Images STED de centres NV dans des nanodiamants 43

2.1.3 Observations complémentaires et discussion 47

2.1.4 Interprétation des résultats 50

2.2 Imagerie STED de nanodiamants contenant plusieurs centres colorés NV 52

2.2.1 Images STED 52

2.2.2 Détermination de la présence de cristaux uniques 54

2.2.3 Interprétation finale 63

2.3 Conclusion 66

L'objectif de ce chapitre est de déterminer expérimentalement la limite de résolution de la microscopie STED dans le cas de **nanocristaux** de diamant, sachant que l'équipe de Jean-Jacques Greffet au Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique en collaboration avec la nôtre, a récemment montré que pour une particule parfaitement sphérique de taille sub-longueur d'onde, la microscopie STED ne devrait pas permettre d'atteindre une résolution d'imagerie des centres NV qu'elle contient meilleure que sa taille [48].

En effet, si l'on considère le ND comme une sphère diélectrique d'indice de réfraction $n = 2.4$ et de rayon a, la théorie de Mie permet de calculer l'amplitude du champ électromagnétique, de longueur d'onde λ, à l'intérieur de cette sphère lorsqu'elle est éclairée par un faisceau structuré. On trouve différents régimes de propagation du champ: (i) si $a > \lambda/n$, l'onde plane pénètre dans la particule (Fig. 2.1-A)); ii) si $a \ll \lambda$ (approximation électrostatique), le champ à l'intérieur de la particule est homogène en tout point (Fig. 2.1-C)), ce que l'on peut interpréter comme un effet "d'écrantage diélectrique". Il

n'existe par conséquent pas de gradient d'intensité autour d'un centre NV qui se trouverait dans un nanodiamant. On s'attend donc à ce que la largeur à mi-hauteur résultant de l'image STED de ce centre soit limitée par la taille du nanodiamant.

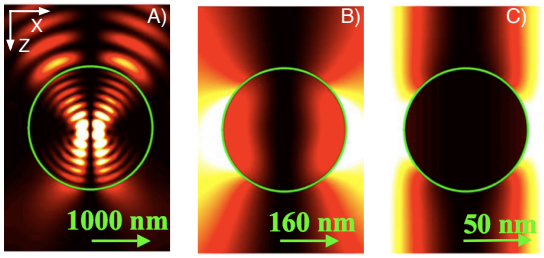

Figure 2.1 : *Calcul numérique de l'intensité d'un faisceau STED (structuré en forme d'anneau dans le plan (x, y)) se propageant dans le sens des z négatifs, à l'intérieur d'une sphère de diamant de rayon 1000, 160 et 50 nm [48]. Le profil d'intensité STED est généré par l'application d'un déphasage $0 \rightarrow 2\pi$ sur un faisceau polarisé circulairement et focalisé par un objectif de microscope d'ouverture numérique 0,9 (cf. chapitre 1).*

Nous avons donc décidé d'étudier expérimentalement le lien entre la taille des spots provenant de centres NV uniques, observés par microscopie STED, et la taille des nanodiamants dans lesquels ils se trouvent. Afin de mener à bien cette étude nous avons besoin d'un microscope dont la résolution est plus petite que la plus petite des particules que nous souhaitons observer. Sachant que la résolution du montage de l'ENS Cachan, décrit dans le chapitre 1, est d'environs 50 nm et que les ND que nous utilisons ont une taille de 30 à 100 nm, il faut utiliser un montage plus performant pour cette étude. C'est pour cette raison que nous nous sommes adressés à l'équipe de Stefan Hell, leader de la microscopie STED, et dont la capacité à résoudre des centres NV dans le diamant en dessous de 10 nm a déjà été prouvée [12]. Toutes les études réalisées à Göttingen et leurs analyses ont été réalisées en étroite collaboration avec la doctorante de Stefan Hell travaillant sur les centres NV, Silvia Arroyo Camejo.

2.1 Imagerie de centres NV uniques dans des nanodiamants de différentes tailles

2.1.1 Identification des ND contenant un centre NV unique et mesure de leur taille

Préparation des échantillons Nous avons choisi cette fois de travailler avec des ND de taille garantie inférieure à 250 nm (SYP-0.25, Van Moppes & Sons S.A., Genève)

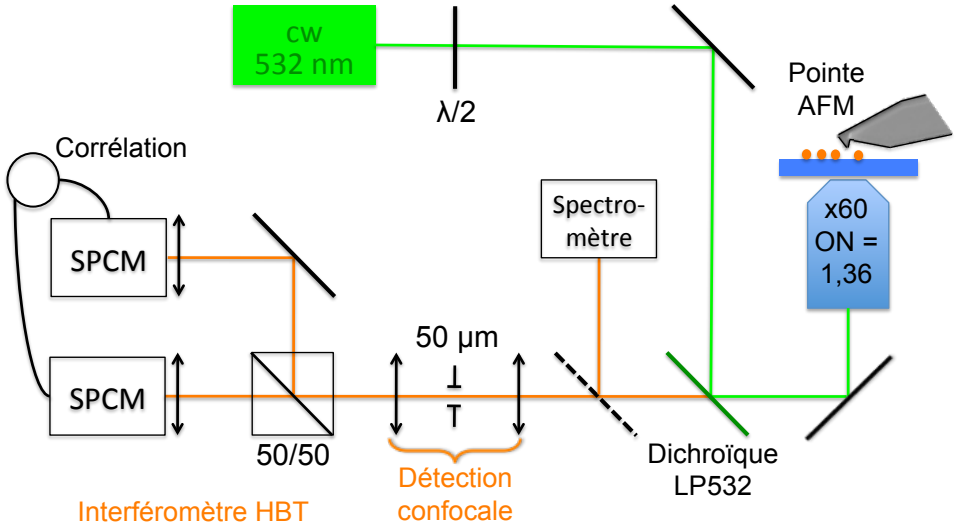

Figure 2.2 : *Montage de l'ENS Cachan combinant un microscope de fluorescence confocal et un AFM utilisé pour la pré-caractérisation. L'excitation à 532 nm est continue et polarisée linéairement, puis focalisée par un objectif à immersion de grande ouverture numérique. Le système AFM est muni de translations micrométriques permettant de déplacer finement la pointe afin de la superposer avec le point focal de l'objectif. On réalise ainsi simultanément une image de fluorescence/AFM de la même zone en balayant l'échantillon, monté sur une platine piezo-électrique. La détection est muni d'un spectromètre et d'un interféromètre HBT.*

qui ont également été irradiés avec un faisceau d'électrons d'énergie 13.9 MeV, pendant 20 min, au CEA-LIST à Saclay, afin de créer entre 0 et 10 centres par nanodiamant [46]. Après oxydation à l'air, les ND sont redispersés dans l'eau dé-ionisée à l'aide d'ultrasons, à une concentration de l'ordre de 1 mg/ml. La suspension aqueuse de nanodiamants est déposée à la tournette sur une lamelle en quartz sur laquelle des cases numérotées ont été préalablement photogravées, pour que l'on puisse retrouver exactement la même particule d'un montage à l'autre.

Sélection de centres NV uniques et mesure de la taille des ND par microscopie à force atomique On dispose à l'ENS Cachan pour cette étude d'un microscope confocal couplé à un système commercial de microscopie à force atomique (AFM) de la société Asylum Research (modèle MFP-3D-BIO, Fig. 2.2). Ce système permet d'imager simultanément par balayage la fluorescence et la topographie de l'échantillon (donnant accès à la taille des nanodiamants). De plus, la détection confocale est suivie d'un dispositif de mesure de corrélations temporelles d'intensité de type Hanbury Brown et Twiss [49] (HBT) dans lequel l'intensité de fluorescence est séparée en deux voies afin de déterminer la présence ou non de photons détectés exactement en même temps sur chacune des voies

et ainsi la présence d'un ou plusieurs émetteurs. Pour ce faire nous déduisons la fonction de corrélation temporelle d'intensité du second ordre $g^{(2)}$ de l'histogramme des retards τ entre deux photons consécutivement détectés sur l'un puis l'autre des deux modules de comptage de photons, où $g^{(2)}(\tau)$ pour le retard τ est donné par:

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t+\tau)\rangle \cdot \langle I(t)\rangle}{\langle I(t)\rangle^2} \tag{2.1}$$

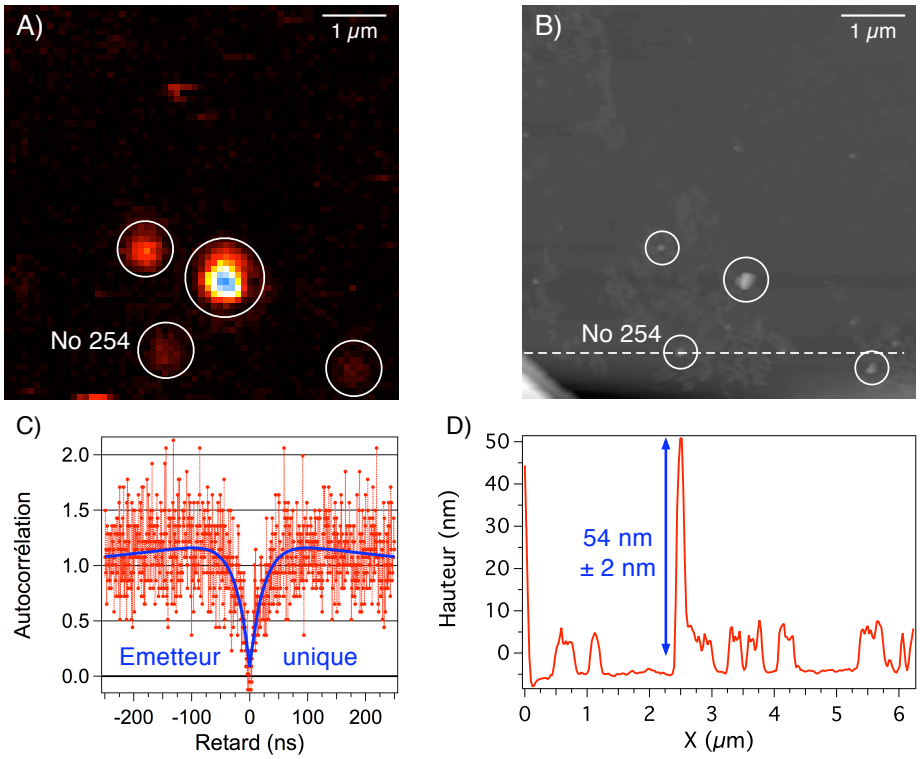

Figure 2.3 : *Repérage de centres uniques et mesure de taille des ND. A) et B) Balayage de la fluorescence et balayage AFM d'une même région de la lame de quartz sur laquelle ont été déposés les ND. On distingue 4 spots de fluorescence que l'on fait correspondre avec 4 ND dans l'image AFM. Une mesure de fonction révèle que seule la particule en bas à gauche (n° 254) contient un centre NV unique. C) Histogramme des corrélations temporelles d'intensité du second ordre ($g^{(2)}$(retard)) de fluorescence du spot n° 254. En rouge, les valeurs expérimentales normalisées et corrigées du fond ayant une statistique poissonienne [50] et en bleu l'ajustement avec une fonction biexponentielle paire. L'absence de corrélation au retard nul est la signature d'un émetteur unique. D) Coupe de l'image AFM et mesure de la hauteur de la particule n° 254.*

Pour chaque émetteur unique trouvé, on évalue la taille du ND dans lequel il se trouve par la hauteur du profil mesuré avec l'AFM. C'est le cas de l'émetteur n° 254, montré en exemple dans la figure 2.3. La figure 2.4 représente la distribution en taille (mesurée à l'AFM) des ND contenant un centre NV unique, dont la médiane est ≈ 50 nm.

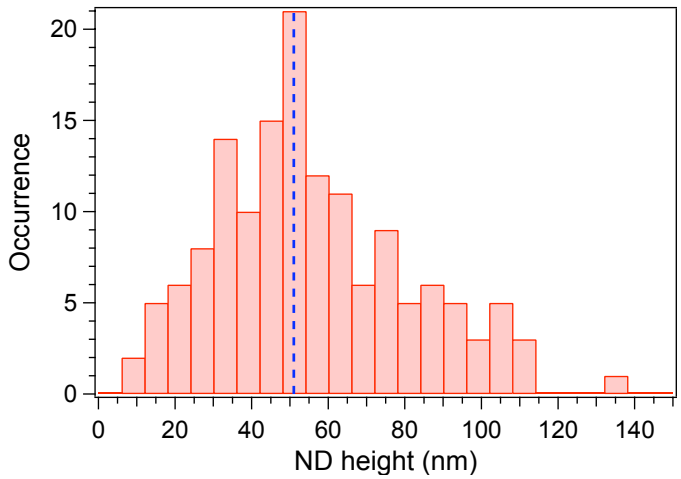

FIGURE 2.4 : *Distribution en taille des ND (mesurée avec l'AFM).*

2.1.2 Images STED de centres NV dans des nanodiamants

Montage STED du Department of NanoBiophotonics (Max Planck Institute for BioChemical Physics, Göttingen)

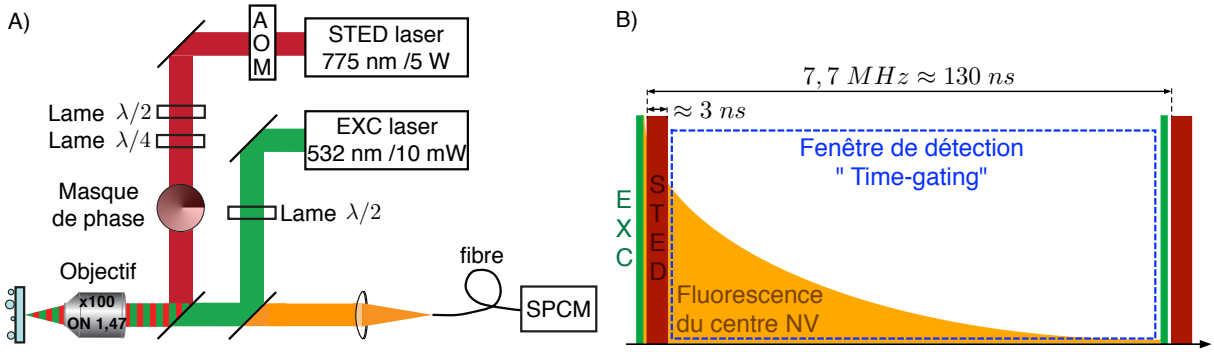

FIGURE 2.5 : *A) Schéma du microscope STED fonctionnant en régime impulsionnel, au Department of NanoBiophotonics (Max Planck Institute for BioChemical Physics, Göttingen). B) Séquences d'excitation/détection.*

Le montage STED du *Department of NanoBiophotonics* utilise des sources laser impulsionnelles. Le faisceau STED repose sur un laser saphir dopé titane conçu sur mesure par la société IPG Photonics (Allemagne), cadencé à 8 MHz, de durée d'impulsion 3 ns, émettant à la longueur d'onde de 775 nm. Il délivre une puissance moyenne maximale de 5 W. Ce faisceau traverse un modulateur acousto-optique, servant à prélever dans l'ordre 1 une fraction ajustable de la puissance variant sur une large gamme, de 20 mW à 1000 mW (puissance mesurée à l'entrée de l'objectif de microscope), sans déplacement de faisceau (inconvénient des dispositifs à lame demi-onde et prisme séparateur de polarisation).

Le laser d'excitation de la fluorescence (NdYAG, PicoTA, PicoQuant) émettant à la longueur d'onde de 532 nm, durée d'impulsions de 50 ps, est déclenché par le laser STED. Le retard entre l'impulsion verte et l'impulsion rouge est ajusté finement par des boîtiers électroniques pour optimiser le dépeuplement de l'état excité: l'impulsion verte porte le centre NV dans son état excité, puis de là, l'impulsion laser STED ramène le système dans son état fondamental par émission stimulée (Fig. 2.5).

Pour améliorer le rapport signal/fond, on exploite aussi le fait que la durée de vie radiative du centre NV (>20 ns dans des nanodiamants) est plus longue que celle des impulsions laser, ce qui permet une détection résolue en temps [51, 52]. En effet, en ouvrant une fenêtre de détection juste après la fin de l'impulsion rouge, on améliore significativement la réjection du laser STED (assurée aussi spectralement) sans perte significative de signal de fluorescence. Il est ainsi possible de travailler à des puissances moyennes STED atteignant 1 W, et d'obtenir les tailles de spot records, de l'ordre de 10 nm (Fig 2.5-B)).

Images STED de centre NV unique dans des ND individuels

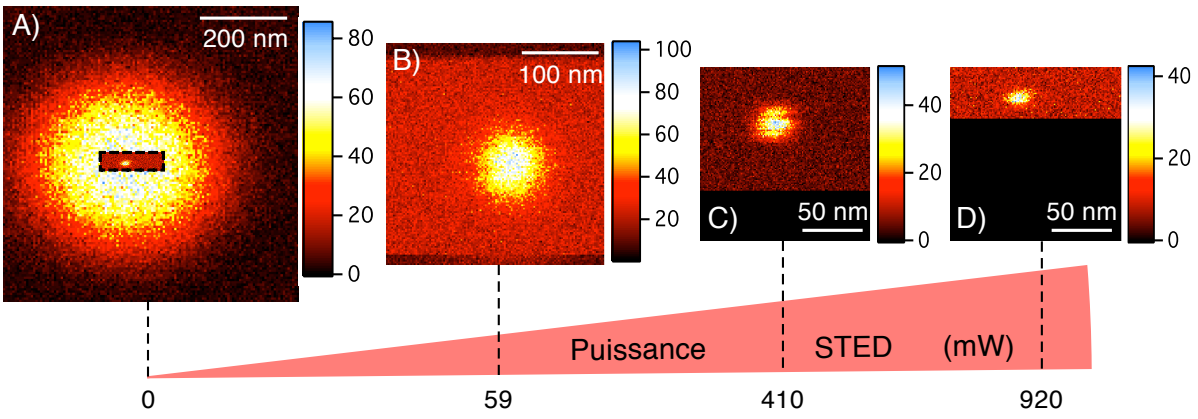

Figure 2.6 : *Balayage de la fluorescence de la particule n° 254 pour différentes puissances STED (légende de couleur: nombre de coups détectés en 20 ms d'intégration par pixel). Sur l'image confocale A), on a superposé l'image STED la mieux résolue D) dans le carré pointillé noir. Les balayages A) et B) ont été réalisés sans détection résolue en temps, à l'inverse de C) et D). Le balayage est fait de haut en bas. On remarque pour de grandes puissances STED que le spot se décale vers le haut de l'image, probablement à cause d'effets thermiques. Pour cette raison, les mesures de largeurs à mi-hauteur de spot sont données uniquement le long de l'axe horizontal.*

Pour chaque particule pré-caractérisée comme indiqué dans le paragraphe précédent, on réalise plusieurs images STED en augmentant progressivement la puissance moyenne

du faisceau STED. La puissance du faisceau vert est fixée à 60 μW, qui semble être un compromis raisonnable pour obtenir un bon niveau de signal mais en restant loin de la saturation du centre NV. La figure 2.6 représente l'image confocale et trois images STED de la particule n° 254, déjà prise en exemple précédemment (Fig. 2.3).

Les images des figures 2.6-A) et B) ont été acquises sans recours au fenêtrage temporel. On remarque que le fond augmente rapidement avec la puissance STED et dès que l'on sélectionne la fenêtre temporelle d'acquisition (Fig. 2.6 C) et D)) le fond diminue très notablement. Néanmoins, le signal baisse constamment à mesure que la puissance STED augmente, jusqu'à chuter brutalement (Fig. 2.7) un peu avant 1000 mW.

Au fur et à mesure que l'on augmente la puissance du faisceau STED, l'intensité au centre de l'anneau – qui n'est jamais rigoureusement nulle – finit par être de l'ordre de l'intensité de saturation I_s, entraînant aussi l'émission stimulée dans cette région et la disparition du signal de fluorescence (cf. equation (1.2)): nous sommes alors arrivés à la limite de résolution. Le plus souvent, cette limite est atteinte pour une puissance de faisceau STED de l'ordre de 1 W, mais pour certaines particules, le rapport signal sur fond chute plus rapidement avant même d'avoir atteint de telles puissances, et la taille des spots n'est pas aussi petite.

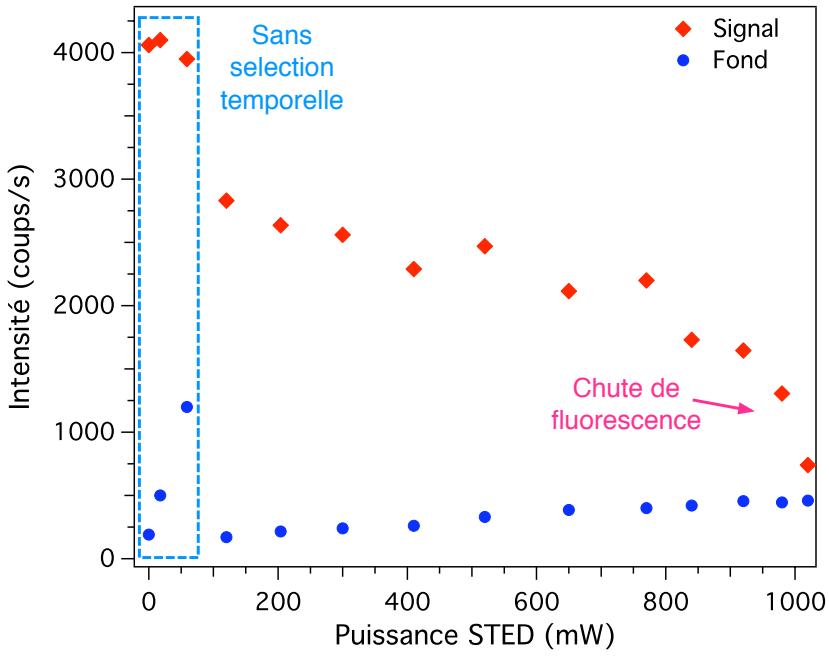

Figure 2.7 : *Intensité de fluorescence (diamant rouge) du centre NV$^-$ et fond (rond bleu) lorsqu'on augmente la puissance STED avec et sans résolution temporelle.*

Corrélations entre la taille des spots de fluorescence (STED) et celle des ND (AFM)

Les tailles de spots obtenues pour des particules de différentes tailles contenant *a priori* un seul centre NV sont présentées dans la figure 2.8. On remarque que quelle que soit la taille des ND, la dimension du spot de fluorescence décroît de façon identique en fonction de la puissance du faisceau STED (Fig. 2.8-A)). La plus petite dimension de spot obtenue pour ces 7 particules se situe entre 10 et 20 nm, bien que leurs tailles mesurées avec l'AFM soient situées entre 20 et 100 nm.

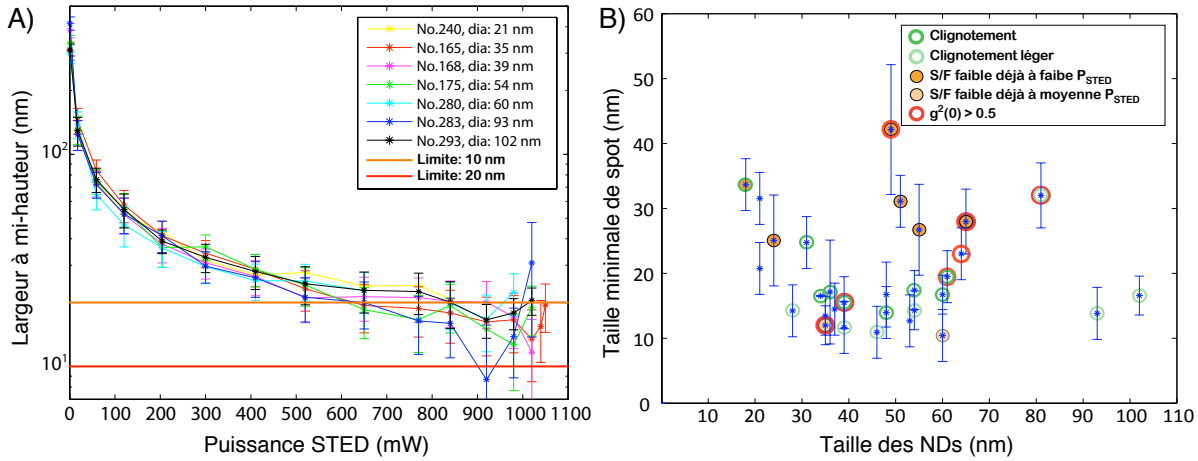

Figure 2.8 : *A) Évolution de la largeur à mi-hauteur du spot de fluorescence associé à un centre NV unique dans un nanodiamant, en fonction de la puissance STED pour 7 nanoparticules de diamètres de 21 à 102 nm. Le rapport signal/fond étant faible pour de très grandes puissances STED, les largeurs représentées sur ce graphique correspondent aux largeurs à mi-hauteur des profils d'intensité après qu'ils ont été sommés sur l'axe vertical dans la région du spot (vertical binning) pour minimiser l'impact du fond. B) Largeurs à mi-hauteur minimales observées pour tous les ND étudiés. Les ronds orange foncé/clair montrent les spots dont le rapport signal/fond chute pour des puissances de faisceau STED faibles/moyennes. Les cercles verts foncés/clairs soulignent les spots qui clignotent en présence du faisceau STED et les cercles rouges les ND qui ont montré a posteriori la présence de deux émetteurs.*

On représente sur un deuxième graphique la résolution maximale obtenue pour toutes les particules imagées en STED (Fig. 2.8 B)). Si la plupart des spots montrent une largeur à mi-hauteur minimale observée entre 10 et 20 nm, certains ont néanmoins une largeur double voire triple. Ce sont généralement les particules dont le rapport signal/fond chute rapidement, même à de faibles puissances STED (rond orange). Après normalisation et correction du fond poissonnien des fonctions d'autocorrélation $g^{(2)}$ enregistrées précé-

demment sur le montage de l'ENS Cachan, en mode d'excitation continue, ainsi qu'une deuxième vérification en enregistrant les $g^{(2)}$ en mode impulsionnel sur le montage STED, on met en évidence certaines particules sélectionnées pour l'étude contenant finalement deux émetteurs (cercles rouges sur la Fig. 2.8-B)). Les cercles verts soulignent les spots qui ont montré un fort ou faible clignotement en présence du faisceau STED. L'origine de ce clignotement n'est pas élucidée, mais une hypothèse est que le faisceau STED soit absorbé par la matrice de diamant via un processus multiphoton conduisant ensuite à l'échauffement du nanocristal et à une réduction de l'efficacité quantique, comme démontrée récemment [53–56].

2.1.3 Observations complémentaires et discussion

Étude de l'état de charge du centre NV

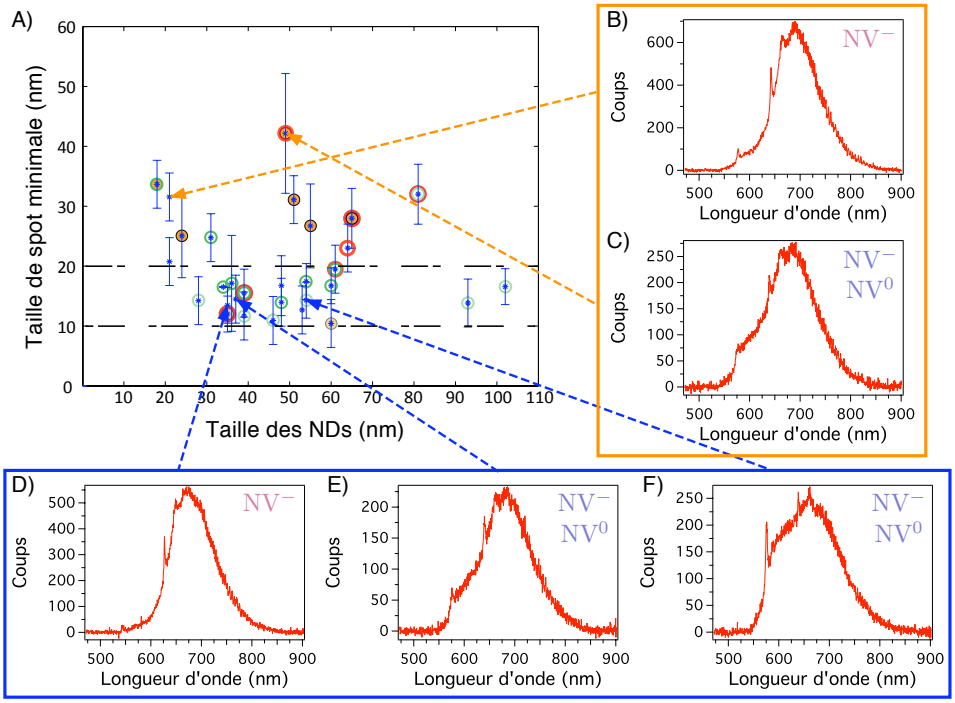

Figure 2.9 : *Exemple de spectres de centres uniques de la série de particules déjà observées en STED. A) Rappel du graphique réunissant la taille minimale de spots observée pour chaque particule en fonction de la taille du ND correspondant. Les lignes en pointillés noirs marquent l'intervalle de meilleure résolution moyenne observée. B), C), D), E) et F) sont les spectres des particules marquées d'une flèche, enregistrés par un spectromètre artisanal, constitué d'un réseau et d'une caméra refroidie en température, installé sur le montage combinant AFM et microscope confocal. Tous les spectres ont été enregistrés sous 400 µW d'excitation continue à 532 nm, pendant 2 min.*

Comme nous venons de le souligner, certaines particules donnent un spot STED de taille notablement supérieure à la taille typique observée. Comme la distribution de taille de spot est très asymétrique et possède des valeurs extrêmes, nous utiliserons la médiane et l'écart interquartile plutôt que la moyenne et l'écart type pour identifier les particules à part. La médiane vaut 16 nm et l'écart interquartile 10 nm. On considère alors toute particule dont la taille de spot est supérieure à 21 nm comme une particule pour laquelle l'effet STED n'est pas optimal.

Une hypothèse pour expliquer cette observation est l'état de charge du centre NV, qui existe sous sa forme neutre (NV^0) ou négative (NV^-), et dont les proportions, dans le cas des nanodiamants, dépendent de leur taille à cause de la présence de défauts de surface résiduels qui piègent les électrons [47]. En effet, ces deux espèces ont des spectres d'émission différents: celui du centre NV^0 est centré sur 620 nm avec la raie zéro-phonon (*Zero Phonon Line*, ZPL) à 575 nm, tandis que celui du centre NV^- est centré autour de 700 nm et avec une ZPL à 638 nm. Il est donc possible que l'efficacité de dépeuplement de l'état excité par le laser STED à 775 nm soit différente pour les deux états de charge du centre NV. Nous avons alors mesuré les spectres de chacune des particules étudiées en STED, et quelques exemples de ces spectres sont donnés en figure 2.9.

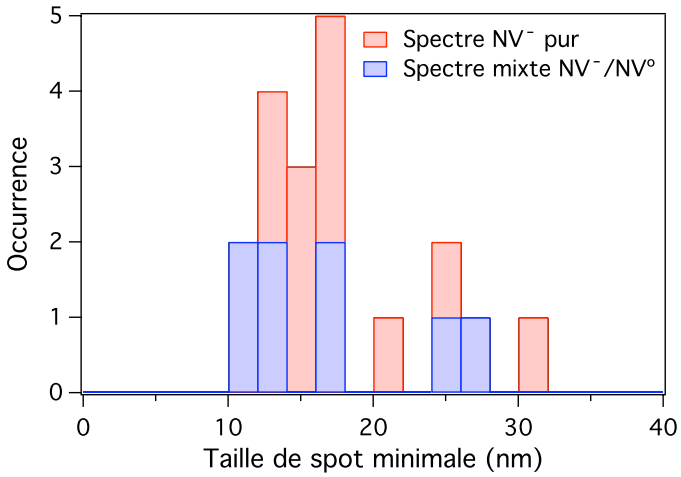

Figure 2.10 : *Histogramme des tailles minimales de spots mesurées en STED en fonction de l'état de charge du centre NV. En rouge sont représentés les centres NV^- purs et en bleu les mélanges de centres NV^- et NV^0.*

On distingue deux catégories de spectres: les centres NV^- purs (Fig. 2.9-B) et D)), et les mélanges de spectres NV^- et NV^0 (Fig. 2.9-C), E) et F)). Comme il s'agit de centres uniques, ces mélanges correspondent à un effet de photochromisme, c'est-à-dire à l'émission en alternance par l'espèce neutre et par l'espèce négative du centre NV (due à

la perte, puis au regain de la charge électronique).

On note que ces catégories donnent lieu à des "petits" spots en STED (<20 nm) mais également des "gros" spots (>20 nm). Les résultats sont rassemblés dans l'histogramme de la figure 2.10. En conclusion, la capacité résolutive du microscope STED développé pour les ND ne dépend donc pas de l'état de charge du centre NV, et la raison pour laquelle nous n'avons pas pu atteindre la résolution minimale du montage pour toutes les particules contenant des centres uniques est autre.

Dépendance de la durée de vie des centres NV en fonction de la taille des nanodiamants hôtes

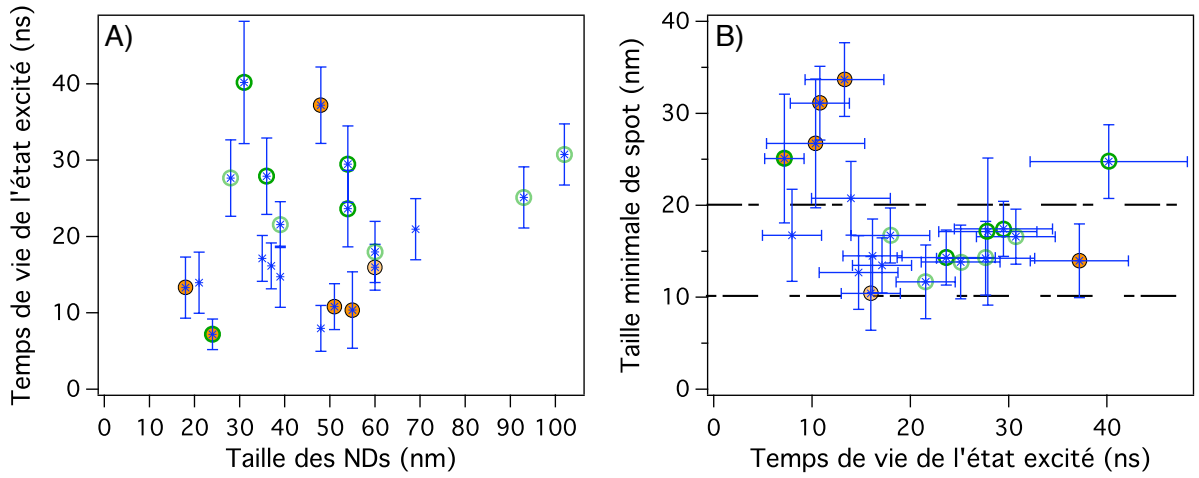

Figure 2.11 : *Mesure de la durée de vie de l'état excité des NV uniques observés précédemment en STED. Les centres sont éclairés par le faisceau d'excitation impulsionnelle à la longueur d'onde de 532 nm avec une puissance moyenne d'environ 60 µW, et le temps d'intégration pour une mesure est de 1 s. A) Durée de vie en fonction de la taille du ND dans lequel il se trouve. B) Taille minimale du spot observé sur les images STED en fonction de la durée de vie de l'état excité du centre NV. Les ronds orange et cercles verts représentent toujours les centres NV ayant un rapport signal sur fond faible en présence d'une puissance STED faible, et les centres NV clignotants.*

Nous nous sommes également intéressés à la durée de vie de l'état excité des centres NV uniques, qui devrait dépendre de la taille du nanodiamant hôte dans le cas du modèle sphérique, comme il est décrit dans la Ref. [48]. Une telle dépendance a déjà été observée au sein de colloïdes de polystyrène dopés avec des ions erbium [57]. Nous avons mesuré la durée de vie des centres déjà observés en STED puis nous l'avons comparée à la taille des ND (Fig. 2.11-A)) ainsi qu'à la résolution maximale obtenue pour chaque particule

(Fig. 2.11-B)). Pour cela, nous avons mesuré l'évolution du signal de fluorescence entre deux impulsions du faisceau d'excitation (environ 130 ns), en fonction du temps, que nous avons ajustée par une exponentielle décroissante dont le temps caractéristique est alors le temps de vie de l'état excité du centre NV.

On ne note pas de lien particulier entre la taille du ND et la durée de vie des centres NV, par contre il semble que les spots dont la taille minimale sur les images STED est supérieure à 20 nm présentent une durée de vie faible par rapport à la moyenne observée. Ce sont également des centres qui ont montré un rapport signal sur fond qui chutait rapidement avec la puissance STED. Cependant, d'autres centres ayant une durée de vie courte ont pourtant été résolus entre 10 et 20 nm, il n'est donc pas certain que les faibles temps de vie soit la seule explication à la mauvaise résolution de certains centres NV.

2.1.4 Interprétation des résultats

Dans la majorité des cas, la largeur à mi-hauteur des spots de fluorescence obtenus par microscopie STED est d'environ 15 nm, quelle que soit la taille des ND. Cette largeur semble donc correspondre à la limite de résolution du système. Ces résultats paraissent ainsi en désaccord avec les prédictions théoriques énoncées en introduction de ce chapitre. Cependant les calculs effectués jusqu'ici concernent la valeur de l'intensité du champ électromagnétique au sein d'un **ND sphérique** quand celui-ci est centré par rapport au faisceau structuré STED. Il a été montré dans ce cas que l'intensité du faisceau STED est homogène à l'intérieur de la particule si celle-ci est de taille petite devant la longueur d'onde du laser STED car elle ne supporte alors qu'un seul mode: le mode dipolaire [48].

Néanmoins lorsque l'on fait une image STED, l'échantillon est balayé et la particule n'est pas constamment centré par rapport au faisceau. Pour cette raison, de nouvelles simulations ont été effectuées par Mondher Besbes (équipe de Jean-Jacques Greffet, Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique), par la méthode des éléments finis en trois dimensions [58]. Elles révèlent que lorsque l'on fait varier la position du centre de l'anneau par rapport au centre du ND, le champ reste pratiquement homogène dans la sphère pour chaque position de l'anneau mais la valeur de l'intensité change (Fig. 2.12). De plus, il s'avère que cette valeur suit exactement celle de l'intensité du faisceau structuré STED dans l'air, pour chaque position relative du ND et du faisceau (Fig. 2.12-B)). Par conséquent, le spot de fluorescence provenant d'un émetteur situé à l'intérieur de la particule peut être aussi petit que si cet émetteur était dans un cristal de diamant de taille millimétrique.

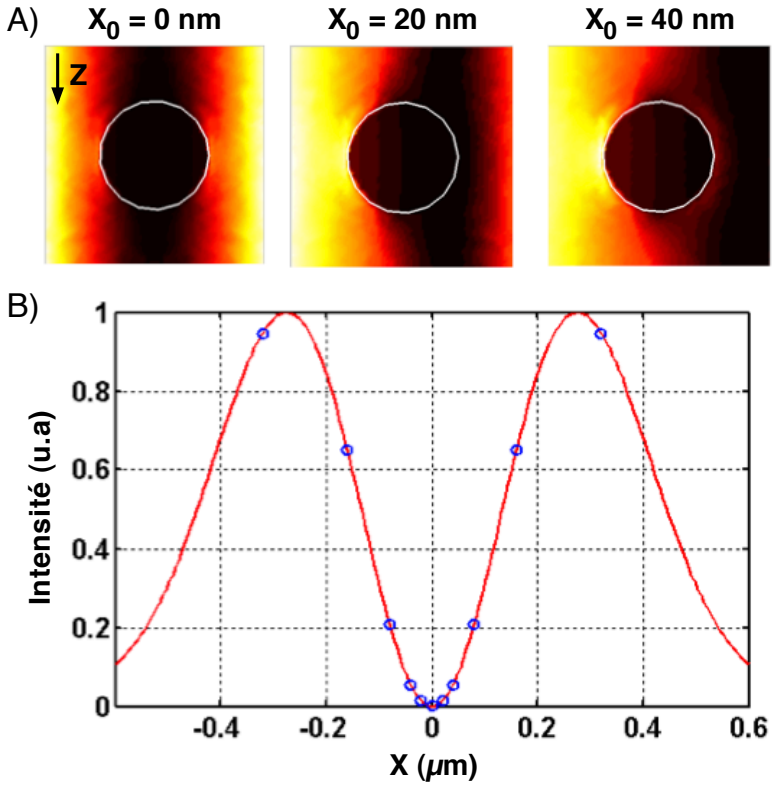

Figure 2.12 : *Calculs numériques 3D de l'intensité du champ du faisceau structuré focalisé à l'intérieur d'une nanoparticule de diamant sphérique, de rayon 50 nm, pour différentes positions du centre du faisceau par rapport au centre de la particule. A) Distribution de l'intensité STED dans le plan (x, z) à l'intérieur du ND lorsque le faisceau se trouve à 0, 20 et 40 nm du centre de la particule. B) Gradient d'intensité créé par le balayage. Les points bleus représentent la valeur de l'intensité au centre du ND lors du balayage et la courbe rouge le faisceau structuré dans l'air.*

Finalement, cette série d'expériences est en très bon accord avec le modèle mais ne permet pas de vérifier ou de réfuter le fait que l'intensité du faisceau STED soit homogène à l'intérieur de la particule. En effet, en raison du balayage, l'imagerie super-résolue d'un centre NV unique donnera le même résultat que le profil d'intensité soit conservé ou pas à l'intérieur du ND. En revanche, il existe une différence si l'on cherche à séparer cette fois deux centres NV dans un même ND.

En effet, dans le cas d'une **particule sphérique** où un seul mode homogène existe le spot fluorescent créé par le centre NV se situe toujours au centre de la sphère quelle que soit la position réelle de l'émetteur dans la particule. Par conséquent, s'il y a plusieurs émetteurs au sein d'un même ND, chacun d'entre eux crée un spot de fluorescence en son centre comme indiqué sur la Figure 2.13) et il est impossible de les séparer spatialement par microscopie STED.

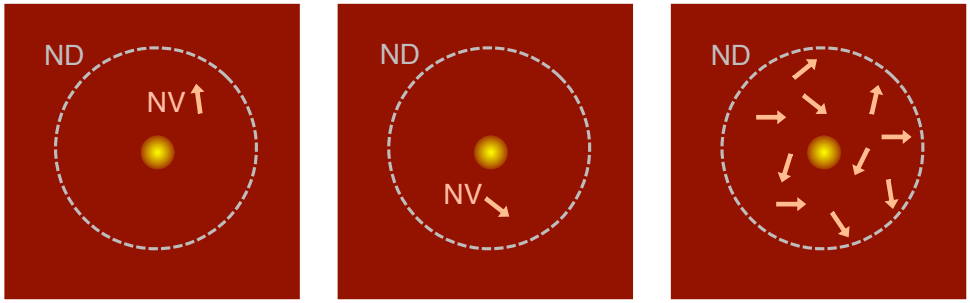

Figure 2.13 : *Schéma des images STED prédites par notre modèle en fonction de la position et du nombre de centres NV au sein d'une particule de diamant* **sphérique** *dont la taille est suffisamment petite (typiquement<50 nm) pour que seul le mode dipolaire soit présent.*

Nous avons testé cette prédiction expérimentalement, afin de déterminer si le modèle de nanoparticule de diamant de forme sphérique supportant un unique mode dipolaire est une approximation acceptable pour la microscopie super-résolue. C'est l'objet du paragraphe suivant.

2.2 Imagerie STED de nanodiamants contenant plusieurs centres colorés NV

Dans le même échantillon que celui étudié dans la section précédente, certains spots ont une intensité de fluorescence 3 à 4 fois plus élevée que celle d'un centre NV unique en microscopie confocale, indiquant *a priori* la présence de plusieurs centres NV et confirmée en général par le fait que le dégroupement de photon n'est que partiel. Ce sont ces spots que nous étudions dans cette section.

2.2.1 Images STED

Pour chaque nouvelle particule pré-caractérisée, on réalise à nouveau une série d'images STED dans les mêmes conditions que celles décrites en section 2.1.2, en augmentant pas à pas la puissance du faisceau STED. Les images STED de la figure 2.14 réalisées à puissance de faisceau optimale, montrent de façon inattendue (si l'on s'en tient à la représentation d'un ND par une sphère de taille <50 nm) plusieurs spots fluorescents séparés dans un même spot confocal.

Par ailleurs, on constate sur la particule n° 331 de la Fig. 2.15 que la taille minimale d'un spot individuel est identique à celle obtenue dans le cas d'un ND contenant un seul

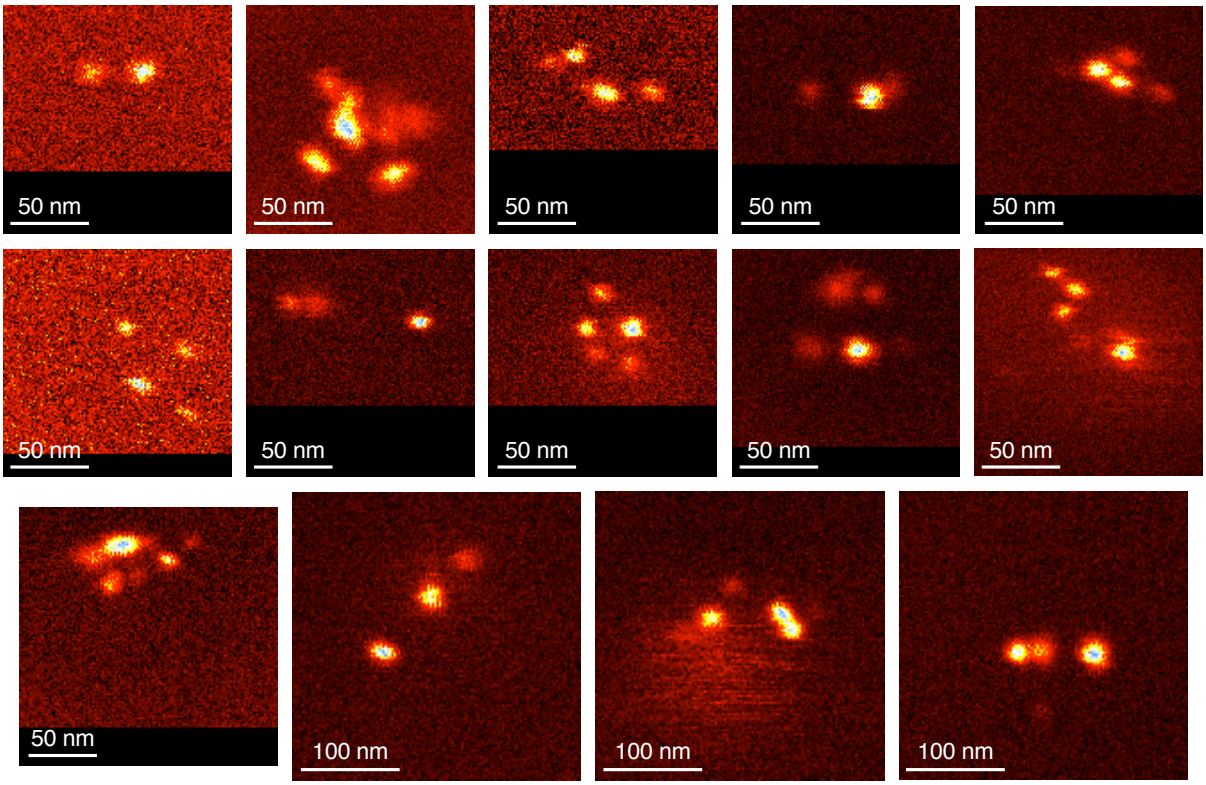

Figure 2.14 : *Images STED les mieux résolues pour 14 nanodiamants contenant plusieurs centres NV. Les puissances STED utilisées se situent entre 200 mW et 1 W.*

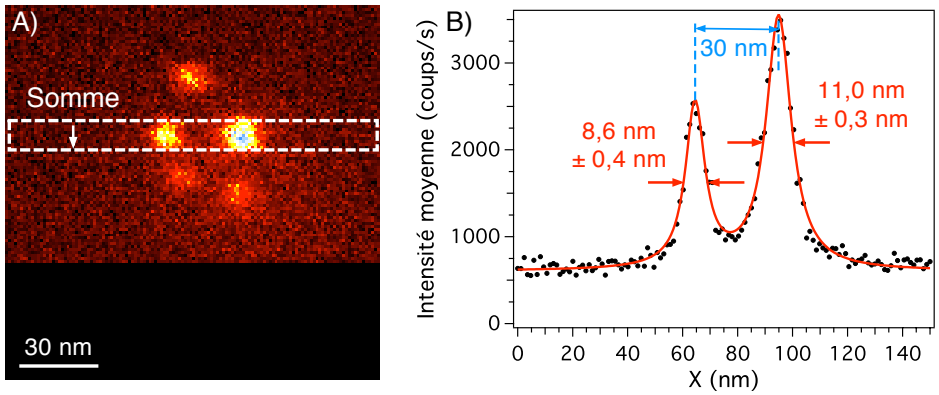

Figure 2.15 : *A) Image STED de la particule n° 331. B) Somme verticale d'une dizaine de coupes horizontales de l'image STED, représentée sur la figure A) par le rectangle pointillé blanc. On représente sur le graphique l'intensité moyenne des coupes: les points noirs sont les points expérimentaux et la courbe rouge un ajustement par une double Lorentzienne.*

centre NV, et même légèrement plus petite pour certains spots en raison d'un meilleur réglage du microscope. Cependant, tous les spots observés ne sont pas aussi petits. Comme

précédemment, certains spots ont un rapport signal/fond qui chute rapidement avec la puissance STED et "disparaissent" pour des puissances assez faibles. Aussi, du fait que la polarisation du laser d'excitation est linéaire, les différents centres NV n'absorbent pas tous aussi efficacement, selon l'orientation respective de leur dipôle d'absorption et de la polarisation incidente. On devine parfois la présence de deux centres très proches dans le même spot. On remarque également que l'on peut facilement distinguer deux spots séparés de quelques dizaines de nanomètres (Fig. 2.15).

2.2.2 Détermination de la présence de cristaux uniques

À partir de ces résultats qui ne correspondent pas aux prédictions de notre modèle (Fig. 2.13) on peut se demander:

1. si le nombre de spots observés correspond au nombre de centres NV dans la particule, ou bien si nos observations indiquent plutôt la présence d'un plus petit nombre de centres avec une distribution spatiale inhomogène du champ, due au fait que dans une nanoparticule non sphérique le champ se décompose sur les multipôles et n'a pas une simple composante dipolaire [59],
2. si les spots observés sont dans le même nanodiamant. En effet, les images AFM montrent des particules assez isolées, mais la résolution latérale, de l'ordre de seulement 80-100 nm, ne permet pas d'exclure la présence de petits agrégats de quelques particules de tailles inférieures à 50 nm, que le bain à ultrason et le dépôt à la tournette n'ont pas réussis à briser. Il se pourrait que chaque spot observé en STED provienne en réalité d'une seule particule à la fois et que l'échantillon soit constitué de petits agrégats isolés de ND.

Un premier test simple pour déterminer si nous observons la structure modale du champ intra-particulaire, révélée par un petit nombre de centres NV (voire un seul), ou bien s'il s'agit de plusieurs centres colorés, est d'étudier la corrélation entre le nombre de spots vus en STED et l'intensité de fluorescence, qui doit être proportionnelle au nombre de centres NV que contient le ND. La figure 2.16 montre une tendance de variation linéaire entre ces deux paramètres. La courbe semble saturer à 7 centres, mais cela est compatible avec le fait qu'il est impossible de résoudre un plus grand nombre de centres dans un ND de taille $<$100 nm, compte tenu de la taille d'un seul spot, de l'ordre de 15 nm. Ces observations sont en faveur de l'observation de plusieurs centres NV dans un ND et non de la structure inhomogène du champ multimodal. Nous n'avons d'ailleurs jamais observé de structures modales multispots pour des ND contenant un seul centre NV, tel qu'identifié par le dégroupement de photon.

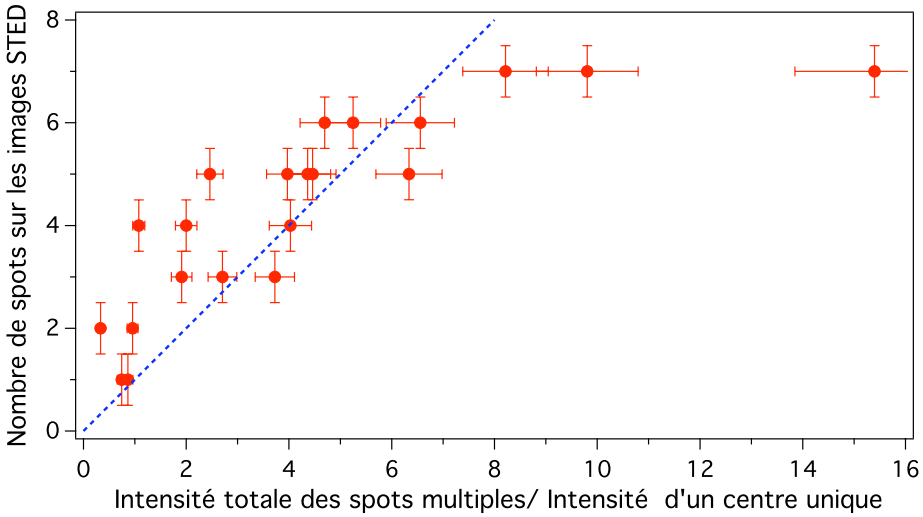

Figure 2.16 : *Nombre de spots identifiés sur les images STED en fonction du signal mesuré en mode confocal, normalisé par le signal d'un centre NV unique (points rouges) ainsi que la fonction $y = x$ (pointillés bleus).*

Nous avons tout de même complété notre analyse par l'étude du nombre de pics de **résonances du spin électronique (ESR) du centre NV$^-$**, qui peut être complémentaire du dégroupement de photon pour caractériser le nombre d'émetteurs. Enfin, à ce stade, on ne peut toujours pas exclure que les multispots proviennent de plusieurs ND agrégés étant donnée la résolution insuffisante de l'imagerie AFM. Aussi, à l'issue des études STED, nous avons ré-imagé chaque ND d'intérêt par **microscopie électronique**. Nous présentons ces deux études dans les sous-sections suivantes.

Résonance de spin électronique du centre NV$^-$

Nous avons installé, sur le montage STED de Göttingen, un dispositif de mesure optique de la résonance de spin électronique du centre NV$^-$. En effet, le niveau fondamental et le premier état excité sont des triplets de spin. Pour l'état fondamental, la dégénérescence des sous-niveaux $m_s = 0$ et $m_s = \pm 1$ est levée par le *zero-field splitting* spécifique à la symétrie du système, avec une fréquence séparant ces niveaux, de 2.87 GHz (Fig. 2.17-A)). Une spécificité remarquable du centre NV$^-$ est que l'intensité de fluorescence dépend du sous-niveau de spin vers lequel s'effectue la transition de fluorescence, si bien que nous disposons d'une lecture optique de ce sous-niveau: on dit que le spin électronique du centre NV$^-$ est détectable optiquement.

En effet, si l'on excite un centre NV$^-$ depuis le sous-niveau de spin $m_s = \pm 1$, la probabilité qu'il retourne dans l'état fondamental en émettant un photon est plus faible

d'environ 20% par rapport à la situation où l'excitation est faite depuis le sous-niveau $m_s = 0$. La probabilité d'une désexcitation non-radiative (via un ensemble de niveaux métastables) est en effet plus élevée depuis le sous-niveau $m_s = \pm 1$ que $m_s = 0$. L'intensité de fluorescence sera donc plus faible d'environ 20% si le centre NV cycle entre sous-niveaux $m_s = \pm 1$ de l'état fondamental et de l'état excité, qu'entre sous-niveaux $m_s = 0$. Aussi, l'application d'un champ micro-onde à la fréquence de résonance du spin électronique 2.87 GHz, modifie les populations respectives des sous-niveaux $m_s = \pm 1$ et $m_s = 0$, entrainant une diminution du signal de fluorescence par rapport à la situation où il n'y a pas de champ micro-onde ou bien où il est désaccordé en fréquence, loin de la résonance: la résonance ESR se manifeste ainsi par un pic de diminution d'intensité lors du balayage de la fréquence du champ micro-onde (Fig. 2.17-B)).

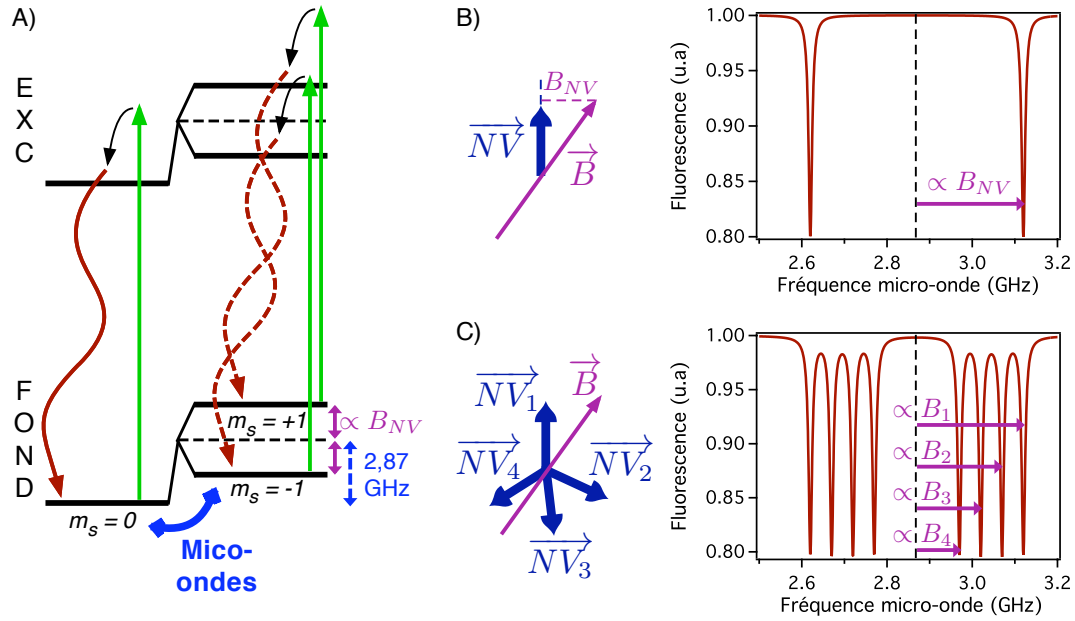

FIGURE 2.17 : *A) Niveaux d'énergie du centre NV⁻ en présence d'un champ magnétique statique. Les flèches droites vertes représentent l'excitation, communément à la longueur d'onde de 532 nm, et les flèches courbes rouges représentent la fluorescence correspondante. Les pointillés indiquent une intensité de fluorescence entre les sous-niveaux de spin $m_s = \pm 1$ par rapport à l'état $m_s = 0$. B) Spectre ESR d'un centre NV unique. On observe deux raies quand la fréquence micro-onde est accordée aux transitions de spin. C) Spectre ESR d'un ensemble de centres NV dans la même maille cristalline. Du fait des 4 orientations possibles des NV dans la maille, on observe 4 paires de raies dans le spectre.*

Si on applique en plus un champ magnétique constant, on lève la dégénérescence des sous-niveaux $m_s = +1$ et $m_s = -1$ par effet Zeeman d'une valeur proportionnelle à la projection B_{NV} du champ sur l'axe du centre NV⁻. En présence du champ micro-onde de fréquence balayable, la mesure de l'intensité de fluorescence, qui chute lorsque que la

micro-onde est accordée à la transition de spin $|0\rangle \rightarrow |+1\rangle$ ou $|0\rangle \rightarrow |-1\rangle$, permet une mesure du champ B_{NV} (Fig. 2.17-B)). Cette technique a de nombreuses applications en magnétométrie [60, 61].

L'hamiltonien H de ce système s'écrit alors [62]:

$$H = D\left(S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)\right) + g\mu_B \overrightarrow{B} \cdot \overrightarrow{S} \tag{2.2}$$

où D est le coefficient de levée de dégénérescence en champ nul (*zero-field splitting*), $\overrightarrow{S}$ le spin électronique total ($S = 0, 1$), $\overrightarrow{B}$ le champ magnétique appliqué, g le facteur de Landé de l'électron et μ_B le magnéton de Bohr.

Le diamant ayant une symétrie cristalline cubique à faces centrées, seules quatre orientations sont possibles pour le centre NV, donnant lieu à quatre projections possibles d'un champ magnétique extérieur $\overrightarrow{B}$ quelconque, sur chacune de ces directions. S'il y a suffisamment de centres colorés dans un nanodiamant pour que chacune de ces orientations soit représentée, quatre paires de raies ESR apparaissent au plus dans le spectre (Fig. 2.17-C)). La présence d'au maximum huit raies est une indication forte en faveur du fait que les centres NV qui donnent lieu à ces résonances, sont contenus dans une seule et même maille cristalline et non dans plusieurs comme ce serait le cas si nous avions des ND agrégés.

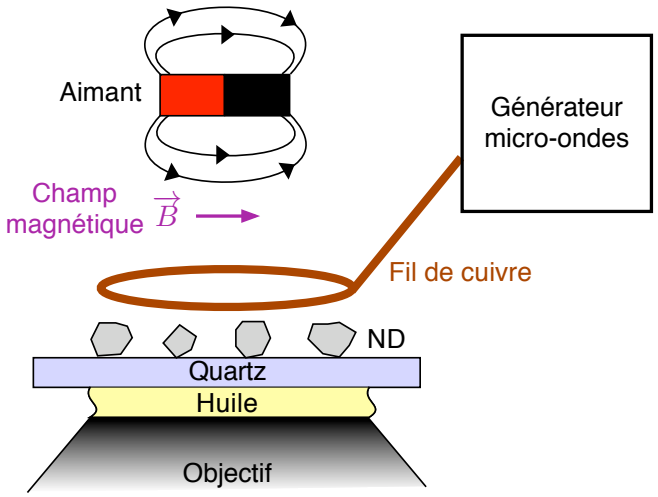

Figure 2.18 : *Schéma du montage pour les mesures ESR. La boucle de cuivre sert d'antenne pour amener les ondes générées et contrôlées par le générateur micro-onde. L'aimant crée le champ magnétique statique.*

Nous avons enregistré les spectres ESR de chacun des ND observés en microscopie STED. Pour cette mesure, on ajoute au montage précédent un aimant, qui crée le champ

magnétique statique $\overrightarrow{B}$, ainsi qu'une boucle en cuivre, placée à proximité de l'échantillon qui rayonne le champ micro-onde à proximité des centres NV (Fig. 2.18) et autour de la fréquence de résonance 2.87 GHz.

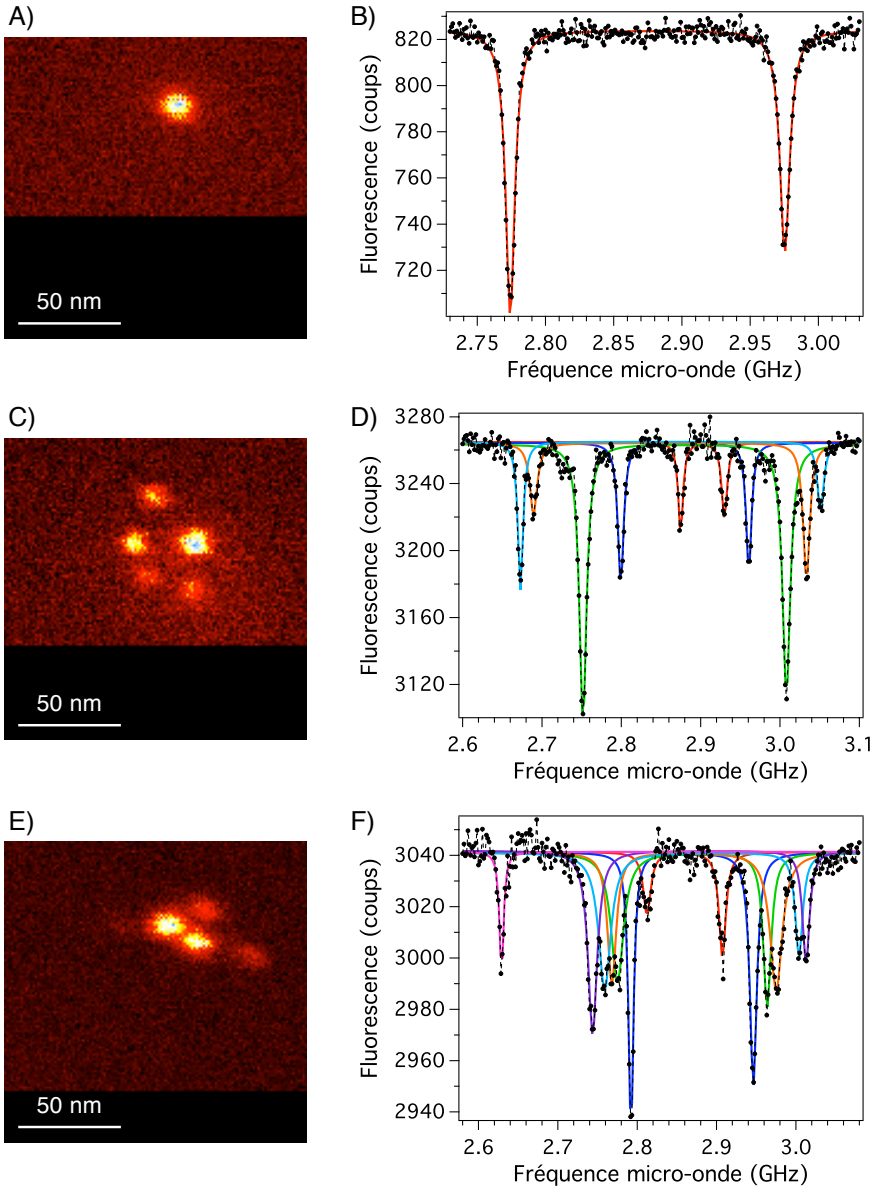

Figure 2.19 : *A) Image STED d'un centre unique, provenant de la première série de mesures. B) Mesure ESR correspondante. On observe bien les deux raies attendues. C) et E) Images STED d'un ensemble de centres NV, provenant de la deuxième série de mesures. D) et F) Mesures ESR correspondantes. On observe plus de raies que les quatre paires que l'on pourrait attendre d'un cristal unique.*

On donne en exemple dans la figure 2.19 trois spectres ESR. Le premier (fig. 2.19-B)) est celui d'un centre NV^- unique provenant de la première série de mesures (section 2.1).

Cette mesure permet en premier lieu de vérifier que le système fonctionne puis d'évaluer la largeur d'une raie (ici environ 10 MHz). Les deux autres mesures concernent des particules qui contiennent plusieurs centres NV (Fig. 2.19-D) et F)). On note la présence de 5 paires de raies (Fig. 2.19-D)) et de 6 paires de raies (Fig. 2.19-F)) au lieu de 4 attendues au maximum, et bien que la particule de la Fig. 2.19-E) ne montre que 4 (éventuellement 5) spots sur l'image STED.

Le modèle présenté sur la figure 2.17 correspond rigoureusement à ce que l'on peut observer dans un monocristal de diamant macroscopique en l'absence de contraintes mécaniques [63]. Cependant dans les cristaux de taille nanométrique, ces contraintes ne peuvent pas être négligées, et sont même très différentes d'un bout à l'autre du ND. Il est nécessaire alors d'ajouter un terme supplémentaire à l'hamiltonien H du centre NV (Eq. (2.2)), que l'on peut réécrire:

$$H = D\left(S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)\right) + g\mu_B \overrightarrow{B} \cdot \overrightarrow{S} + E(S_x^2 - S_y^2) \tag{2.3}$$

où E est le coefficient de levée de dégénérescence induite par contraintes mécaniques (*strain splitting*). Il varie d'un point à l'autre du cristal et est d'autant plus grand que la maille est déformée. Ainsi, deux centres NV de même orientation cristalline peuvent donner lieu à deux paires de raies indépendantes, séparées deux à deux d'une différence de fréquence allant jusqu'à $E = 40$ MHz (séparables étant donné que la largeur d'une raie est de l'ordre de 10 MHz). En raison de la présence de ces contraintes, il est donc difficile d'utiliser le nombre de raies ESR pour compter le nombre de particules.

Microscopie électronique à balayage

Les mesures ESR étant difficiles à interpréter, afin de conclure sur la présence d'agrégat on a utilisé deux techniques de microscopie électronique: la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique à transmission (MET). Le MEB a pour grand avantage de pouvoir fonctionner avec des lames de quartz, sous réserve de métalliser la surface pour évacuer les charges, mais la résolution que l'on obtient est bien inférieure à celle du MET. En revanche, le MET nécessite des substrats pouvant être facilement traversés par les électrons, et il est donc impossible d'imager les mêmes particules que celles étudiées précédemment et qui ont été déposées sur les lamelles de quartz, mais c'est une solution alternative si le MEB ne donne pas satisfaction, à condition de reprendre l'étude optique.

Ces deux approches ont été développées en parallèle en Allemagne par Silvia Arroyo-Camejo doctorante dans le groupe de Stefan Hell, en collaboration avec le centre de

microscopie électronique de l'Institut Max Placnk de Stuttgart; et par nous-même en collaboration avec Sophie MEURET doctorante de Mathieu KOCIAK au Laboratoire de Physique des Solides (LPS) à Orsay.

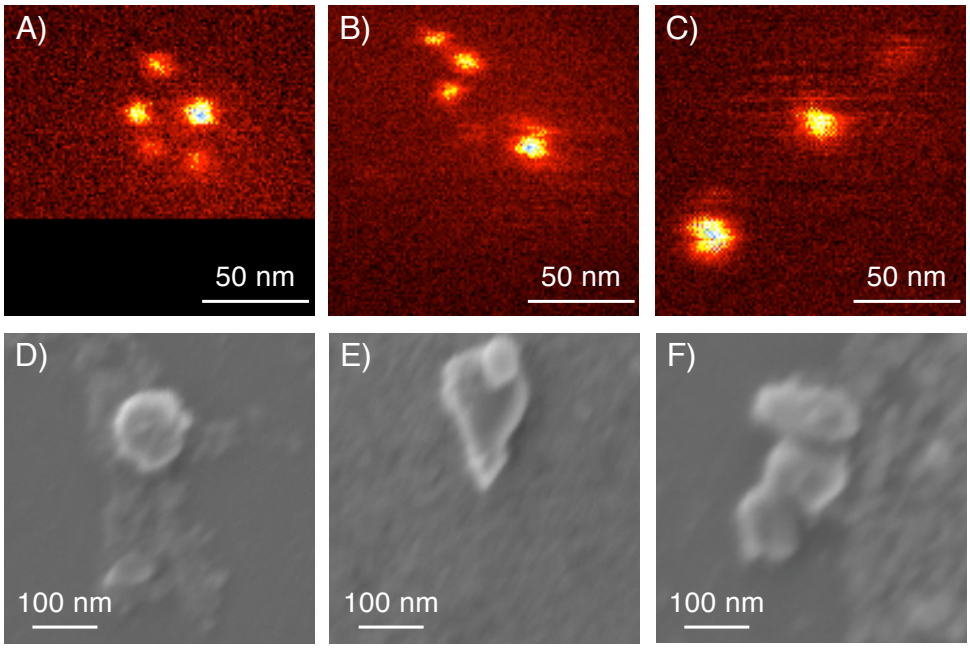

FIGURE 2.20 : *A), B), C) 3 images STED montrées précédemment et D), E), F) les images MEB correspondantes.*

Le centre pour la microscopie électronique de l'Institut Max Planck de Stuttgart, dirigé par le Prof. VAN AAKEN, a accepté de nous aider dans nos investigations concernant la présence d'agrégats sur les échantillons. Les mesures ont été faites à l'aide d'un microscope Zeiss DSM 982 Gemini, avec une énergie de faisceau de 1 keV. Des premiers tests sans métalliser la surface ont donné des résultats encourageants, mais l'échantillon se chargeait néanmoins. Nous avons donc décidé d'appliquer une couche d'épaisseur 0.3 nm d'un alliage de platine et de palladium, rendant ainsi impossible toute mesure optique future mais permettant d'améliorer grandement la résolution.

La figure 2.20 montre trois catégories de nanodiamants: une particule unique en D), deux particules posées l'une sur l'autre en E) et trois particules côte à côte en F). Il est donc assez aisé de distinguer agrégats et particules isolées. Parmi toutes les particules contenant plusieurs centres NV, étudiées précédemment, seulement trois sont agrégées (Fig.2.21) et toutes les autres sont finalement des cristaux isolés. On remarque que la forme des particules varie beaucoup d'un ND à l'autre et qu'en moyenne les dimensions latérales sont deux fois supérieures aux hauteurs mesurées à l'AFM. **En conclusion,** il est possible de résoudre par microscopie STED des centres NV au sein d'une même

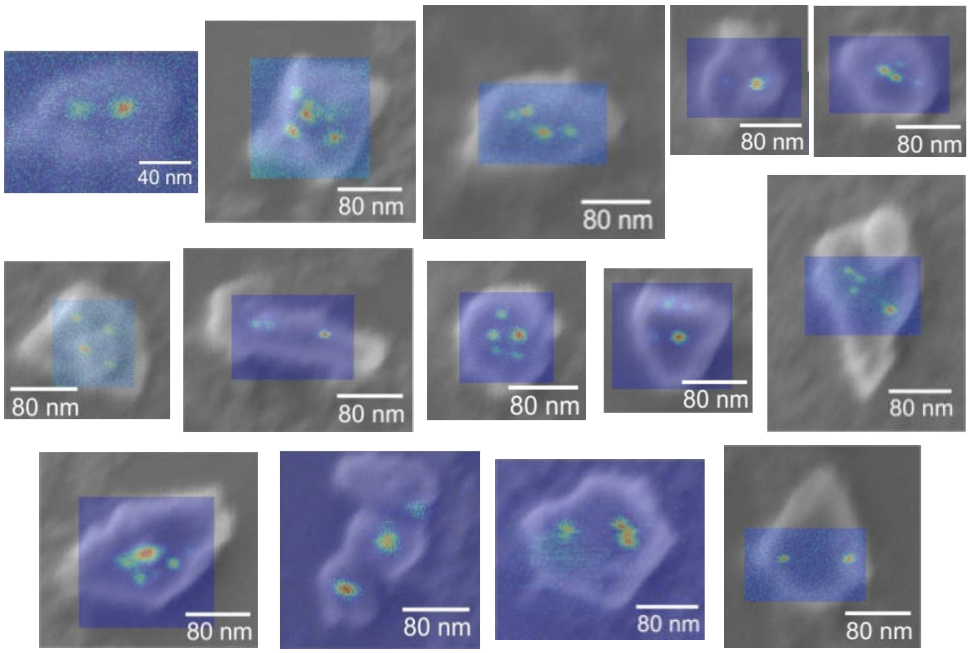

Figure 2.21 : *Images MEB des 14 particules sélectionnées, superposées aux images STED correspondantes. La superposition est seulement approximative, les échelles sont respectées, mais la position entre les deux modes d'imagerie n'est pas connue précisément.*

particule de diamant de taille inférieure à 100 nm.

Microscopie électronique par transmission

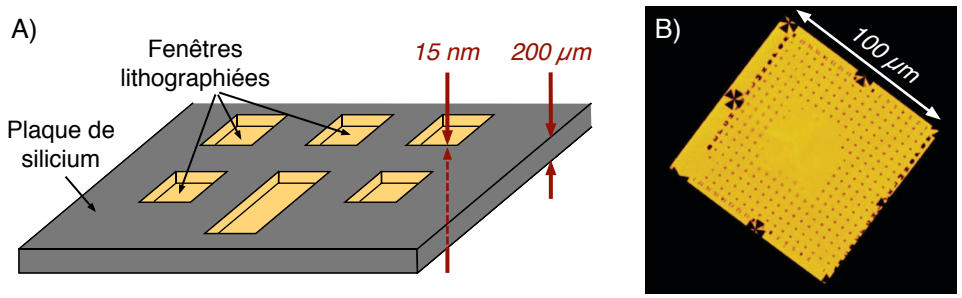

Figure 2.22 : *A) Schéma d'une pellicule de silicium aminci compatible avec des observations en microscopie de fluorescence ou en microscopie électronique en transmission. Les fenêtres qui apparaissent en jaune sont creusées dans la plaque de silicium et font seulement 15 nm d'épaisseur. Une grille numérotée a été photoinscrite par le LPS sur la face du dessous afin de pouvoir retrouver la même particule sur les différents montages. B) Image en lumière blanche d'une fenêtre lithographiée de 100 µm de côté. Les lignes et les colonnes sont numérotées par des chiffres et des lettres respectivement.*

Dans le cas où le MEB n'aurait pas donné de résultats assez clairs pour déterminer la présence ou non d'agrégats, nous avons réalisé des premiers essais sur des pellicules de silicium amincies jusqu'à 15 nm d'épaisseur dans une fenêtre carrée de 100 μm de coté, sur lesquelles l'équipe du LPS a photogravé une grille de repérage permettant de combiner l'imagerie de fluorescence et l'imagerie MET (Fig. 2.22).

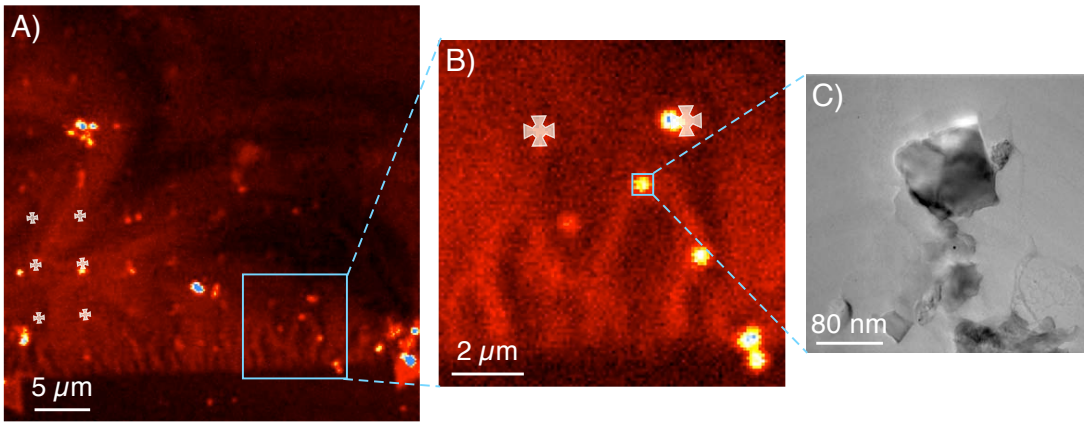

Figure 2.23 : *A) Image de fluorescence d'une fenêtre où l'on a déposé une goutte de solution de ND. Les marques blanches représentent certains des plots d'or lithographiés, on reconnait dans leur prolongement les autres marques de ces plots qui fluorescent. Les autres spots de fluorescence sont les ND. B) Zoom de l'image A). On observe six spots confocaux de centres NV. On remarque aussi une modulation du fond de lumière, dû aux plis de la fenêtre de très faible épaisseur soumise à de forte contraintes à proximité des bords. C) Image MET correspondant à l'un des spots de fluorescence. Cette "particule" montre une forte agrégation.*

La figure 2.23 montre les premières images réalisées sur ces lames. Après avoir passé le support de silicium au nettoyeur plasma oxygène pour le rendre hydrophile, on dépose une goutte de solution de nanodiamants, que l'on distingue facilement en plus des marques de lithographie sur l'image de fluorescence (Fig. 2.23-A)). On réalise ensuite plusieurs images MET des particules repérées en fluorescence, dont une est en exemple en figure 2.23-C). On a observé une forte agrégation des particules, qui vient probablement de la méthode de "dépôt". Il aurait fallu faire ces dépôts à la tournette avec un support approprié pour le substrat. Nos efforts se sont arrêtés là, au vu des très bons résultats qu'ont donnés les images MEB, qui ont permis de conclure que la grande majorité des nanoparticules observées ne sont pas agrégées. Cela signifie que la microscopie STED permet de résoudre plusieurs centres NV au sein d'une seule et même particule.

2.2.3 Interprétation finale

Nos observations indiquent qu'il doit exister un gradient de champ à l'intérieur du nanodiamant à chaque position du faisceau STED, contrairement à ce que nous avions énoncé au début de ce chapitre. Nous avons alors repris les simulations avec l'équipe de Jean-Jacques Greffet et nous nous sommes aperçu que l'assertion d'homogénéité du champ dans une particule sphérique n'était pas juste. En effet, bien que le champ à l'intérieur de la sphère soit très atténué, il existe cependant une certaine structure, comme le montre les simulations présentées en échelle logarithmique en figure 2.25. Cette structure pourrait donner lieu à une résolution intraparticule si l'intensité du faisceau STED à l'intérieur de la sphère est en certains points suffisante pour stimuler la transition du centre NV et en d'autres non. Nous avons donc évalué dans un premier temps l'intensité nécessaire pour dépeupler l'état excité du centre NV à partir de simulations réalisées dans une lame de diamant massif, puis nous avons reporté cette valeur sur les simulations réalisées dans des particules de différentes géométries, afin d'estimer les résolutions accessibles dans les nanodiamants.

Modélisation du champ STED dans le diamant massif

Nous avons considéré un échantillon de diamant massif de 300 μm d'épaisseur, en contact direct avec l'huile à immersion de l'objectif, et nous avons calculé le profil d'intensité du faisceau structuré focalisé à 7 μm de la surface du diamant. Les résultats de ces simulations, réalisées par Jean-Paul Hugonin (Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique), sont présentés sur la figure 2.24. Sachant que la plus petite résolution obtenue pour un centre NV dans un échantillon massif est de l'ordre de 8 nm, on peut déduire de ces simulations l'intensité nécessaire pour obtenir une telle résolution, que l'on appellera intensité critique I_c. On trouve que I_c est égal à $4 \cdot 10^{-4}$ de la valeur d'intensité maximale du faisceau noté I_{max}.

Cette valeur I_c nous donne un point de comparaison avec les simulations dans les nanodiamants, qui va nous permettre d'évaluer la résolution attendu dans le cas d'une particule sphérique et d'une particule cylindrique.

Modélisation du champ STED à l'intérieur d'un ND sphérique et cylindrique

De nouvelles simulations du champ STED à l'intérieur d'une sphère de diamant de diamètre 50 nm, posée sur une lame de verre ont été réalisée par Jean-Paul Hugonin, pour différentes positions du faisceau (Fig. 2.25). L'échelle logarithmique met en évidence une structure de champ atténuée à l'intérieur de la sphère, qui s'annule strictement au

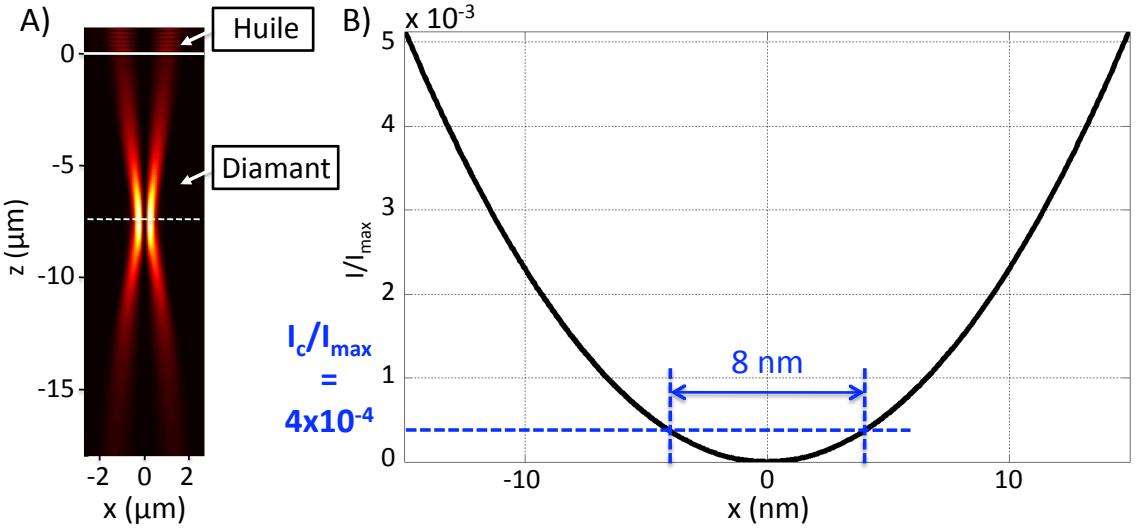

Figure 2.24 : *Calcul numérique de la propagation d'un faisceau structuré dans un échantillon de diamant massif de 300 µm d'épaisseur. Le faisceau se propage dans le sens négatif le long de l'axe z, et est focalisé à 7 µm en dessous de la surface. A) Distribution d'intensité du faisceau dans le plan (xy) à l'intérieur de la lame de diamant. La ligne pleine blanche marque l'interface huile-diamant, et la ligne pointillée blanche la profondeur où est focalisé le faisceau ($z = -7$ µm). B) Profil d'intensité selon l'axe x, pris en $z = -7$ µm et agrandi autour du minimum du faisceau. La ligne horizontale en pointillés bleus marque l'intensité critique $I_c = 4 \cdot 10^{-4} I_{max}$, correspondant à une résolution de 8 nm.*

centre lorsque le faisceau est centré avec la particule. En fait, le couplage au mode dipolaire, que l'on pensait responsable de l'homogénéisation du champ, est rigoureusement nul en présence d'un faisceau structuré de forme d'annulaire [64, 65]. Ce sont les modes d'ordre supérieur qui contribuent et créent le gradient d'intensité à l'intérieur de la sphère. De plus, ce champ intraparticule est suffisamment élevé pour stimuler la transition d'un centre NV et en reportant la valeur de I_c (ligne horizontale en pointillée bleu sur la figure 2.25-D)) on estime une résolution de 13 nm.

Lorsque le faisceau est balayé, le mode dipolaire n'est plus strictement nul, mais reste négligeable devant les modes d'ordre supérieur de la sphère. Ainsi, la structure du champ dans la particule reste suffisamment piquée et conduit à une résolution de 13 nm et 10 nm pour les déplacements du faisceau de 5 nm et 20 nm respectivement. A puissances de faisceau égales, les résolutions attendues en tout point de la sphère sont donc très similaires à ce qui est observé dans un échantillon de diamant massif. Néanmoins, on note un décalage entre le minimum du champs dans la sphère et la position du faisceau entrainant de légères distorsions d'images, plus marquées sur le bord du ND.

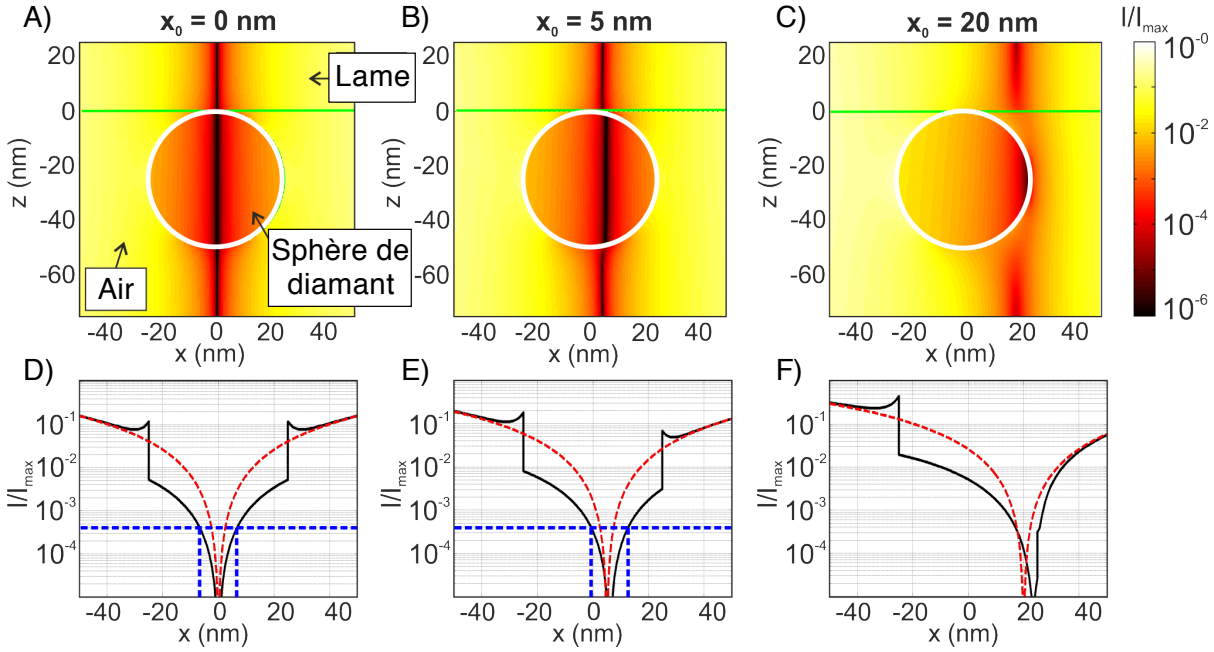

Figure 2.25 : *Calcul numérique de la propagation d'un faisceau structuré dans une sphère de diamant de 50 nm de diamètre, posée sur une lame de verre (dont l'interface verre-air est marquée par la ligne verte). Le faisceau se propage dans le sens négatif le long de l'axe z, et est focalisé à l'interface verre-air ($z = 0$). Les distributions d'intensité STED sont données pour trois déplacements du faisceau par rapport au centre de la sphère, noté x_0: A) et D) $x_0 = 0$, B) et E) $x_0 = 5$ nm, C) et F) $x_0 = 20$ nm. A)-C) Distributions d'intensité du faisceau dans le plan (xz) à l'intérieur et autour de la sphère, représentées en échelle logarithmique. D)-F) Profils d'intensité selon l'axe x, pris au centre de la sphère ($z = -25$ µm). Les lignes pleines noires sont les valeurs d'intensités avec la sphère et les lignes pointillées rouges les intensités de référence, dans l'air. Les lignes horizontales en pointillés bleus marque l'intensité critique $I_c = 4 \cdot 10^{-4} I_{max}$, et donne lieu à une résolution (marquée par les lignes verticales en pointillés bleus) de l'ordre de 10-15 nm dans les trois cas.*

En complément du cas sphérique, nous avons considéré une nanoparticule de forme cylindrique comme le ND n° 331 de la figure 2.20-D), de diamètre ≈ 80 nm et de hauteur ≈ 75 nm. Les résultats pour cette géométrie, présentés en figure 2.26, confirment qu'il existe un gradient d'intensité à l'intérieur de la particule pour toutes les positions du faisceau par rapport au ND, ce qui explique qu'on puisse séparer les centres NV dans une même particule et qu'il y ait au moins autant de centres NV que de spots résolus par microscopie STED. Les résolutions attendues sont de 14,5 nm, 16 nm et 16,5 nm pour les déplacements respectifs du faisceau de 0, 10 nm et 30 nm. De même que pour la sphère, on note dans le cylindre une légère distorsion de la position du minimum d'intensité dans la particule par rapport à celle du faisceau.

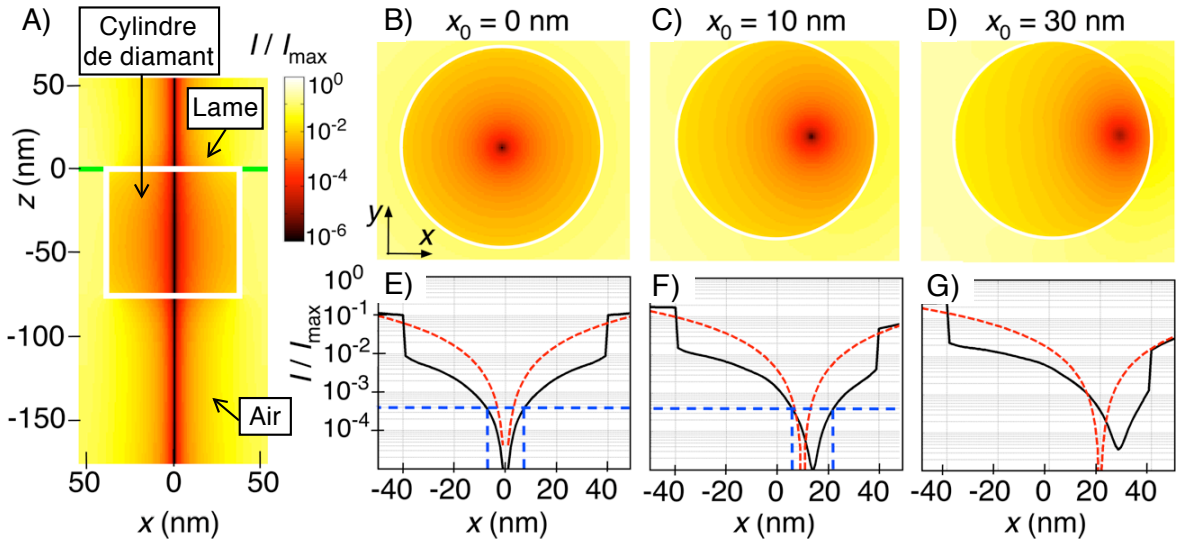

Figure 2.26 : *Calcul numérique de la propagation d'un faisceau structuré dans un cylindre de diamant de 80 nm de diamètre et 70 nm de hauteur, posée sur une lame de verre (dont l'interface verre-air est marquée par la ligne verte). Le faisceau se propage dans le sens négatif le long de l'axe z, également axe de révolution du cylindre, et est focalisé à l'interface verre-air ($z = 0$). Les distributions d'intensité STED sont données pour trois déplacements du faisceau par rapport au centre de la sphère, noté x_0: A), B) et E) $x_0 = 0$, C) et F) $x_0 = 10$ nm, D) et G) $x_0 = 30$ nm. A) Distribution d'intensité du faisceau dans le plan (xz) à l'intérieur et autour du cylindre, représentée en échelle logarithmique. B)-D) Distributions d'intensité du faisceau dans le plan (xy), en échelle logarithmique également. E)-G) Profils d'intensité selon l'axe x, pris au centre du cylindre ($z = -37,5\mu m$). Les lignes pleines noires sont les valeurs d'intensités avec la sphère et les lignes pointillées rouges les intensités de référence, dans l'air. Les lignes horizontales en pointillés bleus marque l'intensité critique $I_c = 4 \cdot 10^{-4} I_{max}$, et donne lieu à une résolution (marquée par les lignes verticales en pointillés bleus) de l'ordre de 10-15 nm dans les trois cas.*

Cette nouvelle interprétation décrit cette fois toutes les observations expérimentales réalisées sur des ND contenant un ou plusieurs centres NV. Dans le cas cylindrique comme dans le cas sphérique, il existe une multitude de modes du champ électromagnétique qui permettent d'encoder précisément la position d'un centre NV à partir de sa fluorescence.

2.3 Conclusion

Nos observations sont cohérentes avec le fait qu'il existe un gradient d'intensité du faisceau STED à l'intérieur de nanoparticules de diamant de taille bien inférieure à la longueur d'onde du faisceau structuré. L'amplitude de ce gradient est suffisamment grande

pour que les largeurs de spots issus de fluorescence de centres NV dans un ND de forme quelconque soient comparables à ce qui a déjà été observé dans les cristaux "massifs", à puissance de faisceau STED équivalente. Ce résultat nous indique que la microscopie STED est aussi un outil approprié à l'observation de défauts fluorescents au sein de nanoparticules diélectriques. Ce travail a donné lieu à une publication dans la revue ACS Nano sous le titre "*STED microscopy resolves individual NV centers in diamond nanocrystals*" [66].

D'autres techniques de **superlocalisation** ont également été utilisées, peu de temps avant notre étude, pour séparer spatialement des centres NV à l'intérieur d'un seul nanodiamant, l'une de manière stochastique en utilisant le scintillement des centres (qui peuvent se retrouver transitoirement dans un état noir métastable) [67] et l'autre grâce la résonance de spin électronique détectable optiquement des NV^- [68]. Ces deux techniques sont des techniques de champ large, ne nécessitant pas de temps d'acquisition très long, elles ont donc l'avantage de pouvoir observer la dynamique de tout un échantillon avec une meilleure résolution temporelle que les microscopies point par point telle que le STED. Cependant, le scintillement des centres NV dans les ND de la première technique est difficile à maîtriser et n'est obtenu que pour une fractions minoritaire de ND: les centres NV ne scintillant pas sont alors impossible à résoudre. La deuxième technique repose sur une séparation spectrale à l'aide du champ micro-onde appliqué permettant l'excitation sélective d'une sous-population d'émetteurs, idéalement ramenée à un seul élément. Elle offre un bien meilleur contrôle que la première mais ne concerne que les centres NV^- et pas les centre neutres NV^0 car seuls les centres NV^- ont une résonance de spin électronique. Enfin les deux techniques sont inadaptées au cas de "fortes" concentrations (i.e. en pratique, plus de 2-3 centres par ND): la première à cause du fait qu'il faut qu'un seul émetteur émette à la fois pour avoir un positionnement juste, la deuxième car deux centres NV de même orientation cristalline et très proches dans la maille présenteront des raies ESR confondues (i.e le paramètre de contrainte E étant presque identique entre ces deux centres). La microscopie STED échappe à ces limitations.

⋆ ⋆ ⋆

3 Application des nanodiamants fluorescents à l'étude du trafic dans les dendrites de neurones primaires d'embryons de souris.

Sommaire

3.1 Anomalies de trafic dans les neurones 70

3.2 Internalisation de ND dans les neurones et localisation intracellulaire 71

3.2.1 Internalisation spontanée des ND dans des neurones primaires de souris 71

3.2.2 Recherche de colocalisation des ND avec des compartiments vésiculaires post-Golgi 77

3.3 Étude du trafic de nanodiamants dans les dendrites 82

3.3.1 Microscope pour l'observation des neurones vivants 83

3.3.2 Étude des trajectoires: types de mouvement, vitesse et processivité 86

3.3.3 Le mouvement est dépendent du réseau de microtubules: expérience du Nocodazol 90

3.3.4 Discussion et nouvelles stratégies en cours de développement . 92

Ce chapitre décrit l'une des applications des nanoparticules de diamant à l'imagerie pour la biologie auxquelles j'ai participé pendant ma thèse. Il concerne l'étude du trafic de ND dans des neurones d'embryons de souris maintenus en culture primaires, qui est une activité développée par Michel Simonneau, professeur à l'ENS de Cachan et neurobiologiste au Centre de Psychiatrie et Neuroscience (INSERM U894, Paris) en collaboration avec notre équipe. Nous souhaitons, à moyen terme, utiliser les nanodiamants fluorescents pour corréler des anomalies de trafic dans les dendrites à des variants génétiques rares de gènes impliqués dans des maladies neuropsychiatriques telles que la schizophrénie ou l'autisme.

3.1 Anomalies de trafic dans les neurones

Les techniques les plus couramment utilisées pour sonder le trafic de compartiments d'intérêt sont les marquages à l'aide de protéines fluorescentes telle la GFP (*Green Fluorescent Protein*) fusionnées avec une protéine du compartiment et exprimées après transfection de la cellule, ou bien l'immunomarquage. Les compartiments sont ensuite suivis par microscopie de fluorescence, souvent de type champ large comme l'épifluorescence ou la microscopie par réflexion totale (*Total internal fluorescent microscopy*, TIRF). Le trafic de granule d'ARN a ainsi été étudié par l'équipe de Michel Simonneau qui a montré que la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) impliquée dans le syndrome de l'X fragile servait d'adaptateur entre le moteur moléculaire kynésine KIF3C et les granules d'ARN [37].

Si ces techniques ont l'avantage d'être versatiles, par le vaste choix de marquage possible, elles souffrent néanmoins du photoblanchiment précoce des protéines fluorescentes, limitant grandement la durée d'observation. Pour cette raison, l'utilisation de nanocristaux semiconducteurs (*Quantum Dots*, QDots) est parfois préférée, du fait de leur fort rendement quantique et de leur bonne photostabilité. Ils ont notamment permis l'imagerie du trafic rétrograde dans l'axone de neurones de ganglions spinaux de rats (Fig 3.1), avec une précision permettant la localisation de microtubules individuels [69]. Cette technique n'a cependant encore jamais été utilisée pour des suivis à long terme, signe potentiel d'une toxicité cellulaire trop importante.

Aussi, l'utilisation de nanocristaux de diamant fluorescents s'avère être une alternative intéressante car en plus de leur stabilité d'émission parfaite, la très grande majorité des études cellulaires indiquent qu'ils ne nuisent pas au développement normal de la cellule [9, 70]. Il a été aussi montré que les ND pénètrent dans des lignées de cellules cancéreuses notamment par endocytose [71,72]. Ils ont également servi de marqueurs pour le suivi de la division et la différenciation de cellules souches [73], ainsi que très récemment pour l'étude de l'accrochage de telles cellules dans le cadre de thérapie régénérative des poumons [74]. Enfin, notre équipe en collaboration avec celle de Jean-Rémi Bertrand et Claude Malvy (Laboratoire Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Villejuif) a montré que les ND fluorescents étaient des vecteurs traçables efficaces de siRNA (*Small interférence RNA*) thérapeutique dans un modèle cellulaire du sarcome d'Ewing [72, 75].

Cependant, pour utiliser les ND dans les études de trafic intracellulaire il faut d'abord montrer qu'ils peuvent pénétrer dans des neurones primaires, qui sont, contrairement aux lignées cancéreuses, des cellules post-mitotiques. C'est l'objet des deux prochaines sections, avec des études sur cellules fixées (§ 3.2), puis sur cellules vivantes (§ 3.3).

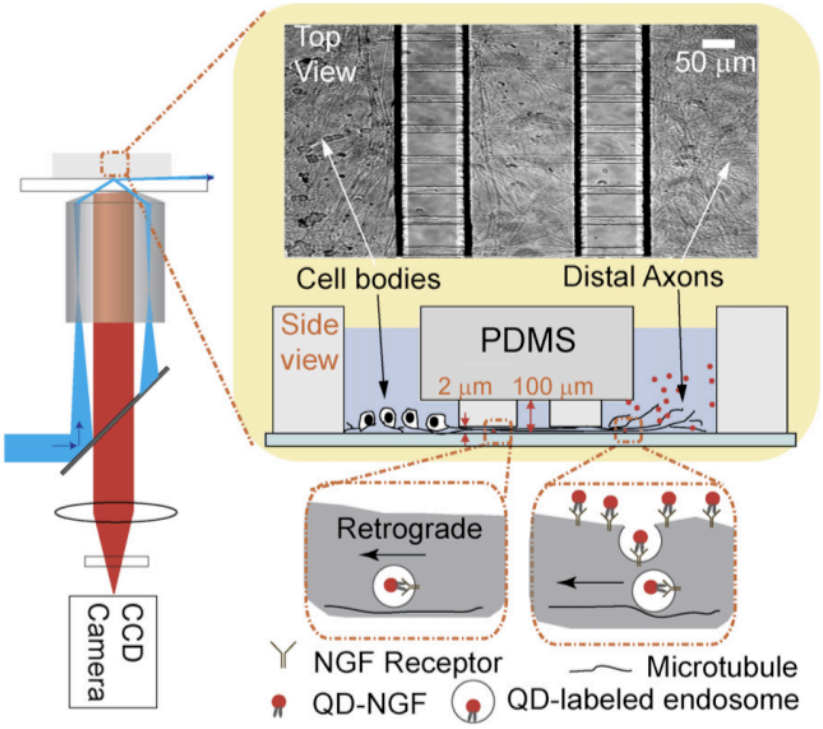

Figure 3.1 : *Schéma extrait de la Ref. [69], montrant le dispositif utilisé pour étudier le trafic rétrograde dans l'axone de neurones de ganglions spinaux de rats, à l'aide de QDots fonctionnalisés avec les protéines de facteurs de croissance du tissu nerveux (Nerve Growth Factor, NGF). L'imagerie des mouvements des vésicules marquées par les complexes QD-NGF est réalisée par microscopie TIRF. Les neurones sont maintenus allongés dans des dispositifs microfluidiques, et les complexes QD-NGF sont internalisés dans la chambre où se trouvent les axones.*

3.2 Internalisation de ND dans les neurones et localisation intracellulaire

3.2.1 Internalisation spontanée des ND dans des neurones primaires de souris

Culture de neurones primaires

Les neurones étudiés sont issus d'embryons de souris sacrifiés 15,5 jour après le début de la gestation. Ils sont mis en culture primaire au Centre de Psychiatrie et Neurosciences (INSERM U894, Paris) par Aude-Marie Lepagnol-Bestel selon des protocoles publiés [76,77]. Les neurones sont tout d'abord dissociés à l'aide d'enzymes (0,25% tripsin et DNase), agités mécaniquement à l'aide d'une pipette Pasteur, puis incubés 30 min à 37°C avec des nanodiamants préalablement stérilisés, à la concentration de 100 ng/ml.

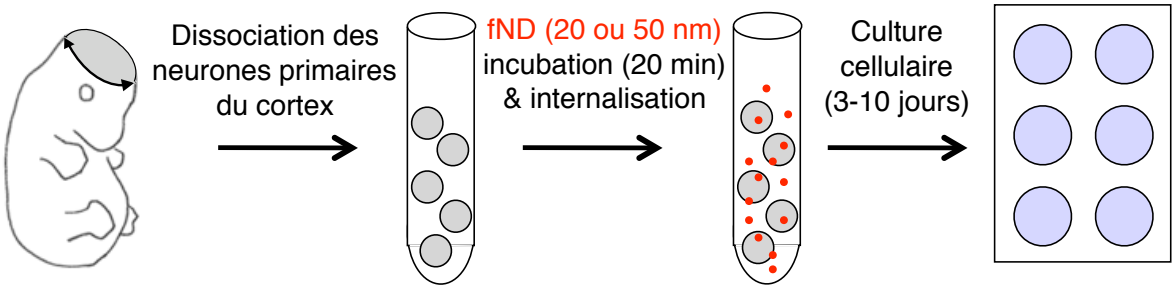

FIGURE 3.2 : *Protocole d'internalisation des nanodiamants dans les neurones. Les neurones corticaux primaires sont extraits d'un embryon de souris, 15,5 jours après accouplement, puis dissociés et incubés 30 min avec des ND fluorescents, avant de commencer la culture sur lamelles de verre placées au fond d'une boîte à 6 puits. Ils sont ensuite fixés après 3 à 10 jours de culture.*

Les neurones sont ensuite étalés sur des lamelles de microscope en verre placées au fond de boîtes de culture de diamètre 35 mm et recouvertes de poly-DL-ornithine. Nous déposons environ 8.10^5 cellules par puits. Le milieu de culture initial est du DMEM (Gibco®, Life Technologies Corp., USA) auquel on ajoute 10% de sérum foetal de boeuf. Ce milieu est remplacé 4 heures après par un mélange de milieu Neurobasal® (Gibco) auquel on ajoute 2 mM de glutamine et 2% de supplément sans sérum B-27®(Gibco). Les neurones sont finalement fixés avec du paraformaldéhyde à 4% et la lamelle de culture est immobilisée sur une lame de microscope rectangulaire avec du verni pour l'observation.

Microscope de fluorescence confocal

Le montage utilisé pour les observations de cellules fixées est un microscope confocal inversé "maison" [78] adapté à la détection de la fluorescence des centres NV du diamant, auquel nous avons ajouté un éclairage à contraste de phase pour une meilleure observation des cellules par transmission en lumière blanche (Fig 3.3). Le montage repose sur un statif inversé commercial (Nikon TE300). Les sources d'excitation sont des lasers à milieu de gain solide et pompé par diode laser (*Diode-pumped solid-state laser*) aux longueurs d'onde de 532, 561 ou 488 nm, puis d'un agrandisseur de faisceau pour couvrir la pupille de l'objectif, et d'un système lame demi-onde - cube polariseur - lame demi-onde pour contrôler la puissance et la polarisation du faisceau d'excitation. Un jeu de miroirs dichroïques permet de réfléchir le faisceau d'excitation et de transmettre la lumière de longueurs d'onde supérieures, notamment celle de la fluorescence des centres NV. Le faisceau d'excitation est focalisé par un objectif apochromatique de grossissement

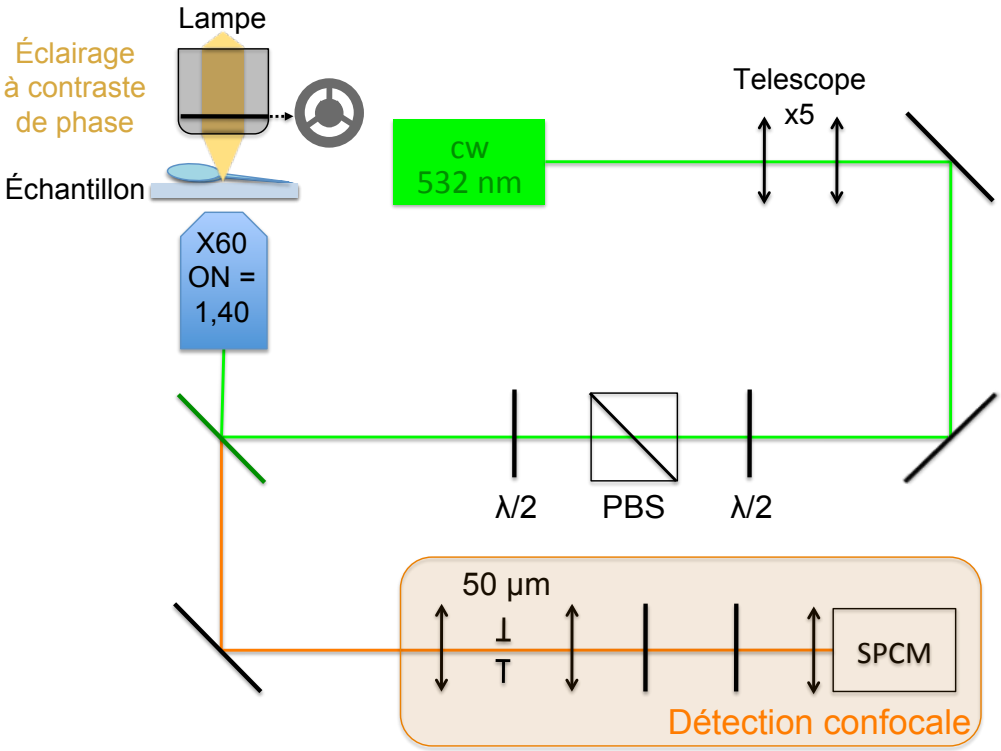

Figure 3.3 : *Schéma du montage Confocal/Contraste de phase. La puissance laser utilisée pour l'observation de ND fluorescents est généralement d'environ 400 µW. On intègre ensuite le signal de fluorescence, détecté à l'aide du compteur de photons uniques (Single photon counting module, SPCM), pendant 20 ms.*

×60, et d'ouverture numérique 1.40. La fluorescence collectée par le même objectif est filtrée spatialement par un diaphragme (trou confocal) de diamètre 50 μm et spectralement par un jeu de filtres passe-haut ou passe bande et enfin détectée par des photodiodes à avalanche en régime de comptage de photon. L'échantillon est posé sur une platine piezoélectrique XYZ d'amplitude de déplacement $100 \times 100 \times 10$ μm qui permet de construire une image point par point de la fluorescence de l'échantillon. L'ensemble est piloté par un programme écrit en Labview. Les images de contraste de phase sont enregistrées sur un capteur CCD installé sur le port de côté.

Localisation 2D des ND dans les cellules

Les premières observations montrent la présence de nanoparticules de diamant colocalisées avec le corps cellulaire, que l'on repère directement sur les images de fluorescence grâce à son auto-fluorescence (Fig. 3.4-B), E)et H)), mais également avec les dendrites, que l'on devine cette fois grâce à la superposition des images de fluorescence et de contraste de phase (Fig. 3.4-C)).

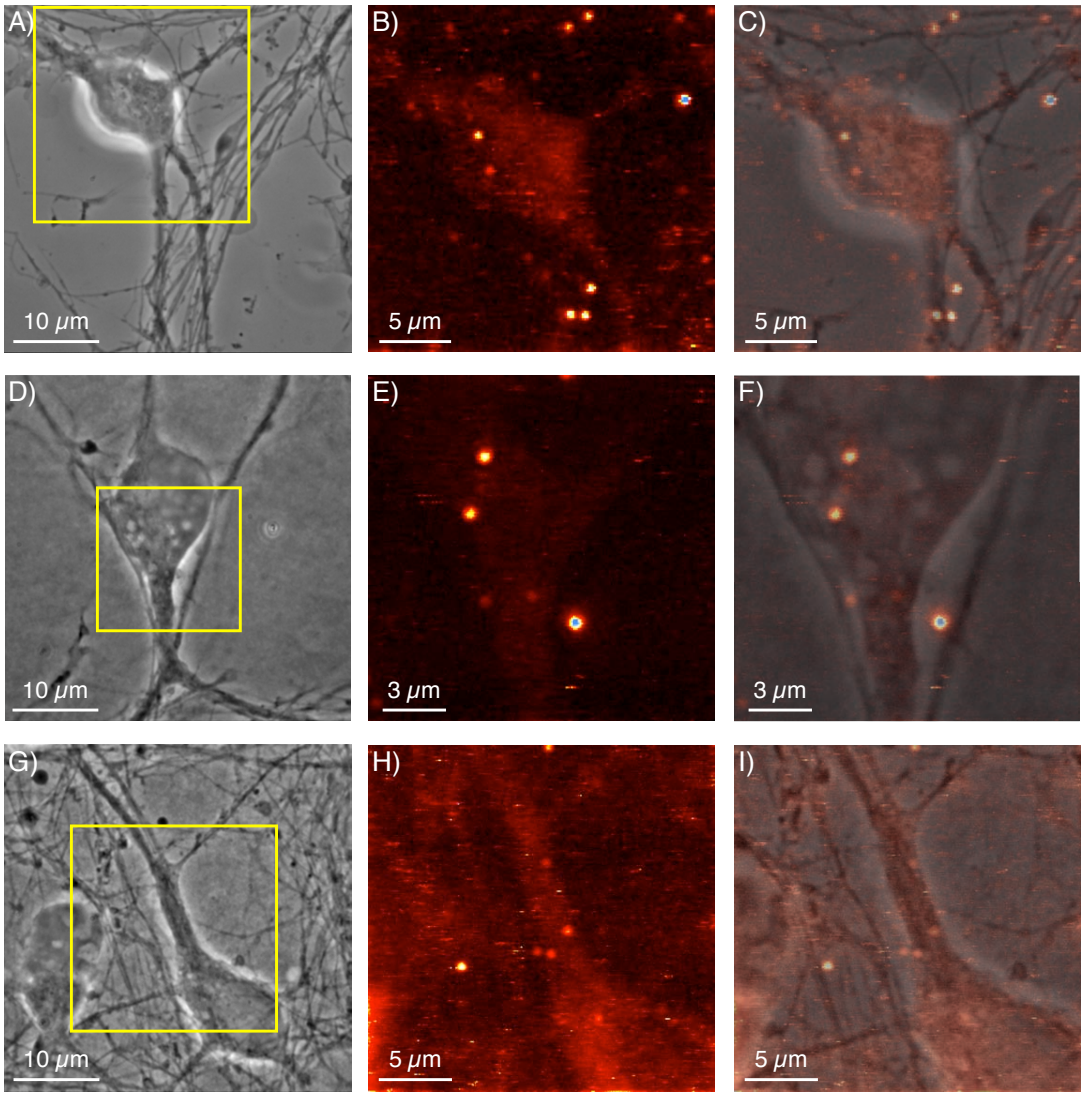

Figure 3.4 : *Les trois cellules présentées dans cette figure ont été fixées 6 jours après le début de la culture. A), D) et H) sont les images de contraste de phase. Les carrés jaunes marquent les champs observés en fluorescence. B), E) et H) sont les images de fluorescence. La puissance d'excitation utilisée est d'environ 400 µW et le temps d'exposition de 20 ms par point. Les spots individuels, brillants, sont les nanoparticules de diamants, dont la fluorescence se distingue du reste par le fait qu'elle ne photoblanchie pas. On note également l'auto-fluorescence qui dessine le corps des cellules et leurs dendrites. C), F) et I) sont les images superposées. La caméra a été préalablement calibrée par rapport à la platine piezo-électrique qui déplace l'échantillon pour les images de fluorescence, et on s'aide de l'auto-fluorescence pour positionner les deux images l'une par rapport à l'autre.*

Avec un seul balayage confocal nous ne pouvons pas affirmer que les ND sont dans la cellule ou à l'extérieur, sur sa membrane. Néanmoins, en réalisant une série d'image de fluorescence de cellules à différentes profondeurs, par pas de 500 nm (Fig. 3.5), on peut estimer la position longitudinale des nanodiamants par rapport à la surface de la

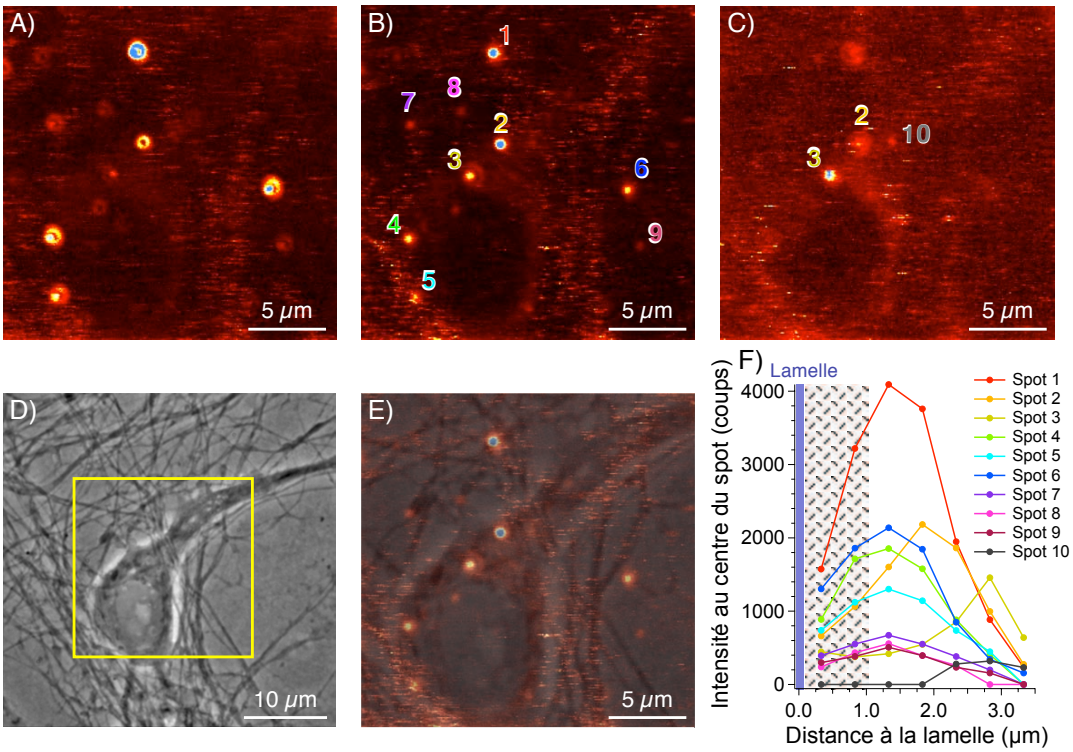

Figure 3.5 : *Localisation de la position longitudinale (axe Z) des spots luminescents par rapport à la lamelle de verre. A), B) et C) 3 images de fluorescence pour 3 positions longitudinales par rapport à la lamelle (respectivement 0,33 1,83 et 3,33 µm). La position de la lamelle est repérée grâce à la réflexion du spot laser à l'interface verre/milieu cellulaire, et on déplace ensuite l'échantillon tous les 0,5 µm grâce à la platine piezoélectrique. D) L'image de contraste de phase. Le carré jaune marque la zone scannée pour les images de fluorescence. E) Superposition de l'image de contraste de phase avec l'image de fluorescence B). F) Mesure de la position du maximum d'intensité au centre des spots de fluorescence par rapport à lamelle. La lamelle est représentée par un rectangle bleu, à l'abscisse 0, la zone hachurée représente la couche de poly-DL-ornithine sur laquelle les neurones sont cultivés. On estime son épaisseur à environ 1 µm. Chaque courbe correspond à un spot. Les spots sont numérotés de 1 à 10 sur les images B) et C).*

lamelle. Les spots 1, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 sont très proches du plan sur lequel reposent les neurones, et peuvent correspondent alors à des ND reposant sur la lamelle [1] ou accrochés à la membrane cellulaire. Les spots 2, 3, et 10 sont en revanche localisés plus haut que la surface de la lamelle, de sorte que ces ND sont très probablement entrés dans la cellule.

1. La présence de ND non superposés avec les cellules, dans le plan de la lamelle, s'explique par le fait qu'après la demi-heure d'incubation, les neurones sont directement placés dans les boîtes de culture sans rinçage, pour ne pas les fragiliser. Il reste donc des diamants en suspension dans le milieu de culture, qui peuvent ensuite se déposer aléatoirement sur l'échantillon.

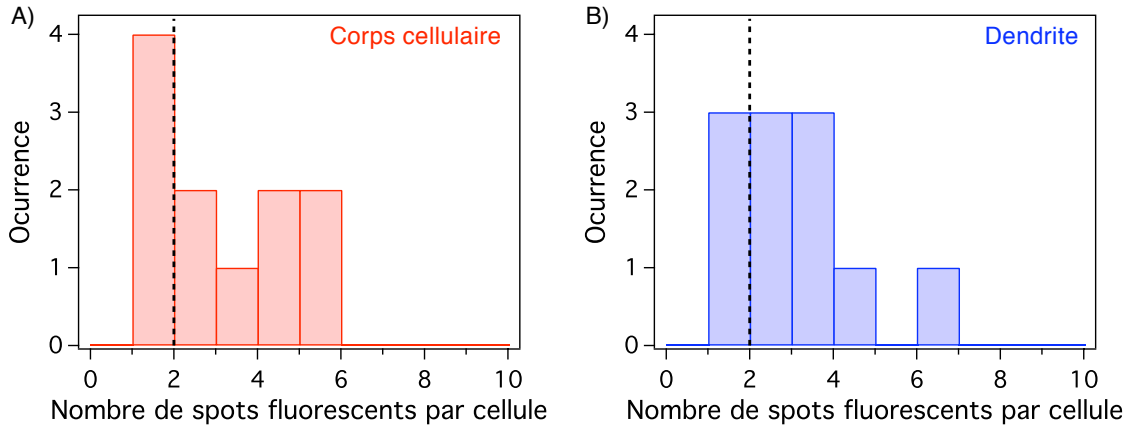

FIGURE 3.6 : *Nombre de nanodiamants fluorescents donnant un spot superposé avec les cellules, localisé dans le corps cellulaire A) et dans les dendrites B). En pointillés noirs sont représentées les médianes des distributions, égales à 2 nanodiamants par cellule. La médiane de la distribution totale de particules observées par cellule, indépendamment du corps cellulaire ou des dendrites est de 3.*

Sur un ensemble de 16 cellules, on compte le nombre de spots fluorescents provenant des centres NV qui colocalisent avec le corps cellulaire ou les dendrites afin d'évaluer le nombre de ND internalisés par cellule (Fig. 3.6). De ces expériences préliminaires, nous comptons 3 diamants internalisés spontanément par cellule lors de la phase d'incubation, dont une fraction localisée dans les dendrites.

Le mécanisme le plus probable d'internalisation est via des vésicules de petite taille (endocytose ou pinocytose) compte tenu du fait que les spots fluorescents observés ont une dimension limitée par diffraction, laissant penser qu'ils correspondent à une seule nanoparticule. Une fois présent dans les vésicules, les ND peuvent être transportés jusque dans les dendrites. Nous verrons ultérieurement que ce transport se fait le long du réseau de microtubules.

Nous avons cherché à identifier plus précisément la nature des vésicules contenant les ND au moment où ils sont fixés. Pour cela nous avons décidé de repérer une protéine du réseau transgolgien car ce dernier est au coeur du tri du trafic des protéines intracellulaires. Aussi, quel que soit le mécanisme d'internalisation (endocytose ou pinocytose), les ND ont une probabilité très élevée de se retrouver dans un compartiment vésiculaire post-Golgi. L'une des protéines les plus abondantes de ces compartiments est la TGN38 (*TransGolgiNetwork* 38). Pour cette raison, et pour s'assurer que les diamants sont effectivement internalisés, nous avons marqué la protéine TGN38 par immunofluorescence avec un complexe anti-TGN38-FITC, puis nous avons étudié la colocalisation entre la fluorescence du marqueur FITC avec celle des nanodiamants.

3.2.2 Recherche de colocalisation des ND avec des compartiments vésiculaires post-Golgi

Montage pour l'étude à deux couleurs

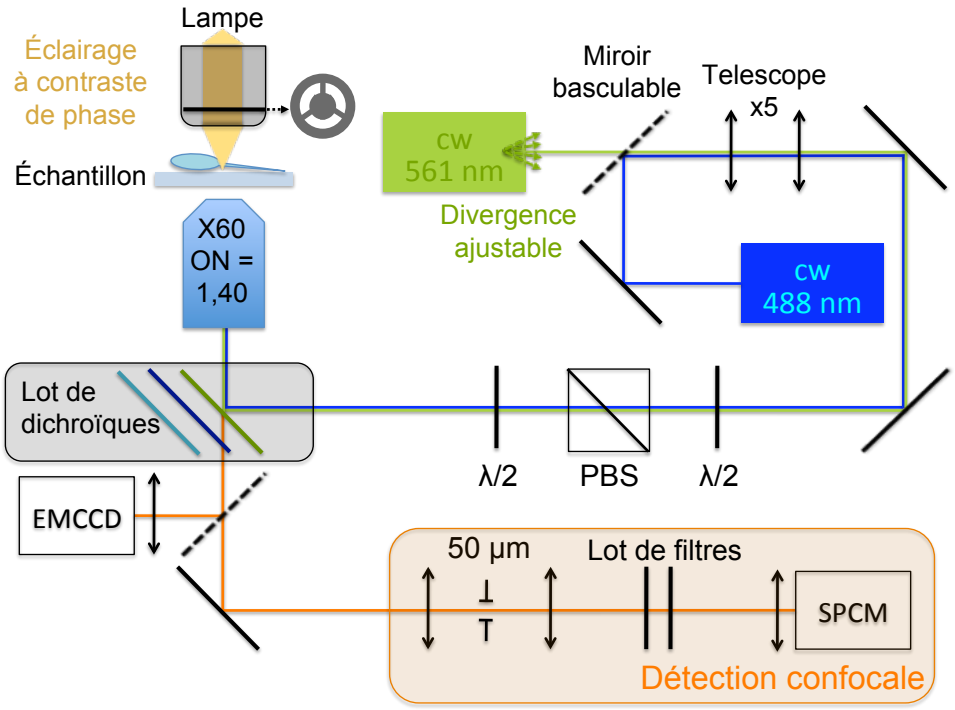

Figure 3.7 : *Configuration du microscope pour l'observation simultanée de la protéine TGN38 abondante dans les vésicules post-Golgi et des ND dans des neurones fixés après quelques jours de culture. Les TGN38 sont ciblés avec un anticorps marqué avec le colorant FITC, excitable à la longueur d'onde 488 nm. Les centres NV sont excités avec un laser émettant à 561 nm. Un miroir basculable permet de choisir le laser d'excitation.*

Pour cette étude, les neurones ont été fixés après 4 jours de culture et la protéine TGN38 a été ciblée par un anticorps attaché au colorant organique FITC émettant à la longueur d'onde de 525 nm, excité dans le bleu. Nous avons utilisé le laser à 488 nm (CW, 50 mW) pour exciter le colorant FITC, ainsi que le laser à la longueur d'onde 561 nm (CW, 100 mW puissance maximale) pour les ND (Fig. 3.7). La détection se fait alors à travers deux lots de filtres et dichroïques. La voie "rouge" (fluorescence des centres NV) passe par un dichroïque qui coupe les longueurs d'onde en dessous de 561 nm (ZT561rdc, Chroma) puis un filtre passe bande de largeur 75 nm, centré sur 697 nm, longueur d'onde proche du maximum d'émission des centres NV (HC 697/75, AHF). La voie "verte" passe au travers d'un dichroïque qui coupe l'excitation bleue et les longueurs d'onde en dessous (z488rdc, Chroma) ainsi qu'un filtre passe-bande centré sur 525 nm et de largeur 50 nm

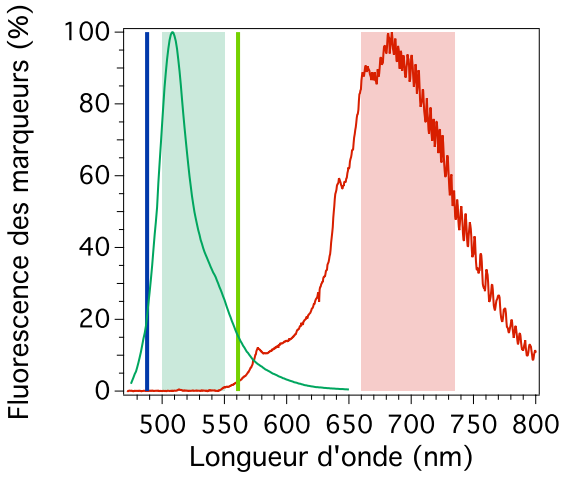

Figure 3.8 : *Séparation spectrale du marqueur FITC (courbe verte), sélectionné par le filtre passe-bande dans le domaine spectral marqué par le bandeau vert clair, et de la fluorescence d'un nanodiamant (courbe rouge) détectée par le filtre dans le domaine spectral marqué par le bandeau rouge clair. On note la présence d'une petite contribution spectrale des centres colorés NV^0 (entre 550 et 650 nm). Les deux lignes bleue et verte sont placées à la longueur d'onde des lasers d'excitation.*

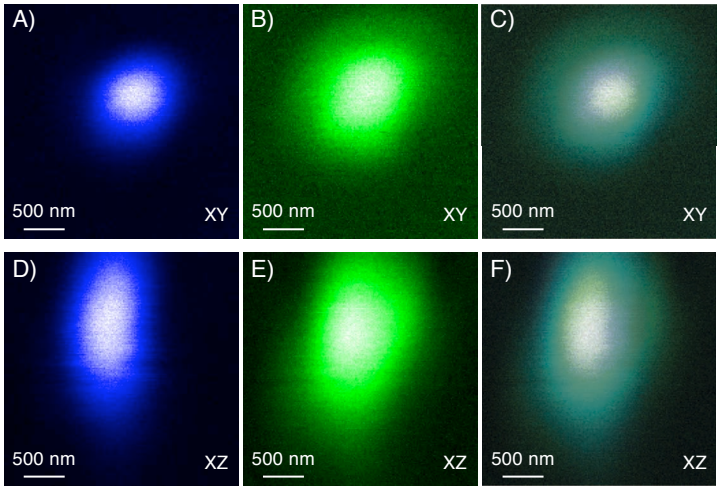

Figure 3.9 : *Superposition des deux spots d'excitation (aux longueurs d'onde 488 et 561 nm). A) Image de la fluorescence dans le plan xy d'un nanodiamant (se trouvant en outre dans une cellule), excité avec le laser émettant à 488 nm. B) Image de la fluorescence du même ND excité avec le laser à 561 nm et C) la superposition des images A) et B). On note ici que le spot du faisceau vert est plus large que celui issu du faisceau bleu (1,28 fois), ce qui est un peu plus élevé que le rapport des longueurs d'onde (1,15 fois). Le fait que les deux faisceaux n'ont pas la même divergence, puisqu'on cherche à compenser le chromatisme de l'objectif, peut expliquer cette petite différence. D) et E) Images dans les plans xz prises pour une excitation avec le laser bleu et le laser vert respectivement. F) superposition de D) et E).*

qui collecte la majeure partie du spectre du FITC (Fig. 3.8). Les filtres dichroïques sont placés dans des cubes qui coulissent le long d'un rail contenu dans le statif du microscope, et que l'on déplace à chaque fois que l'on désire changer de voie d'observation. On adapte également les filtres de détection placés dans une roue à filtre située après le trou confocal.

Afin d'étudier la colocalisation des deux marqueurs, il faut d'abord s'assurer que les spots d'excitation des deux lasers sont eux-même confondus spatialement. Autrement, les deux images provenant des deux voies "rouge" et "verte" seront décalées. Pour cela, on se sert des nanodiamants présents sur les échantillons dont la fluorescence des centres NV peut être excitée à la fois par les lasers bleu et vert, et à l'aide du miroir basculable réglable (Fig. 3.7), on superpose l'image faite à l'aide laser bleu avec celle faite à l'aide du laser vert dans le plan d'observation xy (plan perpendiculaire à l'axe de l'objectif) (Fig. 3.9-A), B) et C)). Le coupleur du laser vert est muni d'une lentille amovible permettant de changer la divergence du faisceau en sortie. Ainsi, on superpose également les deux points de focalisation des lasers dans l'axe longitudinal z (axe de l'objectif) (Fig. 3.9-D), E) et F)). Avec ce réglage du microscope, nous pouvons commencer l'étude de la colocalisation.

Colocalisation dans le plan xy

L'immunomarquage de TGN38 par FITC donne des images d'aspect ponctiforme (figure 3.10-A)), les spots correspondant aux compartiments vésiculaires post-Golgi riches en TGN38. Le fond homogène, moins intense, correspond à l'auto-fluorescence cellulaire, observable malgré la faible puissance d'excitation laser bleue utilisée (700 nW). Pour l'observation des nanodiamants, on utilise une puissance plus importante (400 μW) et on réalise plusieurs balayages complets consécutifs pour être sûr de n'observer que la fluorescence des centres NV, seul fluorophore ne blanchissant pas.

La position des ND est indiquée par les flèches bleues dans la figure 3.10-B)). On combine les images FITC et ND à l'aide du logiciel ImageJ, en appliquant en premier lieu un procédé pour éliminer le fond d'auto-fluorescence (*Substract background*), puis en utilisant le *plugin* "Colocalization" qui somme les deux canaux vert et rouge pour reconstituer une image RGB faisant apparaître les objets colocalisés en jaune (Fig. 3.10-D)). On note sur cette image une particule colocalisée (flèche jaune) et deux partiellement colocalisées (flèches magenta) pour un total de 10 particules.

On étudie de la même manière la colocalisation ND/FITC pour plusieurs autres cellules, et on s'aperçoit assez vite que la majeure partie des ND et des spots TGN38-FITC ne sont pas colocalisés (Fig. 3.11-H)). Les vésicules post-Golgi étant pratiquement incontournables pour tout corps étranger internalisé, nos observations indiqueraient que

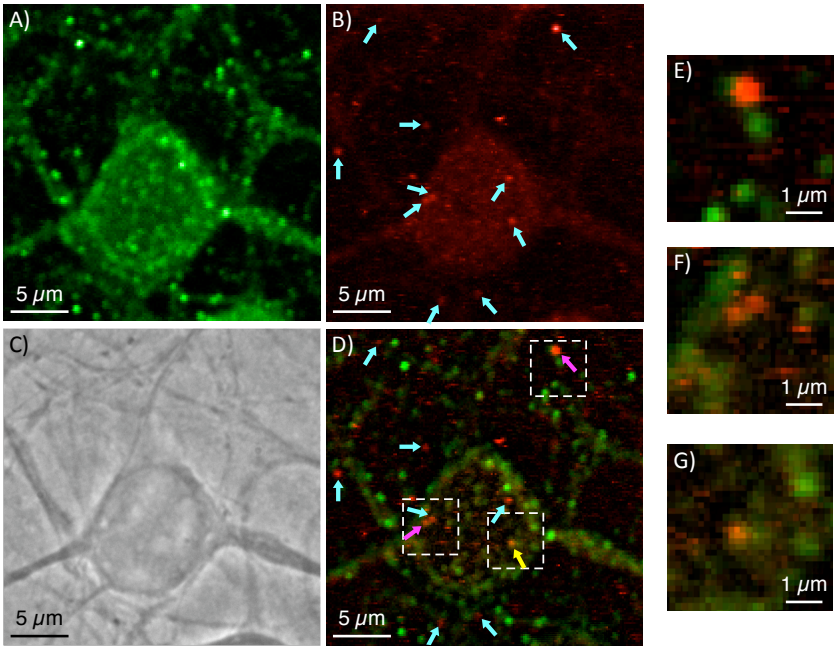

Figure 3.10 : *Exemple de l'analyse de la colocalisation FND/TGN38-FITC. Images de fluorescence du complexe TGN38-FITC en A) et des FND en B). On souligne la position des FND par les flèches bleues. C) Image de contraste de phase. D) Superposition des images A) et B) après traitement du fond d'auto-fluorescence. Les spots colocalisés apparaissent en jaune. On note par des flèches jaunes les particules colocalisées et magenta celles partiellement colocalisées. Les FND non-colocalisés sont indiqués en bleu. E) F) et G) sont les zooms des trois carrés blancs de l'image D).*

nous avons observé les neurones à un stade trop précoce pour trouver les ND en assez grand nombre dans les vésicules post-Golgi qui jouent un rôle important dans le transport intra-dendritique. Nous n'avons pas eu l'occasion de vérifier cette interprétation.

Colocalisation dans la profondeur z

Les images précédentes montrent les fluorescences des voies rouges et vertes dans le plan xy. Étant donnée la profondeur de champ d'observation de notre microscope confocal (1,6 μm, largeur à mi-hauteur du spot d'excitation dans l'axe z mesurée sur les figures 3.9-D-F)) et l'épaisseur des dendrites (de quelques microns à quelques centaines de nanomètres selon la distance au corps cellulaire), il est aussi nécessaire de s'assurer d'une colocalisation dans la direction de propagation z du faisceau laser d'excitation. Pour cela, j'ai ajouté au programme Labview qui contrôle les déplacements de la platine piezo-électrique une possibilité de balayage dans le plan xz.

On représente 3 de ces balayages xz sur la figure 3.12. Le sens du balayage le long de l'axe z est tel que la lamelle se trouve en haut de l'image, comme l'indique le bandeau

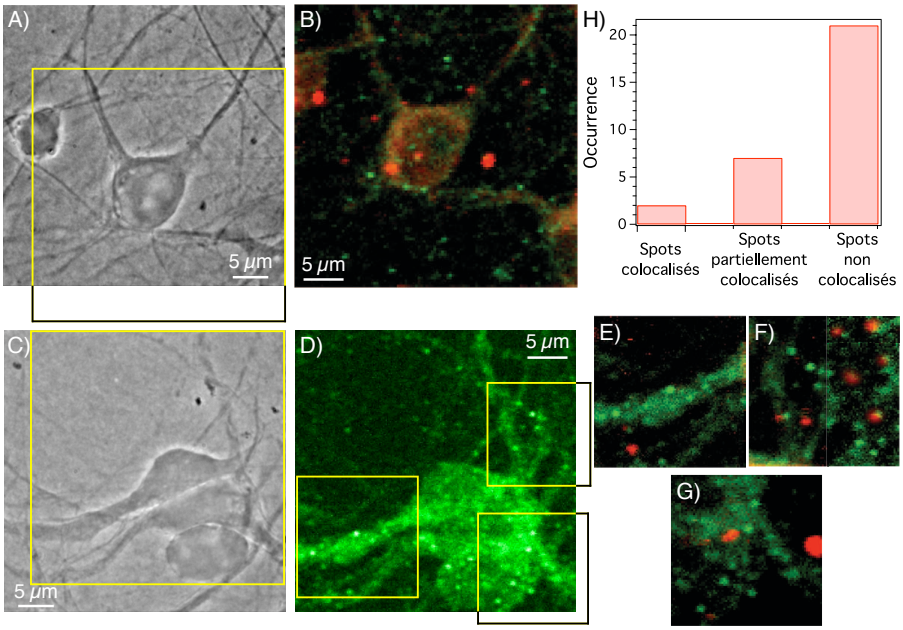

FIGURE 3.11 : *Analyse globale de la colocalisation FND/TGN38-FITC. A) et B) Images de contraste de phase de deux autres cellules que celle de la Fig. 3.10. B), E), F) et G) Superpositions des images de fluorescence des voies rouges et verte. D) Image de fluorescence FITC uniquement pour la cellule que l'on voit en C). H) Histogramme récapitulatif de la colocalisation des spots de fluorescence des nanodiamants avec la protéine TGN38. Une grande partie des spots ne sont pas colocalisés, mais nous avons pu néanmoins observer quelques évènements montrant le présence de ND dans des vésicules post-Golgi riches en TGN38.*

bleu au-dessus des scan xz. Le spot rouge de la figure 3.12-D) se trouve parfaitement dans le même plan que la fluorescence de la voie verte, et la présence de jaune sur l'image superposée montre une colocalisation partielle. Le spot rouge sur la figure 3.12-B) est aussi dans le même plan que la fluorescence de la voie verte mais il est à côté de la dendrite dans le plan xy: le ND correspondant pourrait être sur la membrane. Le dernier spot rouge (Fig. 3.12-E)) se trouve cette fois un peu en-dessous de la fluorescence de la cellule, c'est-à-dire plus loin de la lamelle, et peut donc être également posé sur la membrane cellulaire .

Nous avons montré dans cette section la présence de quelques ND dans des vésicules post-Golgi des neurones, mais pas de manière systématique. Pour toutes les non-colocalisations observées, il est difficile de savoir si les particules se trouvent à l'intérieur des neurones. Néanmoins, les rares évènements colocalisés suggèrent que les ND peuvent être internalisés pour se retrouver dans des vésicules participant au trafic entre le corps cellulaire et les extrémités des dendrites. Nous avons alors décidé d'étudier ce trafic en suivant la fluorescence des ND. Ce trafic implique de nombreuses molécules, en particulier

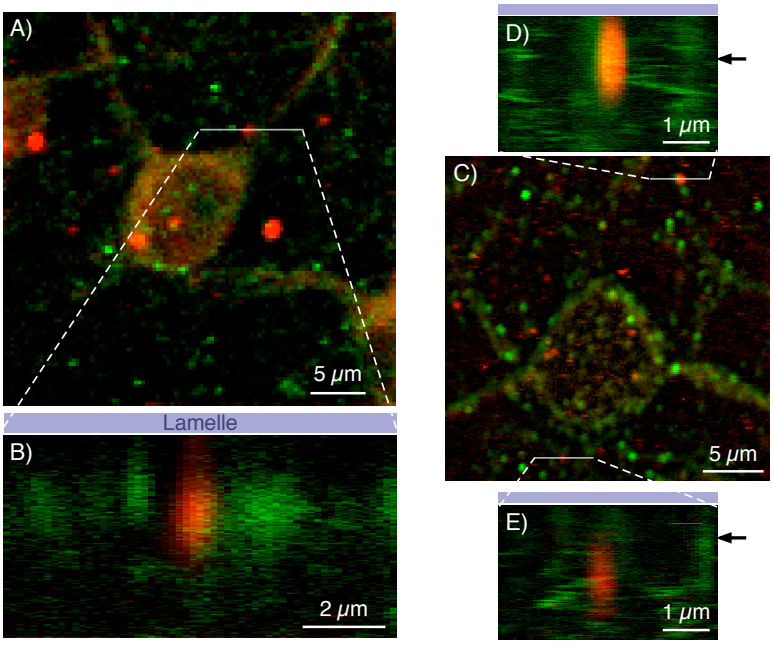

Figure 3.12 : *Analyse de la colocalisation dans l'axe Z. A) et B) Superposition des images de fluorescence rouge et verte dans le plan XY. Les lignes blanches correspondent aux coupes XZ représentées en B), D) et E). Les deux flèches noires des images D) et E) représentent le plan médian des dendrites.*

les moteurs moléculaires que sont la kinésine et la dynéine (trafic sur les microtubules) et les protéines associées. Il est très probable qu'il soit impacté par une modification génétique même mineure (cf. §3.1).

Aussi, l'analyse des trajectoires des ND, qui revient à étudier les trafics des vésicules qui les contiennent en terme de vitesse, de processivité des moteurs qui fonctionnent en mode *Stop and Go*, de durée des *Stop*, ... pourrait permettre de révéler une anomalie fonctionnelle associée à un variant génétique. C'est l'objet de la section suivante.

3.3 Étude du trafic de nanodiamants dans les dendrites

Afin de regarder la dynamique d'objets fluorescents en mouvement, la microscopie confocale, qui nécessite de scanner point par point l'objet ou la source pour obtenir une image, et qui de ce fait est une technique assez lente, n'est généralement pas adaptée. Il est préférable d'utiliser des techniques de microscopie de fluorescence champ large, bien plus rapides, où les temps d'acquisition pour une image sont de l'ordre de la dizaine ou la centaine de millisecondes.

3.3.1 Microscope pour l'observation des neurones vivants

Nous avons choisi de mettre en place un système de microscopie de fluorescence champ large avec une excitation laser en mode de réflexion total interne (TIRF). Le faisceau laser est d'abord focalisé dans le plan focal objet de l'objectif de microscope, comme dans le mode d'éclairage en "épifluorescence", puis il est décalé latéralement de l'axe de l'objectif pour arriver à l'interface verre-échantillon avec un angle d'incidence supérieur à celui de la réflexion totale, de sorte que la fluorescence de l'échantillon n'est excitée que par une onde évanescente, sur une profondeur de quelques centaines de nanomètres. Nous évitons ainsi d'exciter des zones de l'échantillon qui ne nous intéressent pas, puisque nous concentrons notre étude sur le trafic dendritique et que les dendrites adhèrent sur la lamelle et ont une épaisseur inférieure à 1 μm. Le mode TIRF procure donc un meilleur rapport signal sur fond que l'épifluorescence.

Description du microscope TIRF développé pour l'observation de neurones vivants

Le montage a été mis en place par Xuan-Loc Le, post-doctorant au sein de notre équipe en 2011 (Fig. 3.13-A)). Il est constitué d'un ancien statif de microscope inversé Zeiss (Axiovert 30) et d'un objectif de grande ouverture numérique (x100, ON 1.49, Olympus) acheté spécialement pour ce montage TIRF. Les lasers d'excitation sont partagés avec le montage confocal décrit dans la section précédente et nous utilisons des filtres similaires. La détection de la fluorescence est faite à l'aide d'un capteur à gain de multiplication d'électrons EMCCD refroidi (iXon DU885, Andor Tech.) ayant une efficacité quantique de 65%, inférieure à celle de modèles avec capteurs illuminés aussi par l'arrière (*back-illuminated*), mais disposant d'une cadence maximale de lecture de 35 MHz supérieure à celle des capteurs *back-illuminated*, ainsi que d'une bien meilleure résistance au vieillissement en présence de gain.

Les neurones sont maintenus en vie durant l'observation grâce à une chambre d'incubation placée sur la platine du microscope. La chambre maintient la température de l'échantillon à 37°C et de l'air humidifié et enrichi en CO_2 à 5% y est apporté. L'objectif est également stabilisé en température à 37°C à l'aide d'une bague chauffante qui l'entoure, afin d'éviter de grandes variations de température proche de l'échantillon.

Avant de commencer les observations cellulaires, nous avons testé la résolution de pointé du montage (liée à sa stabilité mécanique en filmant des ND, préalablement immobilisés par dépôt à la tournette sur une lamelle de verre. La figure 3.13-B) montre les positions du centre du spot fluorescent formé par le ND après un ajustement par une

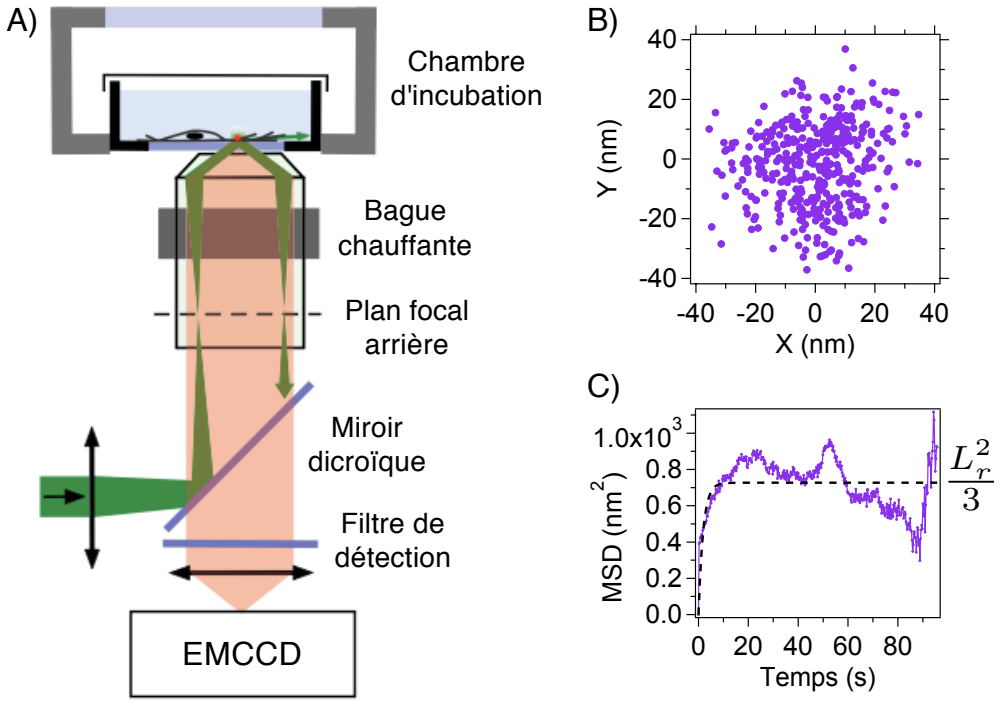

Figure 3.13 : *Schéma du montage et évaluation de sa stabilité. A) Montage TIRF pour l'observation de cellules vivantes. B) "Trajectoire" d'un FND fixe, déposé sur une lame de verre. C) Déplacement quadratique moyen (MSD) de la trajectoire B). En pointillés noirs est représentée la fonction d'ajustement de la MSD pour un mouvement confiné, de forme exponentielle tendant vers $L_r^2/3$, où L_r est le diamètre de la région explorée.*

gaussienne, pour une période d'observation de 120 s à la cadence de 200 ms de durée d'intégration par image. On observe que le ND est confiné spatialement autour de l'origine, avec un écart quadratique moyen de 19 nm (soit une largeur à mi-hauteur FWHM de 45 nm). On peut aussi calculer le déplacement quadratique moyen (*Mean Square Displacement*) de cette "trajectoire".

$$\mathrm{MSD}(t) = \langle X^2(t) + Y^2(t) \rangle \tag{3.1}$$

Soit, pour une trajectoire contenant N images, séparées par une période δt:

$$\mathrm{MSD}(n\delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=0}^{N-n-1} \left[(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2 \right] \tag{3.2}$$

où les $(x_i; y_i)$ sont les coordonnées des points constituant la trajectoire.

On obtient ainsi la fonction MSD du ND "fixe", représenté sur la figure 3.13-C). Sa forme concave est caractéristique d'un mouvement contraint et l'asymptote est donnée par $L_r^2/3$ [79], où L_r est le diamètre de la région dans laquelle est confiné le mouvement

apparent du ND. On mesure 46 nm, ce qui est en accord avec la mesure précédente. Ce paramètre L_r nous permettra par la suite de discriminer les vrais mouvements des fluctuations liées à l'incertitude de localisation.

Préparations cellulaires et premières observations

Les cultures de neurones primaires ont été réalisées par Aude-Marie Lepagnol-Bestel, de la même manière que les cellules de l'étude précédente, avant fixation. Les cellules sont généralement observées entre 7 et 10 jours après le début de la culture. La chambre d'incubation permet de garder les neurones en vie pendant un ou deux jours. En revanche on observe des premiers signes de dégradation (forte augmentation de l'autofluorescence) des cellules qui sont dans le champ d'observation après une trentaine de minutes d'illumination continue (à une intensité d'environ 20 kW/cm^2).

La figure 3.14 montre un exemple de mouvement de nanodiamants observés dans un neurone vivant. Celui que nous avons suivi se déplace dans une dendrite large (3.14 -B)): sa trajectoire est superposée en rouge. Nous l'étudions dans la section suivante. Pour ce type d'observations, la stabilité parfaite de la fluorescence des centres NV est un atout majeur: on peut suivre les particules aussi longtemps qu'elles se trouvent dans le champ d'observation.

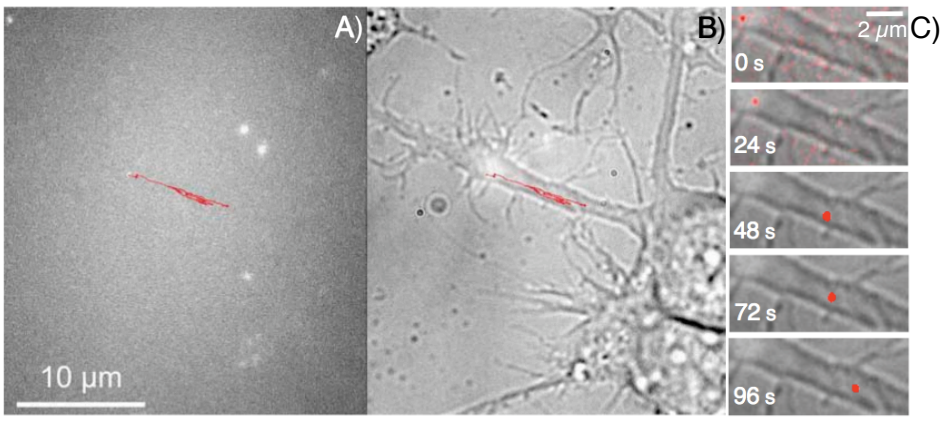

Figure 3.14 : *Observation après 7 jours de culture. La séquence d'images acquises dure au total 120 s et l'intervalle de temps séparant deux images consécutives est de 240 ms. A) et B) Image de fluorescence et de contraste de phase du même champ d'observation. En rouge est représentée la trajectoire de la particule d'intérêt. C) Superposition des images de fluorescence et de contraste à différents moments de la trajectoire.*

3.3.2 Étude des trajectoires: types de mouvement, vitesse et processivité

La construction de la trajectoire d'un ND consiste à localiser image par image la position du spot avec précision. Nous avons utilisé pour cela le *plugin* "Spot tracker" du logiciel ImageJ, développé par Daniel Sage [80]. Ce programme est dédié à l'extraction de trajectoires de molécules uniques dans un environnement très bruité. Il s'exécute en 3 étapes: une première étape de correction des dérives, qui recale toutes les images par rapport au fond d'autofluorescence, ou toute autre structure considérée comme fixe, une deuxième étape d'amélioration du rapport signal sur bruit par l'application d'un filtre de type "chapeau mexicain" et une dernière étape de suivi de la particule, tenant compte du fait qu'elle peut disparaitre sur quelques images, mais que d'une image à l'autre elle ne peut se déplacer de plus de quelques pixels.

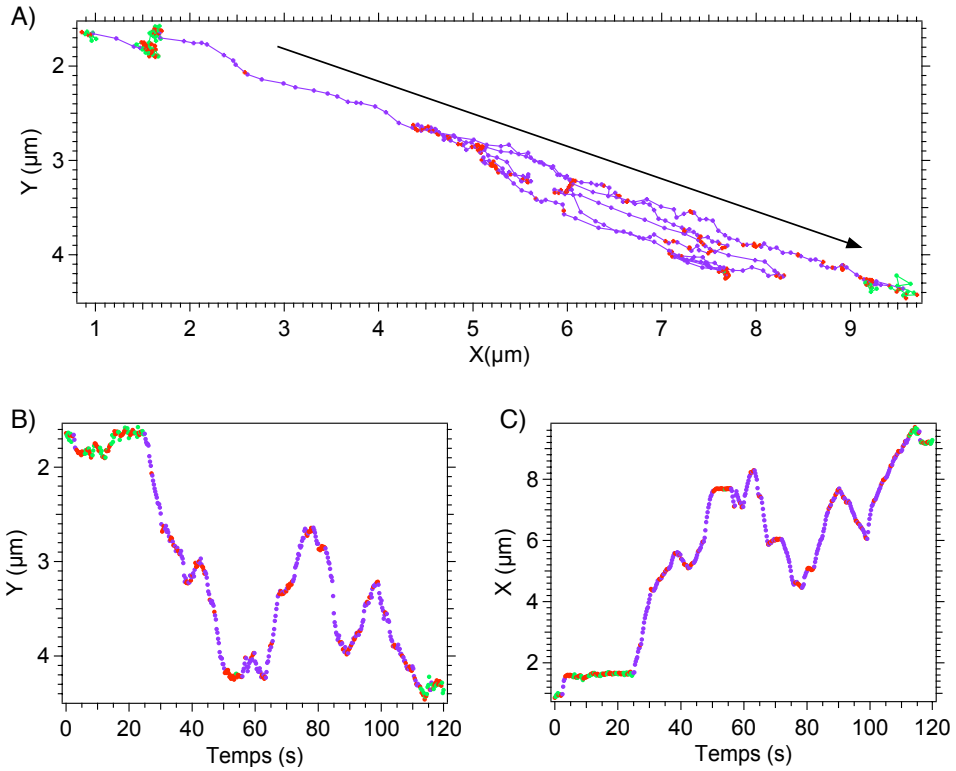

Figure 3.15 : *A) Trajectoire, dans le plan xy, extraite du mouvement de ND présenté sur la fig. 3.14. B) et C) $x(t)$ et $y(t)$. Le code couleur représente la catégorie de phase de mouvement telle que définie dans le texte principal. Les phases de mouvement dirigé sont en violet, les stops en rouge et les points verts correspondent aux cas de mouvements contraints non dirigés. La flèche noire sur A) représente l'axe de projection des vecteurs vitesses, afin de définir un sens de déplacement en lien avec les différents types de moteurs moléculaires: elle est dirigée vers le corps cellulaire.*

Cet algorithme donne de très bons résultats dans l'ensemble, mais nous avons cependant remarqué une "hésitation" de la position du centre du spot entre quatre pixels, pour les particules fixes. Afin d'y remédier, nous avons écrit une procédure avec le logiciel IgorPro, qui réalise un ajustement Gaussien 2D sur chaque image en prenant comme conditions initiales les cordonnées $(x; y)$ données par "Spot tracker", aboutissant ainsi à une localisation du centre de la gaussienne sous la taille d'un pixel. L'application successive du *plugin* "Spot Tracker" et de notre routine Igor permet d'extraire les coordonnées x et y de la trajectoire (Fig. 3.15-A)), où chaque point représente pour chaque image le centre du spot de fluorescence suivi, avec une précision de localisation de L_r (45 nm).

Décomposition en différentes phases de mouvement. Pour la trajectoire de la fig. 3.14 nous pouvons distinguer, avec l'aide du calcul de la MSD, trois catégories de phase de mouvement en suivant l'analyse de la Ref. [81]:

- les **stops** (indiqués en rouge) qui correspondent au cas où la particule est immobile, au sens où la distance parcourue jusqu'au point suivant est inférieure à la limite de résolution L_r;
- les **mouvements dirigés** (en violet) qui sont les phases de vrais mouvements du cargo le long du cytosquelette;
- les **mouvements contraints** spatialement (en vert), comme l'indique le calcul de leur MSD, qui sont très probablement des phases pendant lesquelles la vésicule qui transporte le ND n'est plus connecté au cytosquelette via le moteur moléculaire. Cette catégorie est peu fréquente: on compte 6 phases de mouvements non-dirigés, de durée moyenne 6,5 s.

Ce sont principalement les phases dirigées du mouvement qui nous intéressent. Elles correspondent très vraisemblablement au transport de la vésicule qui contient le ND par un moteur moléculaire kinésine ou dynéine, le long des microtubules. De plus, les parties distales des dendrites possèdent une polarité uniforme, contrairement aux parties proximales. Un changement de direction comme on l'observe pour la particule étudiée est donc le signe d'un changement de moteur. La kinésine emmène la particule vers l'extrémité des dendrites alors que la dynéine la ramène vers le corps cellulaire.On projette alors tous les vecteurs vitesses sur l'axe principe de la trajectoire (également l'axe de la dendrite), marqué par une flèche noire (Fig. 3.15-A)) afin de discriminer les vitesses positives correspondant à un mouvement de la particule vers le corps cellulaire, associées alors à la dynéine, des vitesses négatives, associées à la kinésine.

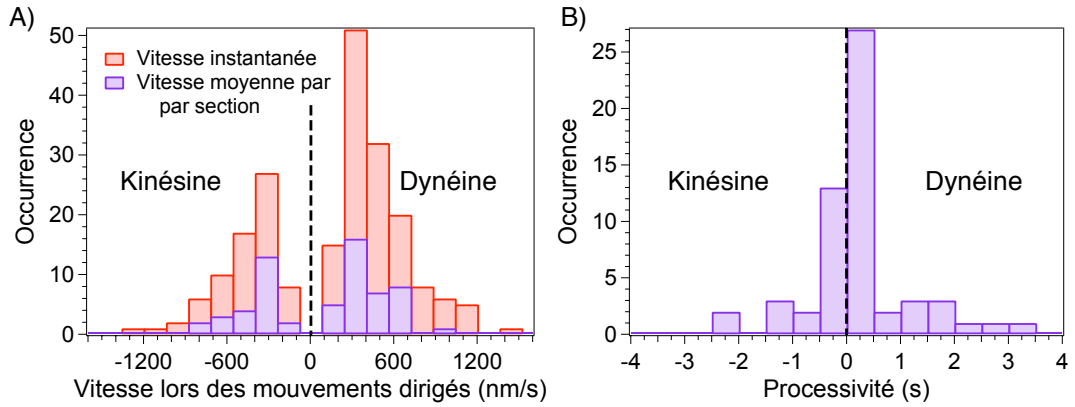

Figure 3.16 : *A) Histogramme des vitesses lors des mouvements dirigés uniquement. En rouge est représenté l'ensemble des vitesses instantannées et en violet les vitesses moyennes par section, avec leurs signes. B) Histogramme des processivités. On associe les mouvements antérogrades (signe négatif pour cette trajectoire) à la kinésine et les mouvements rétrograde (signe positif) à la dynéine. On note que les caractéristiques de vitesse et processivité sont très similaires pour les deux sens de mouvement.*

L'histogramme de la figure 3.16-A) représente les valeurs des vitesses instantanées, avec leur signe, projetées sur l'axe de la trajectoire. On ne considère que les vitesses associées à un mouvement dirigé (points violets), les autres vitesses sont exclues de ce graphique. On représente également les **vitesses moyennes** par "section", à savoir toute période de mouvement dirigé séparée par deux stop (points rouges), ou bien par un changement pour un mouvement non-dirigé (point vert), ou bien un changement de direction (changement de signe du vecteur vitesse).

La figure 3.16-B) montre les **processivités** des mouvements dirigés, c'est-à-dire les durées (en seconde) des "sections". Les valeurs moyennes de vitesse par section et de processivité pour cette trajectoire sont de 413 ± 33 nm/s et 0,67 ± 0,13 s pour la kinésine, ainsi que 426 ± 24 nm/s et 0,85 ± 0,13 s pour la dynéine.

Variété de trajectoires. De cette série de mesure, on extrait 3 autres trajectoires de ND, que l'on a représentées sur la figure 3.17. L'une, très longue (500 s), appelée trajectoire n° 3, est légèrement courbe et montre une statistique de vitesse plus rapide et de très nombreux aller-retour, très proches dans l'espace. Les deux autres trajectoires montrent une seule "piste". La trajectoire n° 4, bien qu'elle soit longue (500 s), présentent peu de mouvements dirigés et a de très longues périodes de mouvements contraints, où la particule ne suit plus la "piste".

Pour chaque trajectoire étudiée, les deux moteurs (kinésine et dynéine) présentent des caractéristiques très similaires, nous ne représenterons donc que les modules des vitesses

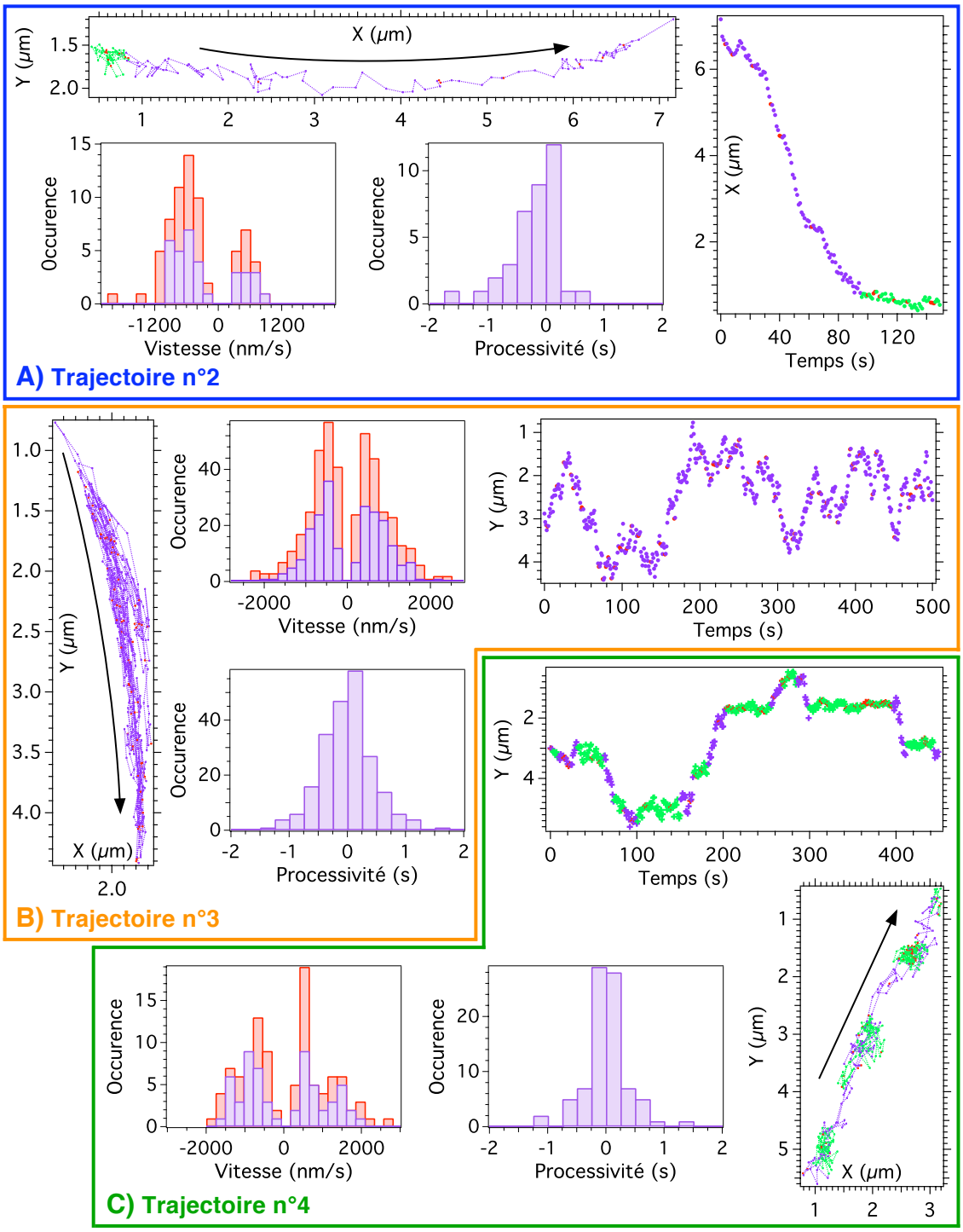

Figure 3.17 : *Représentation des 3 autres ND en mouvement. Pour chacun, on trace la trajectoire (xy), l'évolution de la position sur un axe en fonction du temps ($x(t)$et $y(t)$), les histogrammes des vitesses et des processivités (les codes couleurs sont inchangés).*

et processivité dans le tableau récapitulatif de la figure 3.1. Ces valeurs sont cohérentes avec des mesures précédentes de transport dans les dendrites [82, 83].

	Trajectoire n°1	Trajectoire n°2	Trajectoire n°3	Trajectoire n°4	Moyenne
Vitesse par section (nm/s)	421 ± 19	614 ± 31	744 ± 25	930 ± 48	**712 ± 19**
Processivité (s)	0,78 ± 0,09	0,45 ± 0,05	0,46 ± 0,02	0,38 ± 0,03	**0,49 ± 0,02**

Table 3.1 : *Récapitulatif des vitesses et processivités moyennes par section observées pour chacune des 4 trajectoires représentées sur les figures 3.15 et 3.17.*

3.3.3 Le mouvement est dépendent du réseau de microtubules: expérience du Nocodazol

Le fait que les nanodiamants observés se déplacent de manière dirigée, et que des vitesses moyennes par section mesurées sont compatibles avec des vitesses typiques de moteurs moléculaires laisse à penser que ces diamants se déplacent grâce au réseau de microtubules.

Pour tester le rôle du réseau de microtubules, nous avons observé 3 particules de diamant en mouvement dans un neurone, puis nous avons injecté 3 doses successives de Nocodazole dans la culture, et nous avons suivi l'évolution des trois mouvements. Le Nocodazole dépolymérise les microtubules en se fixant sur la β-tubuline, détruisant ainsi petit à petit le réseau de microtubules. Si les 3 particules présentent au départ des mouvements non contraints, comme l'indique les formes linéaires ou légèrement concaves des trois fonctions MSD de la figure 3.18-A), l'introduction de la première dose de Nocodazole (2 μM et 1 min d'incubation) fait apparaître 3 mouvements confinés (Fig. 3.18-B)). En effet, les 3 fonctions MSD sont maintenant convexes, de la forme exponentielle caractéristique, et leurs valeurs maximales indiquant la taille de la zone explorée ont toutes les trois chutées. L'application de deux autres doses (3 et 3,3 μM) confirme cette tendance, jusqu'à atteindre l'immobilité en figure 3.18-C).

Cette expérience nous confirme que les mouvements dirigés de nanoparticules de diamant dans les neurones sont bien dépendants du réseau de microtubule. Les diamants se trouvent donc très probablement à l'intérieur de vésicules qui participent au trafic dendritique, entrainées soit par la kinésine soit par la dynéine. Chaque changement de sens indique un changement de moteur, et/ou un changement de rail comme on peut l'observer sur la première trajectoire. En effet, les microtubules, de diamètre environ

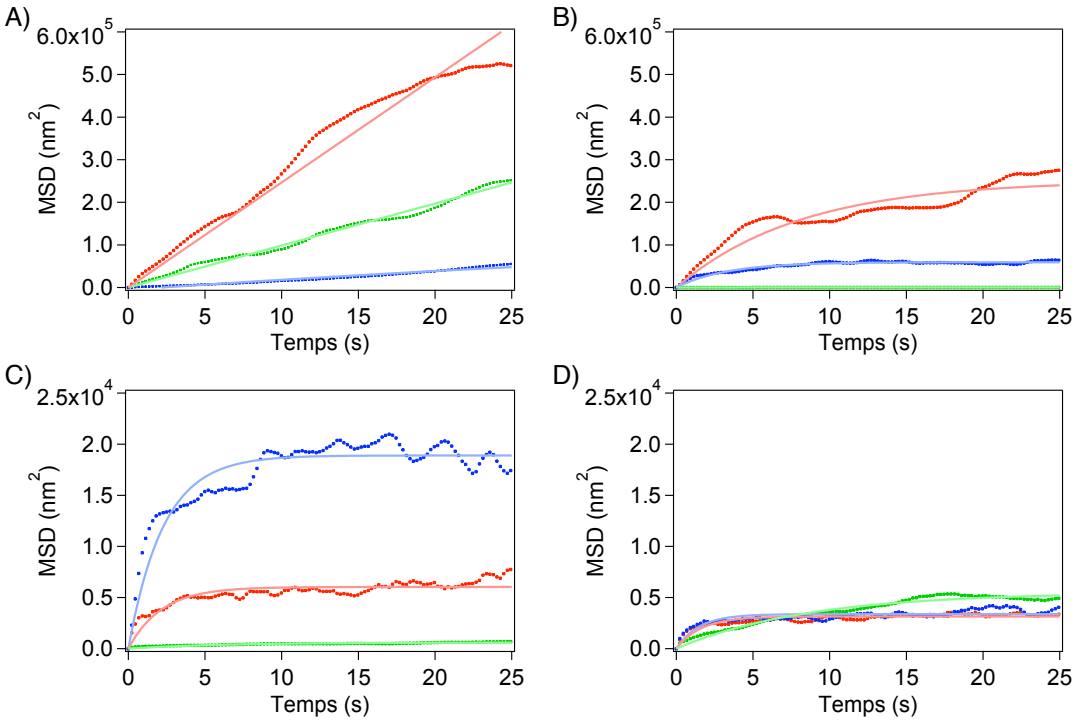

Figure 3.18 : *Évolution des écarts quadratiques moyens (*MSD*) de 3 particules de diamant dans un neurone vivant (7 jours en culture), sous l'effet du Nocodazole. A)* MSD *avant injection de Nocodazol. Les particules montrent toutes un mouvement brownien ou dirigé, par la forme linéaire ou légèrement concave (courbe bleu) de la MSD. B) Injection de la première dose de Nocadazol (2 µM pendant 1 min). L'échelle est gardée identique à la figure A). On note que toutes les MSD ont désormais une forme concave, indiquant un mouvement confiné, et les valeurs maximales à $t = 25$ s ont respectivement diminuées. C) Injection de la deuxième dose (3 µM pendant 1 min). Les trois MSD ont toujours un mouvement contraint pour chaque particule ainsi qu'une diminution de la zone explorée en 25 s (l'échelle de l'axe vertical est divisée par 20). D) Injection de la troisième dose (3,3 µM pendant 1 min). Les particules sont presque immobiles. Les valeurs maximales des courbes rouge et bleue ont à nouveau diminué. On note cependant une augmentation de cette valeur pour la courbe verte, par rapport à la figure C). Il est possible que la destruction complète du microtubule guidant cette particule ait conduit au détachement de la vesicule, qui est alors capable d'explorer une zone plus large.*

25 nm, sont espacées d'environ 90 nm dans les dendrites, comme l'indique les mesures d'encombrement des protéines MAP2 et Tau [84], qui entourent les microtubules.

La résolution de notre montage est donc en principe suffisante pour séparer spatialement deux microtubules. Les nanodiamants, ainsi internalisés, se révèlent être des sondes du trafic intradendritque potentiellement capable de mesurer des désorganisations du réseau de microtubules.

3.3.4 Discussion et nouvelles stratégies en cours de développement

Pour prétendre à utiliser les anomalies de vitesse, de processivité ou d'organisation des microtubules, comme diagnostic d'impact fonctionnel de variants rares de gènes, il est nécessaire d'améliorer notre méthode sur les points suivants, pour lesquels nous avons déjà obtenus des résultats:

1. **augmenter le nombre de trajectoires étudiées**: jusqu'à présent, trop peu de ND se déplaçant dans les dendrites sont observés par cellule. Il est nécessaire d'améliorer l'efficacité d'internalisation pour obtenir une plus grande et plus fiable statistique de vitesse, d'autant plus si l'on souhaite à l'avenir la comparer avec celle de trafics anormaux. De premier résultats ont été obtenus dans ce sens: l'endocytose après quelques jours de culture s'est avéré être plus efficace.
2. **améliorer la stabilité du montage:** la résolution obtenue jusqu'à présent semble suffisante pour séparer 2 microtubules voisines, elle est néanmoins inférieure à celle rapportée pour les mesures de trafic axonal utilisant des QDots [81]. Un nouveau montage reposant sur un statif commercial a déjà été mis en place et a donné une meilleure précision de localisation en moyenne.
3. **avoir des ND plus brillants**, pour améliorer le rapport signal sur fond et la précision de localisation. C'est déjà chose fait grâce à la collaboration que nous avons avec l'équipe de Huan-Cheng Chang (Institute of Atomic and Molecualre Science, Academia Sinica, Taiwan), pionnier dans la production de ND fluorescents [11].
4. **augmenter la dynamique d'acquisition**, pour être sûr d'observer les mouvements les plus rapides. Le nouveau montage combiné aux nouveaux ND, a déjà permis de réduire les durées de pose de 240 à 50 ms en conservant le même rapport signal sur bruit.

En **conclusion**, nous espérons que cette méthode révèlera des anomalies de trafic dues à des variants génétiques dans les prochaines expériences que notre équipe est en train de mener, comme il nous l'a été demandé après une première soumission à PNAS ("*A novel readout of dendritic neuronal traffic using single fluorescent diamond nanocrystal tracking*" (2012))

⋆ ⋆ ⋆

4 Contribution à l'étude de la fonctionnalisation des nanodiamants fluorescents par des biomolécules

Sommaire

4.1 Enrobage des nanodiamants par une coquille de silice fonctionnalisée 94

4.2 Analyse de la fonctionnalisation par fluorescence, sur ND unique 95

4.3 Fraction de ND ne contenant pas de centres NV 97

4.3.1 Non-emission des nanodiamants fonctionalisés (Zh10-FC) dans le canal rouge 97

4.3.2 Emission des nanodiamants entourés de silice (Zh10-PEG) dans le canal vert 98

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à un autre projet d'utilisation de nanoparticules de diamant pour des applications en biologie, en collaboration avec l'équipe de Petr Cigler, à l'Institut de Chimie organique et de Biochimie de l'Académie des Sciences de la République tchèque à Prague.

Cette équipe a mis au point la fonctionnalisation des nanodiamants fluorescents par des molécules d'intérêt biologique (peptides par exemple) reposant sur un pré-enrobage par une coquille de silice, suivi d'un enrobage de PolyEthylèneGlycol-alkyne permettant une fonctionnalisation ultérieure par chimie-*click* (Fig. 4.1). La coquille de silice permet d'une part de régulariser la forme des ND, initialement très irrégulière et constituée d'arêtes tranchantes, et sa transparence assure une bonne transmission de la fluorescence des centres NV. Enfin, elle permet de fonctionnaliser les nanoparticules par une chimie bien maîtrisée. Les nanodiamants de départ, issus de synthèse HPHT, ont une taille de 30 nm et sont rendus fluorescents par irradiation avec un faisceau de protons énergétiques de façon similaire à la technique décrite dans la Ref. [70].

Nous détaillons dans ce chapitre principalement l'implication de notre équipe dans ce projet.

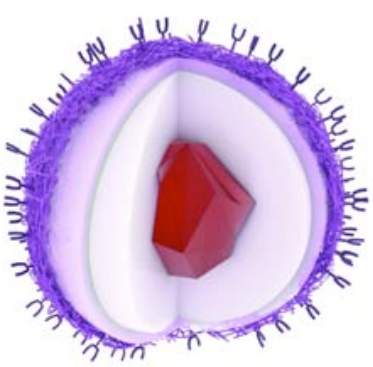

Figure 4.1 : *Nanodiamant enrobé de silice et fonctionnalisé par une molécule d'intérêt. Le ND (en rouge) est d'abord recouvert d'une coque de silice (violet très clair), obtenue par technique sol-gel en hydrolysant un tetraalkoxysilylester (TEOS), qui doit être stabilisée par réticulation avec un mélange de 1,2-bis(triethoxysilyl)ethane (BTSE) et de (3-aminopropyl)triethoxysilane (APS) indiqué en violet clair. La couche obtenue a une épaisseur d'environ 20 nm. Un enrobage par une couche de poymère (PEG-alkyne, en violet plus sombre) permet une bonne dispersion en milieu aqueux et une fonctionnalisation par une molécule d'intérêt (représentée sous la forme de fourches).*

4.1 Enrobage des nanodiamants par une coquille de silice fonctionnalisée

La fonctionnalisation de ces ND fluorescents a été démarrée dans notre équipe à l'ENS Cachan par Ivan Rehor, chercheur postdoctorant dans l'équipe de Petr Cigler, qui a séjourné un mois à Cachan. Ivan a achevé le travail à Prague. Afin de démontrer les capacités de fonctionnalisation des ND modifiés, plusieurs molécules ont été greffées de façon covalente sur le PEG par chimie-*click*, dont un colorant organique (FITC). Notre équipe s'est plus particulièrement intéressée à étudier par des techniques de molécule unique la formation du complexe (ND:silice)-PEG-FITC. Il a s'agit simplement d'étudier la colocalisation de la fluorescence du centre NV avec celle du FITC de façon analogue à celle réalisée dans l'étude du §3.2.2 mais en illumination plein champ, i.e. sur le montage TIRF.

Trois types d'échantillons ont été produits pour notre étude. Un échantillon témoin (Zh10-PEG) ND fluorescents recouverts de la coque de silice et de la couche de PEG seulement (non fonctionnalisées par FITC). Puis deux autres échantillons fonctionnalisés, l'un ayant une haute concentration surfacique en FITC (Zh10-FC) et l'autre une concentration 10 fois plus faible (Zh10-FC-1/10).

4.2 Analyse de la fonctionnalisation par fluorescence, sur ND unique

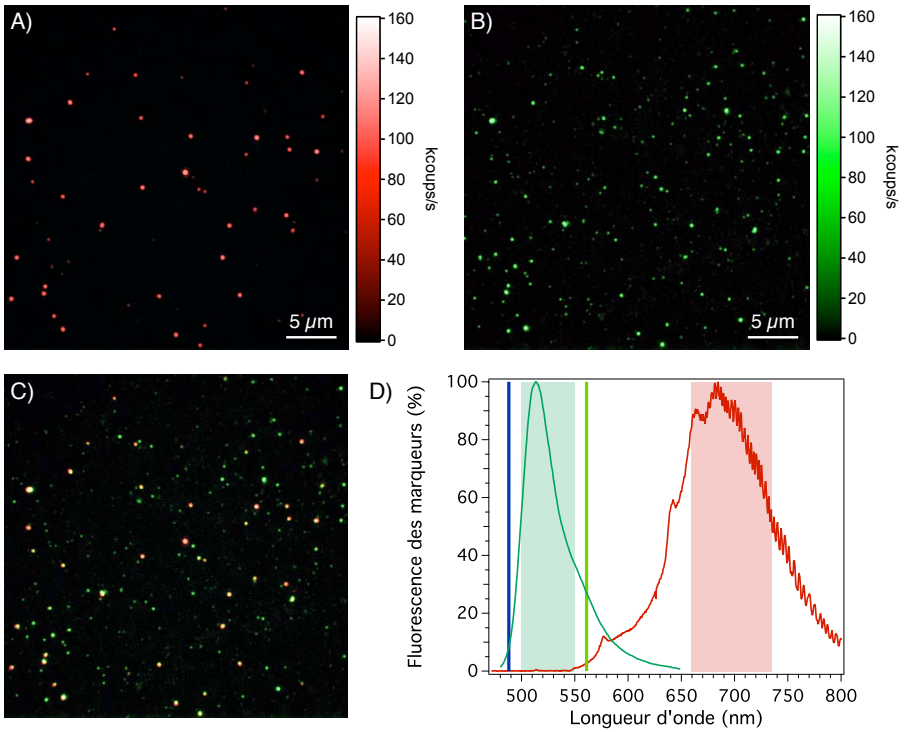

Figure 4.2 : *Étude de la colocalisation ND/FITC de l'échantillon Zh10-FC par microscopie TIRF à deux couleurs. A) Image de fluorescence dans le canal rouge d'émission des centres NV, corrigée du fond par la fonction Substract Background du logiciel ImageJ. La puissance d'excitation utilisée à 561 nm est de 95 mW. On accumule 10 images de 1 s avec un gain de multiplication d'électrons de 25 sur l'EMCCD. B) Image de fluorescence du FITC dans le canal vert, corrigée du fond. La puissance utilisée à 488 nm est de 8,5 mW. On accumule également 10 images de 1 s avec un gain de 100. C) Superposition des images A) et B) par le plugin "Colocalization" d'ImageJ. D) Spectres de fluorescence des deux marqueurs observés, avec les bandes de détection des filtres et les raies d'excitation laser.*

Afin d'évaluer l'efficacité de la fonctionnalisation des ND par la silice, le PEG puis le FITC pour terminer nous avons analysé leur fluorescence à l'échelle de la molécule individuelle, dans le domaine spectral d'émission des centres NV et dans celui de l'émission du FITC, en utilisant le microscope TIRF au deux longueurs d'onde laser de 488 nm et 561 nm. Les ND sont dilués dans l'éthanol pur à une concentration d'environ 1 μg/ml, puis déposés à la tournette sur des lamelles de quartz préalablement nettoyées à l'acétone puis par un plasma d'oxygène. Cette préparation permet d'avoir des particules bien séparées les unes des autres à l'échelle de la limite de diffraction.

L'étude de la fluorescence de l'échantillon Zh10-FC dans les voies rouges et vertes (Figure 4.2-A) et B)) montre que quasiment tous les spots rouges trouvent leurs équivalents dans la voie verte. Ces spots apparaissent en jaune sur la figure combinée 4.2-C). Cela indique que toutes les étapes de fonctionnalisation, jusqu'à la dernière par FITC, semblent avoir fonctionnées. Ces observations sont confirmées pour de nombreux champs d'observation de l'échantillon Zh10-FC.

Echantillon	N° champ	Nombre de spots RV colocalisés	Nombre de spots R seuls	Nombre de spots V seuls	RVcoloc/ Rtot	Vseuls/ Vtot
Zh10-FC	*4*	57	6	105		
	5	113	6	135		
	6	106	2	110		
	7	85	3	103		
	8	39	3	77		
		400	**20**	**530**	**95%**	**57%**
Zh10-FC-1/10	*1*	10	11	121		
	2	8	6	130		
	3	9	9	93		
	4	14	3	151		
	5	13	9	134		
		54	**38**	**629**	**59%**	**92%**
Zh10-PEG	*7*	2	34	31		
	8	2	33	8		
	9	1	38	16		
	10	2	46	32		
		7	**151**	**87**	**4%**	**93%**

Table 4.1 : *Statistique de colocalisation de la fluorescence dans le rouge et dans le vert des ND:SiO_2-PEG-FITC pour les deux échantillons de concentrations différentes en FITC (Zh10-FC et Zh10-FC-1/10) et pour l'échantillon témoin (Zh10-PEG). En rouge est indiquée la fraction de spots rouges et verts colocalisés (RVcoloc) sur le nombre total de spots rouges (Rtot). En vert est indiquée la fraction de spots verts non-colocalisés (Vseuls) sur le nombre total de spots verts (Vtot).*

Les mêmes images sont réalisées pour les deux autres échantillons aux mêmes puissances d'excitation. Nous avons regroupé les analyses sur la figure 4.1. La fraction du nombre de spots rouges et verts colocalisés, ramené au nombre total de spot rouge (RVcoloc/Rtot), suit la tendance attendue. La colocalisation est de 95% pour l'échantillon Zh10-FC, et elle diminue significativement pour l'échantillon Zh10-FC-1/10, où la concentration de marqueurs FITC attachés en surface a été diminuée par 10, et enfin elle n'est que de 4% pour l'échantillon témoin Zh10-PEG (sans marquage FITC). Les quelques colocalisations dans ce dernier cas pourraient provenir de centres N-V-N (centre H3) dans le diamant, qui émettent aussi dans le vert, ou bien encore de la diffusion de la silice (voir §4.3.2).

En revanche, pour tous les échantillons, on observe que la fraction de spot verts qui ne colocalisent avec aucun spot rouge (Vseuls) sur le nombre total de spots verts est très importante, notamment pour l'échantillon témoin qui ne contient pas de FITC. Il est donc très probable, dans ce cas au moins, que les spots verts résiduels ne proviennent pas des marqueurs FITC mais d'une autre espèce dans l'échantillon. On peut émettre alors trois hypothèses sur l'origine de ces spots verts sans fluorescence rouge associée. Il peut s'agir, pour les échantillons Zh10-FC et Zh10-FC-1/10:

1. de molécules de FITC attachées à des ND qui ne contiennent pas ou très peu de centres NV, et qui n'émettent donc pas dans la voie rouge.
2. de molécules de FITC ou autre fluorophore émettant dans le vert, qui sont libres dans le solvant et se déposent sur la lamelle de quartz

et pour tous les échantillons, il peut aussi s'agir:

3. du signal d'autres fluorophores présents dans l'échantillon, émettant dans la voie verte uniquement.

Nous avons étudié les hypothèses 1 et 3. Pour déterminer la fraction de ND qui n'émettent pas dans la voie rouge, nous avons utilisé le montage combinant microscope AFM et confocal décrit dans le chapitre 2, et avons comparé le nombre de ND détectés en topographie par l'AFM et le nombre de spots de fluorescence observés par microscopie confocale. Nous avons également étudié le spectre de fluorescence des ND excités à la longueur d'onde de 488 nm pour évaluer la fraction de signal dans la voie verte qu'ils sont susceptibles de donner. Ces deux études sont l'objet de la section suivante.

4.3 Fraction de ND ne contenant pas de centres NV

4.3.1 Non-emission des nanodiamants fonctionalisés (Zh10-FC) dans le canal rouge

Pour cette étude nous avons utilisé l'échantillon Zh10-FC (avec FITC greffé sur les ND) car nous n'avions pas l'échantillon contrôle Zh10-PEG à ce moment là. La figure 4.3 montre les balayages AFM et confocal d'une même région de la lamelle de quartz sur laquelle les ND ont été préalablement déposés à la tournette. Les cercles rouges indiquent les particules détectées par l'AFM qui n'ont pas de correspondance sur l'image de fluorescence. Sur 4 champs de 30x30 μm observés, on compte environ 37 particules qui n'émettent pas dans la bande spectrale choisie (filtre passe-haut de coupure basse à 580 nm) sur un total de 134 particules, soit environ 30% de particules qui ne contiennent

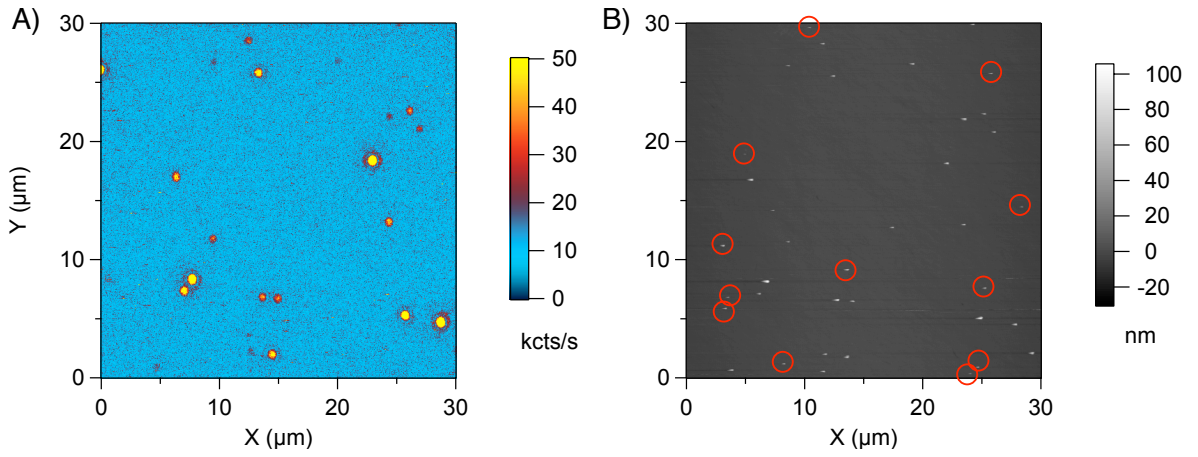

FIGURE 4.3 : *Exemple de balayages simultanés par microscopies AFM et de fluorescence sur l'échantillon Zh10-FC. A) Image confocale. La puisance utilisée est d'environ 400 µW à la longueur d'onde de 532 nm. B) Image AFM de la même région que celle observée en fluorescence. Les cercles rouges représentent les particules qui ne fluorescent pas. On note un décalage de la pointe de la tête AFM d'environ -1 µm pour l'axe des X et +400 nm pour l'axe des Y par rapport à l'image confocale.*

pas ou très peu de centres NV. Cette observation est compatible avec le fait qu'une partie des spots verts seuls observés dans les échantillons Zh10-FC et Zh10-FC-1/10 puisse correspondre à des marqueurs FITC attachés à des nanodiamants ne contenant pas de centres NV (hypothèse n°1), mais pas la totalité. Il reste pour ces deux échantillons 30 et 60 % de spots verts seuls ayant une autre origine.

4.3.2 Emission des nanodiamants entourés de silice (Zh10-PEG) dans le canal vert

On considère ici l'échantillon témoin Zh10-PEG de ND recouverts par la coquille de silice fonctionnalisée avec des chaînes PEG, et on étudie sa fluorescence dans les canaux vert et rouge. La figure 4.4-C) montre en jaune la présence de deux spots parfaitement colocalisés alors qu'il n'y a pas de colorant FITC. Ce signal dans le vert pourrait être lié à la présence de centres colorés H3 (association de deux atomes d'azote impuretés en sites substitutionnels voisins, et d'une lacune: N-V-N) [85] qui émettent dans la même bande spectrale que le FITC (Fig. 4.4-D)).

Pour explorer cette hypothèse nous avons enregistré le spectre de fluorescence de chaque ND en les plaçant au foyer de l'objectif de microscope après un repérage préalable par un balayage confocal. L'enregistrement du spectre a été fait avec un spectrographe

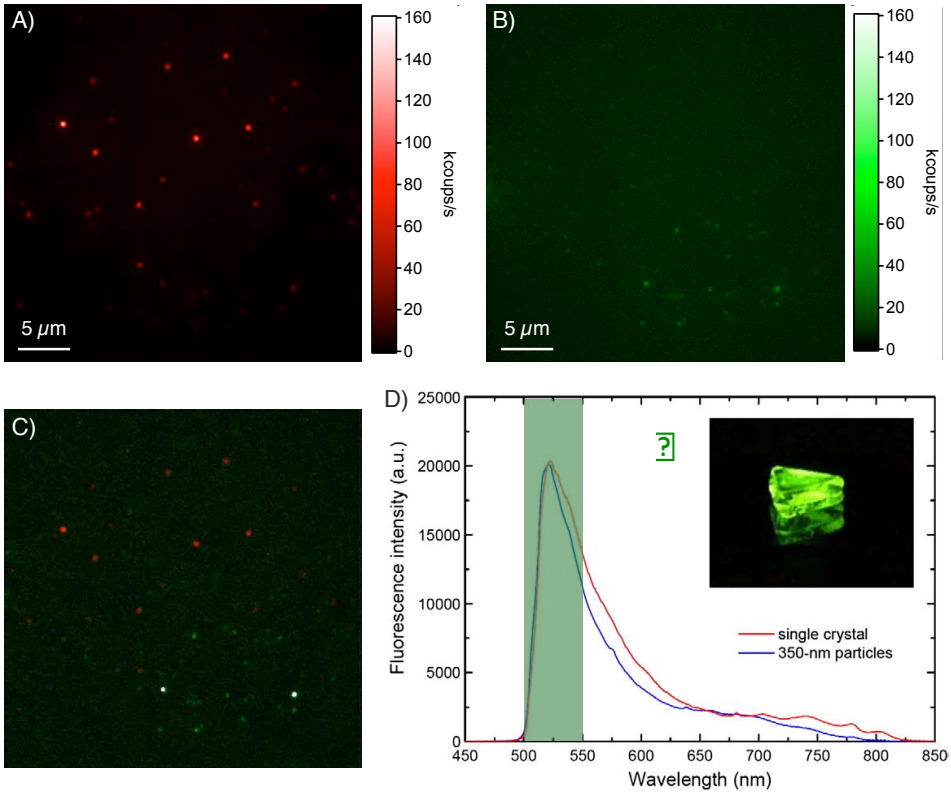

Figure 4.4 : *Observations de la fluorescence des ND enrobés de silice (échantillon Zh10-PEG) dans les canaux rouge A) et vert B) (les deux images ont été corrigées du fond). C) Superposition des images A) et B). D) Spectre d'émission du centre H3 extrait de la référence [85]. La bande verte en transparence représente la bande spectrale de détection du canal vert.*

imageur équipé d'une barrette CCD refroidie. On place sur la voie de détection un filtre passe-haut à forte réjection (OD>7) du laser d'excitation à 488 nm (LP02-488RS, Semrock). La majorité des particules présente un spectre d'émission caractéristique du centre NV (Fig. 4.5-A)), mais environ 10 % font apparaître soit le spectre d'émission du centre H3 (Fig. 4.5-B)), soit des bandes plus étroites spectralement à 524 et 531 nm (Fig. 4.5-C)), qui sont probablement dues à la diffusion Raman provenant de la couche de silice. Une expérience complémentaire a en effet démontrée que les spectres d'émission des ND non recouverts de silice ne présentaient jamais ces structures.

Néanmoins, on remarque que le niveau de fluorescence dans la voie de détection verte provenant des diamants qui présentent des spectres du type de B) ou C) de la figure 4.5 est très faible. Il faut environ 1 mW focalisé, soit une intensité 3000 kW/cm^2, pour les observer, alors qu'en mode TIRF la puissance d'excitation maximal utilisée est 8 mW répartis dans un disque d'environ 20 μm de diamètre correspondant à une intensité de

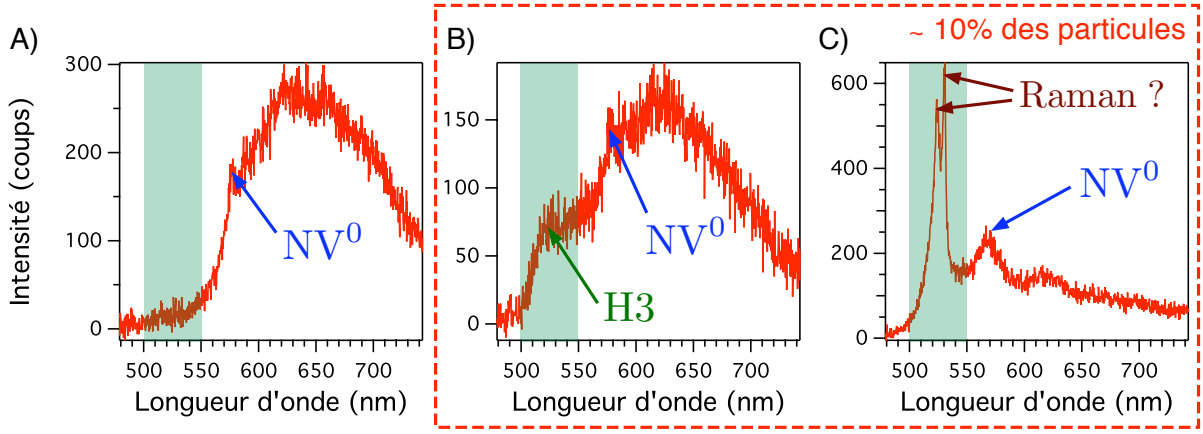

FIGURE 4.5 : *Spectres de fluorescence de ND individuels mesurés sur l'échantillon Zh10-PEG sous excitation laser bleu (à la longueur d'onde de 488 nm) avec une puissance d'excitation d'environ 1 mW. A) Spectre caractéristique du centre NV°. La bande spectrale de détection du FITC est indiqué en vert. B) Spectre d'un deuxième ND montrant à la fois le pic caractéristique du centre H3 et l'émission du centre NV°. C) Spectre d'un troisième ND montrant en plus de l'émission du centre NV° deux pics fins que l'on attribue à la diffusion Raman de la coquille de silice. On constate que les spectres d'émission B) et C) conduisent à un signal dans la voie verte.*

1 kW/cm^2. L'intensité d'illumination est donc 3000 fois plus faible en mode TIRF qu'en mode confocal, ce qui place la fluorescence verte des nanodiamants en dessous du seuil de détection du capteur EMCCD du montage TIRF.

En **conclusion**, tous les spots verts observés sur l'échantillon témoin Zh10-PEG, ainsi qu'une majeure partie des spots verts seuls des échantillons Zh10-FC et Zh10-FC-1/10, proviennent très probablement d'impuretés fluorescentes présentes dans le solvant. Environ 30% des nanodiamants ne présentent pas ou très peu de centres NV et 95% ont été fonctionnalisés avec succès par le marqueur fluorescent FITC pour l'échantillon Zh10-FC, contre 59% pour l'échantillon Zh10-FC-1/10. Nous concluons donc que la fonctionalisation des ND fluorescents en deux temps (enrobage par une coquille de silice + PEG fonctionalisable) a réussi. Ces travaux, complétés par d'autres fonctionalisation réalisées par l'équipe de Petr CIGLER notamment par un peptide, ont été re-soumis à publication dans la revue *Small* en juillet 2013 après avoir effectué les révisions demandées.

⋆⋆⋆

Conclusion et Perspectives

Nous avons montré dans les deux premiers chapitres qu'il n'existe finalement pas de différences fondamentales en ce qui concerne la résolution de la microscopie STED que le centre NV soit dans un échantillon de diamant de taille millimétrique ou dans une nanoparticule. Nous avons mesuré, pour différentes tailles et formes de nanodiamants, des dimensions de spots de l'ordre de 10 nm, comparables aux résultats obtenus dans le diamant de taille millimétrique. Il est également possible de résoudre plusieurs centres NV à l'intérieur d'une même particule s'ils sont séparés d'une distance supérieure à la limite de résolution. En première approximation, la position des spots correspond bien à la position des centres, bien qu'il existe en fait une légère distorsion, d'autant plus forte que le centre est proche des bords de la particule, comme le montre les simulations numériques.

Dans le chapitre 3, nous avons observé que les nanodiamants peuvent être internalisés dans des neurones dissociés du cortex d'embryon de souris maintenus en culture primaire. Les nanodiamants sont retrouvés dans le corps cellulaire ainsi que dans les dendrites, et n'empêchent pas le développement normal du neurone. Nous avons exploré, après fixation des cultures cellulaires, la colocalisation des nanodiamants avec des vésicules du réseau post-Golgi, et montré que nous y retrouvions effectivement une fraction des nanoparticules. Nous avons ensuite étudié le trafic des compartiments dans lesquels se trouvent les nanodiamants, le long des microtubules à l'intérieur des dendrites. La photostabilité parfaite des nanodiamants a permis d'enregistrer des trajectoires durant plusieurs minutes, fournissant ainsi une bonne statistique sur les paramètres étudiés, à savoir la vitesse et la processivité des moteurs moléculaires impliqués.

Perspectives. Depuis l'obtention de ces premiers résultats, un nouveau montage de microscopie TIRF a été reconstruit sur la base d'un nouveau microscope commercial en grande partie automatisé. Le protocole d'internalisation a également été changé: les nanodiamants sont désormais mis en contact avec les cellules plusieurs jours après le début de la culture. Ces améliorations ont permis (i) d'améliorer la stabilité mécanique et (ii) d'augmenter significativement le nombre de nanodiamants internalisés et mobiles dans les dendrites.

Les prochaines expériences qui viennent de commencer ont pour but de montrer que les paramètres du trafic des compartiments contenant les nanodiamants sont significativement modifiés dans le cas de neurones de **souris transgéniques** surexprimant des variants communs de gènes codant pour protéines impliquées dans (i) l'organisation du réseau de microtubules (MARK1 [1]), ou (ii) dans le trafic dendritique (SLC25A12 [2]). La surexpression de MARK1 et SLC2512A a été reliée à l'autisme [39,86]. Si notre approche est validée par ces expériences, il s'agira ensuite de tester si des **variants rares** identifiés par les techniques de séquençage à haut débit ont aussi un impact fonctionnel sur le trafic mesuré avec les nanodiamants, ce qui pourrait constituer un test fonctionnel simple de telles anomalies.

L'ensemble des observations en culture cellulaire présentées dans cette thèse ont été réalisées avec des nanodiamants non-fonctionnalisés, de sorte qu'il n'est pas encore possible de cibler un compartiment spécifique. Il serait cependant intéressant d'étudier aussi le trafic de **récepteurs de neurotransmetteurs** situés sur la membrane des épines dendritiques (cf. Figure 3), à l'instar de ce qui a été fait avec les nanocristaux semiconducteurs [3]. L'accroche covalente d'un anticorps sur les nanodiamants fluorescents est en train d'être réalisée par l'équipe de Anke Krüger, à l'institut de Chimie organique de Würzburg en Allemagne. Nous avons choisi d'utiliser un *nanobody*, c'est à dire la chaine lourde (V_HH) d'un anticorps monochaine tel que les synthétisent les camélidés (chameaux, lamas...), dont le poids moléculaire ($\approx$ 15 kDa) est plus de dix fois plus faible que celui d'un anticorps classique. L'avantage de cette approche est de ne pas trop augmenter la taille du marqueur nanodiamant déjà assez grande. Les premières expériences sont menées avec un *nanobody* anti-GFP dirigé contre la protéine de fusion GFP-GluR2 où GluR2 est une sous unité des récepteurs à glutamate. Les neurones doivent être au préalable transfectés avec le plasmide adéquat.

1. MARK1 code pour une protéine kinase qui régule l'affinité de protéines MAP (*Microtubule Associated Protein*) avec les microtubules, induisant leur décrochement [86].
2. SLC25A12 code pour un transporteur mitochondrial d'aspartate/glutamate, qui assure des fonctions importantes dans les neurones ayant une forte activité métabolique [39].

À plus long terme, l'équipe souhaiterait être capable de réaliser un marquage spécifique intracellualire, ce qui sera nécessaire pour cibler la protéine Homer dans le cas de l'étude de l'architecture des épines. Pour cela, Simon Haziza, doctorant au sein de notre équipe et de celle de Michel Simonneau est en train de mettre au point la microinjection de nanodiamants dans le corps cellulaire de neurones en culture, en utilisant un dispositif d'électrophysiologie *patch-clamp*.

⋆⋆⋆

A Évolution des populations d'un système à 4 niveaux en présence des faisceaux d'excitation et STED (régime impulsionnel).

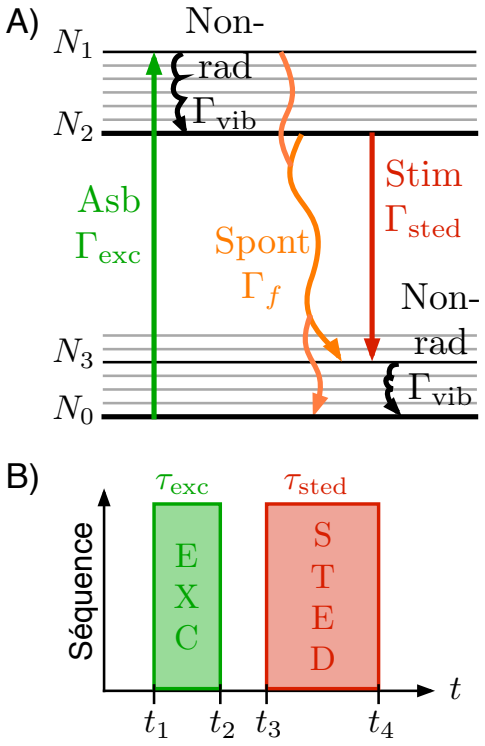

Figure A.1 : *A) Diagramme de Jablonski d'une transition à deux niveaux 0 et 2 avec leurs sous-niveaux vibrationnels, dont les sous-niveaux 1 et 3 peuplés respectivement par le faisceau d'excitation et le faisceau STED, après émission stimulée. B) Séquence typique d'impulsion pour le STED en mode impulsionnel.* τ_{exc} *et* τ_{sted} *sont les largeurs d'impulsion des faisceaux d'excitation de la fluorescence et du STED.*

Dans l'intervalle de temps $[t_1; t_2]$, les relations d'Einstein (équation de taux) qui décrivent l'évolution des populations sont:

$$\begin{cases} \dfrac{dN_0}{dt} = -\Gamma_{exc}N_0 + \Gamma_f(N_1+N_2) + \Gamma_{vib}N_3 \\ \dfrac{dN_1}{dt} = \Gamma_{exc}N_0 - (\Gamma_f + \Gamma_{vib})N_1 \\ \dfrac{dN_2}{dt} = \Gamma_{vib}N_1 - \Gamma_f N_2 \\ \dfrac{dN_3}{dt} = \Gamma_f(N_1+N_2) - \Gamma_{vib}N_3 \end{cases} \tag{A.1}$$

Dans l'intervalle de temps $[t_3; t_4]$, les relations d'Einstein qui décrivent l'évolution des populations sont:

$$\begin{cases} \dfrac{dN_0}{dt} = \Gamma_f(N_1+N_2) + \Gamma_{vib}N_3 \\ \dfrac{dN_1}{dt} = -(\Gamma_f + \Gamma_{vib})N_1 \\ \dfrac{dN_2}{dt} = -\Gamma_{sted}N_2 - \Gamma_f N_2 \\ \dfrac{dN_3}{dt} = \Gamma_{sted}N_2 + \Gamma_f(N_1+N_2) - \Gamma_{vib}N_3 \end{cases} \tag{A.2}$$

où Γ_{exc} et Γ_{sted} sont les taux d'absorption et d'émission stimulée des faisceaux d'excitation et STED respectivement; Γ_f le taux d'émission spontanée et Γ_{vib} celui des transitions non-radiatives entre sous-niveaux vibrationnels.

On commence par résoudre le système (A.1), pendant l'impulsion d'excitation, à l'aide de deux hypothèses:

1. $\Gamma_{\text{vib}} \gg \Gamma_f$ et $\Gamma_{\text{vib}} \gg 1/\tau_{\text{exc}}$, ce qui signifie que pendant la période de l'excitation, le niveau 1 se vide quasi-instantanément dans le niveau 2 par des transitions non-radiatives
2. $\Gamma_f \ll 1/\tau_{\text{exc}}$ et $\Gamma_f \ll 1/(t_3 - t_2)$, ce qui signifie que pendant la période de l'excitation, et jusqu'à ce que l'impulsion STED ne commence, il n'y a quasiment pas d'émission spontanée.

Alors, le système d'équation de l'intervalle $[t_1; t_2]$ devient:

$$\begin{cases} \dfrac{dN_0}{dt} = -\Gamma_{\text{exc}} N_0 \\ \dfrac{dN_1}{dt} = \Gamma_{\text{exc}} N_0 - \Gamma_{\text{vib}} N_1 \\ \dfrac{dN_2}{dt} = \Gamma_{\text{vib}} N_1 \end{cases} \tag{A.3}$$

On résout la première équation et on trouve:

$$N_0(t_2) = \exp(-\Gamma_{\text{exc}} t_2) \tag{A.4}$$

en considérant qu'à l'instant t_0, le système est dans l'état fondamental (i.e $N_0(t_0) = 1$).

Puis en utilisant l'hypothèse 1. on considère que $N_1(t_2) = 0$, d'où:

$$N_2(t_2) = 1 - N_0(t_2) = 1 - \exp(-\Gamma_{\text{exc}} t_2) \tag{A.5}$$

La population de l'état excité 2 reste ensuite à peu près constante jusqu'à l'arrivée de l'impulsion STED à t_3, d'après l'hypothèse 2.

Pour résoudre le second système (A.2), pendant l'impulsion STED, on fait aussi l'hypothèse que $\Gamma_f \ll 1/\tau_{\text{sted}}$. Il n'y a donc pas d'émission spontanée dans l'intervalle $[t_3; t_4]$ et le niveau 2 se vide alors uniquement par émission stimulée, d'où:

$$N_2(t_4) = N_2(t_2) \cdot \exp(-\Gamma_{\text{sted}} \tau_{\text{sted}}) \tag{A.6}$$

Si on note maintenant $I_{\text{sted}}(x)$, le profil d'intensité du faisceau STED dans un axe du plan (xy) perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau, on peut alors écrire:

$$\Gamma_{\text{sted}}(x) = \frac{\sigma I_{\text{sted}}(x)}{h\nu_{\text{sted}}} \tag{A.7}$$

où σ est la section efficace d'émission stimulée, ν_{sted} la fréquence du laser STED et h la constante de Planck.

Ainsi, la **fraction de fluorescence résiduelle** $\eta_{\text{pulse}}(x)$ en présence du faisceau STED est donnée par:

$$\eta_{\text{pulse}}(x) = \frac{N_2(t_4)}{N_2(t_2)} = \exp\left(-\frac{\sigma I_{\text{sted}}(x)}{h\nu_{\text{sted}}}\tau_{\text{sted}}\right) \tag{A.8}$$

ou bien:

$$\eta_{\text{pulse}}(x) = \exp\left(-\frac{\ln 2\ I_{\text{sted}}(x)}{I_{\text{s,pulse}}}\right) \tag{A.9}$$

où $I_{\text{s,pulse}} = \ln 2\ h\nu_{\text{sted}}/(\sigma\tau_{\text{sted}})$ est alors l'intensité de seuil STED nécessaire pour diminuer de moitié la population de l'état excité 2.

$\star\star\star$

B Evolution des populations d'un système à 4 niveaux en présence des faisceaux d'excitation et STED (régime continu).

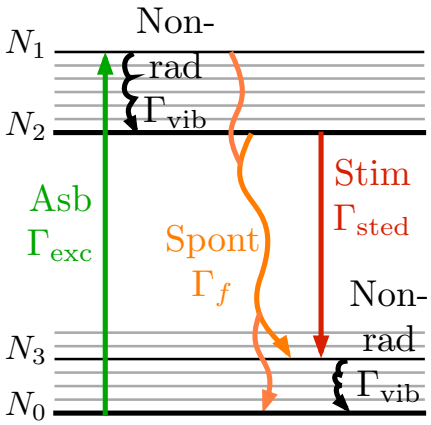

Figure B.1 : *Diagramme de Jablonski, identique à celui du régime impulsionnel.*

Les relations d'Einstein du système à l'état stationnaire sont:

$$\begin{cases} \dfrac{dN_0}{dt} = -\Gamma_{exc}N_0 + \Gamma_f(N_1+N_2) + \Gamma_{vib}N_3 = 0 \\ \dfrac{dN_1}{dt} = \Gamma_{exc}N_0 - (\Gamma_f + \Gamma_{vib})N_1 = 0 \\ \dfrac{dN_2}{dt} = \Gamma_{vib}N_1 - (\Gamma_{sted} + \Gamma_f)N_2 = 0 \\ \dfrac{dN_2}{dt} = \Gamma_{sted}N_2 - \Gamma_f(N_1+N_2) - \Gamma_{vib}N_3 = 0 \end{cases} \tag{B.1}$$

Pour résoudre ce système, on exprime N_0 en fonction de N_2, en combinant la deuxième et la troisième équation et on obtient:

$$N_2 = \frac{(\Gamma_{vib}+\Gamma_f)(\Gamma_{sted}+\Gamma_f)}{\Gamma_{vib}\cdot\Gamma_{exc}} \tag{B.2}$$

On fait une nouvelle fois l'hypothèse que Γ_{vib} est très grand devant tous les autres taux de transition, c'est-à-dire que les populations des niveaux 1 et 3 se vident quasi instantanément dans les niveaux 2 et 0 respectivement. On obtient alors:

$$\begin{cases} N_1 = N_3 = 0 \\ N_0 + N_2 = 1 \end{cases} \tag{B.3}$$

On remplace maintenant N_0 par l'expression (B.2) dans le système précédent, et on obtient:

$$N_2\left(1 + \frac{(\Gamma_{vib}+\Gamma_f)(\Gamma_{sted}+\Gamma_f)}{\Gamma_{vib}\cdot\Gamma_{exc}}\right) = 1 \tag{B.4}$$

Et comme $\Gamma_{\text{vib}} \gg \Gamma_f$, on peut simplifier cette expression ainsi:

$$N_2 \left(1 + \frac{\Gamma_{\text{sted}} + \Gamma_f}{\Gamma_{\text{exc}}}\right) = 1 \tag{B.5}$$

D'où:

$$N_2 = \frac{1}{\Gamma_f + \Gamma_{\text{exc}} + \Gamma_{\text{sted}}} \tag{B.6}$$

Ainsi, la **fraction de fluorescence résiduelle** en présence du faisceau STED et en régime d'excitation continu $\eta_{\text{cw}}(x)$ peut être écrit:

$$\eta_{\text{cw}}(x) = \frac{N_2(I_{\text{sted}}(x))}{N_2(I_{\text{sted}}(0))} = \frac{\Gamma_f + \Gamma_{\text{exc}}}{\Gamma_f + \Gamma_{\text{exc}} + \Gamma_{\text{sted}}} \tag{B.7}$$

A puissance d'excitation très faible ($\Gamma_{\text{exc}} \ll \Gamma_f,\ \Gamma_{\text{sted}}$), on peut simplifier cette expression ainsi:

$$\eta_{\text{cw}}(x) = \frac{1}{1 + \frac{\Gamma_{\text{sted}}}{\Gamma_f}} \tag{B.8}$$

On obtient finalement:

$$\eta_{\text{cw}}(x) = \frac{1}{1 + \frac{\sigma \cdot I_{\text{sted}}(x)}{h\nu_{\text{sted}}}\tau_f} \tag{B.9}$$

Ou bien:

$$\eta_{\text{cw}}(x) = \frac{1}{1 + \frac{I_{\text{sted}}(x)}{I_{\text{s,cw}}}} \tag{B.10}$$

où $I_{\text{s,cw}}$ est ici encore l'intensité STED nécessaire pour diminuer par 2 la population de l'état excité N_2. Un calcul plus détaillé du cas continu est donné dans la référence [45].

⋆ ⋆ ⋆

C Propriétés photophysiques des centres NV

C.1 Absorption et émission des centres NV

Le centre coloré NV du diamant se comporte comme un atome artificiel piégé au sein de la matrice de diamant. Ainsi protégé de l'environnement, cet émetteur est parfaitement photostable à température ambiante. Dans sa forme négative NV^-, il possède deux électrons non appariés, soit un spin électronique S=1. L'état fondamental de ce système est alors un triplet de spin, dont la dégénérescence est partiellement levée et les sous-niveaux $m_s = 0$ et $m_s = \pm 1$ séparés d'environ 2,87 GHz (Fig. C.1-B)). Le centre absorbe principalement dans le vert, nous utilisons généralement au laboratoire des lasers à 532 et 561 nm, puis émet un large spectre centré autour de 700 nm et dont la raie zéro-phonon est située à 637 nm (Fig. C.1-C)). L'élargissement du spectre de fluorescence, de l'ordre de 100 nm, est dû aux nombreuses interactions entre la transition radiative et les phonons du diamant. Le temps de vie de l'état excité est de l'ordre de 12 ns.

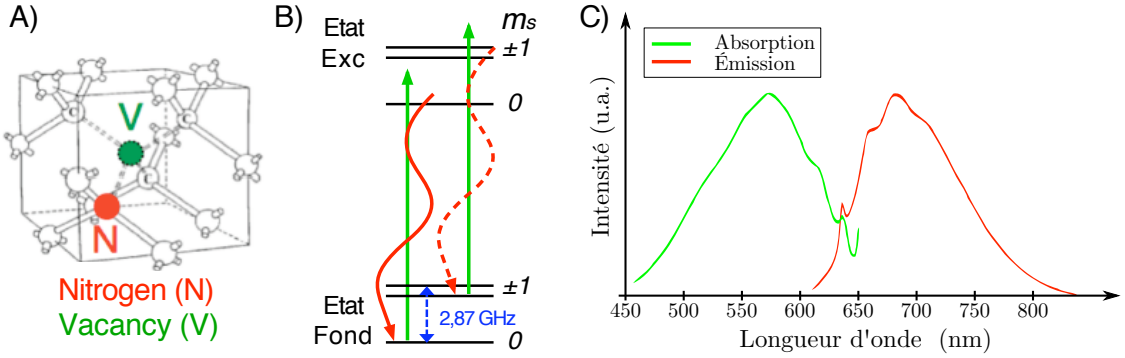

Figure C.1 : *A) Centre NV dans la maille de diamant. B) Niveaux d'énergie du centre NV^- C) Spectre d'absorption (vert) et d'émission (rouge) du centre NV^-.*

Toutes ces grandeurs (temps de vie, raie zéro-phonon, etc...) sont valables pour un centre NV^- situé à l'intérieur d'un diamant massif, loin de la surface. Dans le cas de nanoparticules, la proximité des centres avec la surface ainsi que les fortes contraintes mécaniques exercées sur la maille de diamant liées à leur taille, induisent une certaines dispersion des grandeurs photophysiques.

Il arrive que le centre NV^- perde un électron. Il est alors noté NV^0. Sous sa forme neutre, le centre NV ne possède plus les propriétés de triplet de spin mais est capable d'émettre de la fluorescence. Son spectre d'émission, décalé vers le bleu, est centré autour de 620 nm et possède une raie zéro-phonon à 575 nm.

C.2 Comparaison de la fluorescence d'un centre NV avec une molécule et un cristal semi-conducteur

Les propriétés de fluorescence d'un centre NV^- unique ont été comparées antérieurement au laboratoire avec celle d'une molécule fluorescente et un cristal semi-conducteur, marqueurs couramment utilisés en biologie. Cette étude, menée par O. Faklaris, doctorant au LPQM de 2006 à 2009, est détaillée dans son manuscrit de thèse [78], ainsi que dans les références [87, 88]. Nous ne présenterons ici qu'une synthèse des résultats principaux.

La molécule fluorescente choisie pour cette étude est la carbocyanine $DilC_{18}$ (Fluka, Spectrum Info, CAS N° 41085-99-8) car ses spectres d'absorption et d'émission sont proches de celui du centre NV^-. Pour la même raison, le cristal semi-conducteur choisi est le conjugué Qdot-IgG (lot N° 51017A, Invitrogen, USA). Sur le même montage, des courbes de saturation ont été mesurées pour chacun des trois marqueurs en régime d'émetteur unique (Fig. C.2). L'excitation est faite par un laser continu à 532 nm et la détection au travers d'un filtre passe-bas de longueur d'onde de coupure 530 nm.

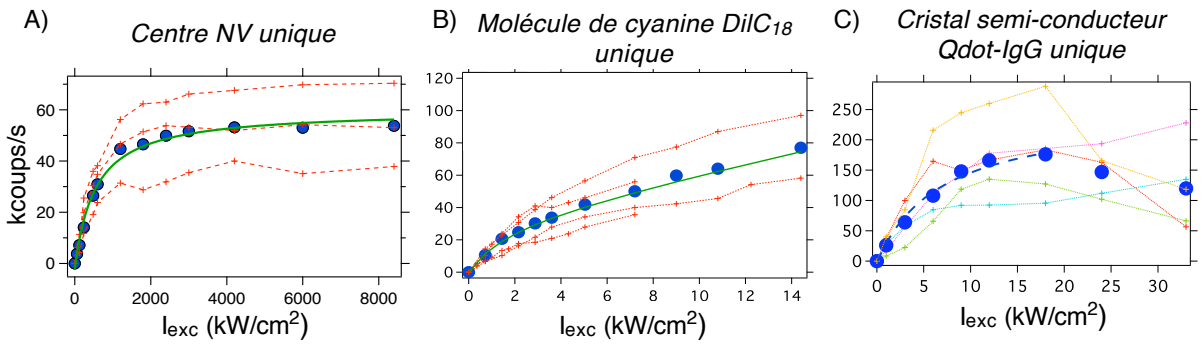

Figure C.2 : *Courbes de saturation de la fluorescence d'un centre NV unique (A)), d'une molécule de cynanine unique (B)) et d'un cristal semi-conducteur unique (C)), extraites de la thèse d'O.* Faklaris *[78]. Les points bleus sont les moyennes d'intensité respectivement calculées à partir des 3 centres NV, 4 molécules et des 5 Qdots observés. Les courbes vertes et la courbe en pointillés bleus sont les ajustements des trois moyennes d'intensité de saturation.*

Dans le cas du centre NV, l'intensité de fluorescence est modélisée en fonction de l'intensité d'excitation par la relation $R(I_{exc}) = A \Big/ \left(1 + \frac{I_{exc}^{sat}}{I_{exc}}\right)$ où A est une constante et I_{exc}^{sat} l'intensité de saturation d'un centre NV unique (modèle à 2 niveaux). Sur une moyenne de 3 centres uniques trouvés au sein de 3 nanodiamants, la courbe de saturation est ajustée et permet de trouver une intensité de saturation $R_{sat} = \lim_{I\to\infty} R(I) \Big/ 2 = 31$ kcoups/s.

Dans la cas de la molécule de cyanine, c'est un modèle à 3 niveaux qui est considéré et l'ajustement de la courbe de saturation est obtenu par la relation $R(I_{exc}) = \left(\eta_Q \cdot \eta_{det} \cdot k_{21}\right) \Big/ \left(1 + \frac{k_{21}}{k_{12}} + \frac{k_{23}}{k_{31}}\right)$ où les quantités qui dépendent de I_{exc} sont $k_{12} = \frac{\sigma I_{exc}}{h\nu_{exc}}$ et $k_{31} = k_{31}^0 \cdot (1 + \beta I_{exc})$, sachant que η_Q et η_{det} sont les efficacités quantique et de détection, k_{ij} le taux de transition de l'état i vers j, σ la section efficace d'absorption de la molécule à la fréquence ν_{exc}. L'ajustement de la courbe de saturation pour les 4 molécules uniques de cynanine étudiées donne une intensité de saturation par extrapolation de $R_{sat} = 2475$ kcoups/s. En réalité, cette grandeur n'est jamais atteinte en raison du photoblanchiment précoce de la molécule, et le taux de comptage maximal observé est d'environ 80 kcoups/s.

Dans le cas du cristal semi-conducteur, du fait du scintillement, l'intensité n'est mesuré que lorsque le cristal est dans l'état "on". Pour les 5 Qdots étudiés, l'intensité de fluorescence décroit pour une excitation supérieure à 20 kW/cm^2, phénomène attribué à l'oxydation de la surface du cristal induite par le laser. Afin de comparer les propriétés des Qdots avec celles des centres NV et des molécules, les courbes de saturation sont ajustées avec la relation d'un système à 2 niveaux, en ne prenant en compte que leur partie croissante. Ainsi, l'intensité de saturation vaut $R_{sat} = 148$ kcoups/s.

Les résultats de ces mesures ainsi que des grandeurs caractéristiques de chacun de ces trois émetteurs sont regroupés dans le tableau comparatif de la figue C.3.

	$\sigma \times 10^{-17}$ cm^2	τ_{rad} (ns)	$I_{\text{exc}}^{\text{sat}}$ (kW/cm^2)	R^{sat} (kcounts/ s)
single molecule	40-60 [a]	2.6 [b]	1700 [i] 14.5 [ii]	2475 [i] 74 [ii]
single QD	20-160 [c]	15-20 [d]	9 ± 3	148
single NV in PND	3 [e]	17 ± 15 [f]	529 ± 70	31

Figure C.3 : *Table de comparaison des propriétés de fluorescence d'un centre NV unique avec celles d'autres marqueurs fluorescents, extraite de la thèse d'O. Flakaris [78]. Dans le cas de la molécule de cyanine, i) est la valeur extraite de l'ajustement et ii) la valeur d'intensité maximale si on sonsidère le photoblanchiment. Références: a [89], b [90], c [91], d [92], e [93] et f [94].*

⋆ ⋆ ⋆

Bibliographie

[1] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. a. Baird, W. W. Webb, et U. Wiesner. "Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles." *Nano Letters*, **5**, 113 (2005).

[2] S.-J. Yu, M.-W. Kang, H.-C. Chang, K.-M. Chen, et Y.-C. Yu. "Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity." *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 17604 (2005).

[3] M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, et A. Triller. "Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking." *Science (New York, N.Y.)*, **302**, 442 (2003).

[4] C.-Y. Fang, V. Vaijayanthimala, C.-A. Cheng, S.-H. Yeh, C.-F. Chang, C.-L. Li, et H.-C. Chang. "The Exocytosis of Fluorescent Nanodiamond and Its Use as a Long-Term Cell Tracker." *Small*, **7**, 3363 (2011).

[5] X. Michalet, *et al.* "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics." *Science (New York, N.Y.)*, **307**, 538 (2005).

[6] N. Mohan, C.-S. Chen, H.-H. Hsieh, Y.-C. Wu, et H.-C. Chang. "In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in Caenorhabditis elegans." *Nano Letters*, **10**, 3692 (2010).

[7] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, et D. J. Nesbitt. "Nonexponential "blinking" kinetics of single CdSe quantum dots: A universal power law behavior." *The Journal of Chemical Physics*, **112**, 3117 (2000).

[8] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, et S. N. Bhatia. "Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots." *Nano Letters*, **4**, 11 (2004).

[9] A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, S. M. Hussain, et L. Dai. "Are diamond nanoparticles cytotoxic?" *Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 2 (2007).

[10] Y.-K. Tzeng, O. Faklaris, B.-M. Chang, Y. Kuo, J.-H. Hsu, et H.-C. Chang. "Superresolution imaging of albumin-conjugated fluorescent nanodiamonds in cells by stimulated emission depletion." *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **50**, 2262 (2011).

[11] Y.-R. Chang, *et al.* "Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds." *Nature Nanotechnology*, **3**, 284 (2008).

[12] E. Rittweger, K. Han, S. Irvine, C. Eggeling, et S. Hell. "STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution." *Nature Photonics*, **3**, 144 (2009).

[13] A. Malgaroli. "Silent synapses: I can't hear you! Could you please speak aloud?" (1999).

[14] T. Tada et M. Sheng. "Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis." *Current Opinion in Neurobiology*, **16**, 95 (2006).

[15] D. H. Bhatt, S. Zhang, et W.-B. Gan. "Dendritic Spine Dynamics." *Annual Review of Physiology*, **71**, 261 (2009).

[16] M. Bosch et Y. Hayashi. "Structural plasticity of dendritic spines." *Current Opinion in Neurobiology*, **22**, 383 (2012).

[17] P. Penzes et K. a. Jones. "Dendritic spine dynamics–a key role for kalirin-7." *Trends in Neurosciences*, **31**, 419 (2008).

[18] A. Holtmaat et K. Svoboda. "Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain." *Nature Reviews. Neuroscience*, **10**, 647 (2009).

[19] T. L. Spires, *et al.* "Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy." *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 7278 (2005).

[20] S. Knafo, L. Alonso-Nanclares, J. Gonzalez-Soriano, P. Merino-Serrais, I. Fernaud-Espinosa, I. Ferrer, et J. DeFelipe. "Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease." *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, **19**, 586 (2009).

[21] L. J. Garey, *et al.* "Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **65**, 446 (1998).

[22] T. A. Comery, J. B. Harris, P. J. Willems, B. A. Oostra, S. A. Irwin, I. J. Weiler, et W. T. Greenough. "Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: Maturation and pruning deficits." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 5401 (1997).

[23] E. a. Nimchinsky, a. M. Oberlander, et K. Svoboda. "Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice." *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 5139 (2001).

[24] M. K. Hayashi, H. M. Ames, et Y. Hayashi. "Tetrameric hub structure of postsynaptic scaffolding protein homer." *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 8492 (2006).

[25] Y. Shiraishi-Yamaguchi et T. Furuichi. "The Homer family proteins." *Genome Biology*, **8**, 206 (2007).

[26] M. K. Hayashi, *et al.* "The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure." *Cell*, **137**, 159 (2009).

[27] P. R. Brakeman, A. A. Lanahan, R. O'Brien, K. Roche, C. A. Barnes, R. L. Huganir, et P. F. Worley. "Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors." *Nature*, **386**, 284 (1997).

[28] B. Xiao, J. Cheng Tu, et P. F. Worley. "Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function." *Current Opinion in Neurobiology*, **10**, 370 (2000).

[29] C. Sala, K. Futai, K. Yamamoto, P. F. Worley, Y. Hayashi, et M. Sheng. "Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a." *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 6327 (2003).

[30] A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, et X. Zhuang. "Superresolution imaging of chemical synapses in the brain." *Neuron*, **68**, 843 (2010).

[31] I. Izeddin, C. G. Specht, M. Lelek, X. Darzacq, A. Triller, C. Zimmer, et M. Dahan. "Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe." *PloS one*, **6**, e15611 (2011).

[32] U. V. Nägerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell, et T. Bonhoeffer. "Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18982 (2008).

[33] S. W. Hell et M. Kroug. "Ground-state-depletion fluorscence microscopy: a concept for breaking diffraction resolution limit." *Applied Physics B*, **60**, 495 (1995).

[34] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, a. Egner, et S. W. Hell. "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 8206 (2000).

[35] D. Wildanger, *et al.* "Solid immersion facilitates fluorescence microscopy with nanometer resolution and sub-Ångström emitter localization." *Advanced Materials*, **24**, OP309 (2012).

[36] N. Hirokawa, S. Niwa, et Y. Tanaka. "Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease." *Neuron*, **68**, 610 (2010).

[37] L. Davidovic, X. H. Jaglin, A.-M. Lepagnol-Bestel, S. Tremblay, M. Simonneau, B. Bardoni, et E. W. Khandjian. "The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules." *Human Molecular Genetics*, **16**, 3047 (2007).

[38] G. J. Bassell et S. T. Warren. "Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function." *Neuron*, **60**, 201 (2008).

[39] A.-M. Lepagnol-Bestel, *et al.* "SLC25A12 expression is associated with neurite outgrowth and is upregulated in the prefrontal cortex of autistic subjects." *Molecular Psychiatry*, **13**, 385 (2008).

[40] L. M. Ittner et J. Götz. "Amyloid-β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease." (2010).

[41] L. M. Ittner, *et al.* "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." *Cell*, **142**, 387 (2010).

[42] E. Mandelkow, M. von Bergen, J. Biernat, et E.-M. Mandelkow. "Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease." *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **17**, 83 (2007).

[43] B. Harke, J. Keller, C. K. Ullal, V. Westphal, A. Schönle, et S. W. Hell. "Resolution scaling in STED microscopy." *Optics Express*, **16**, 4154 (2008).

[44] K. Y. Han, K. I. Willig, E. Rittweger, F. Jelezko, C. Eggeling, et S. W. Hell. "Three-dimensional stimulated emission depletion microscopy of nitrogen-vacancy centers in diamond using continuous-wave light." *Nano Letters*, **9**, 3323 (2009).

[45] A. S. Trifonov, J.-C. Jaskula, C. Teulon, D. R. Glenn, N. Bar-Gill, et R. L. Walsworth. "Limits to resolution of cw sted microscopy." Dans "Advances in Atomic, Molecular, and Optical Physics," pages 279–302. Elsevier (2013).

[46] G. Dantelle, *et al.* "Efficient production of NV colour centres in nanodiamonds using high-energy electron irradiation." *Journal of Luminescence*, **130**, 1655 (2010).

[47] L. Rondin, *et al.* "Surface-induced charge state conversion of nitrogen-vacancy defects in nanodiamonds." *Physical Review B*, **82**, 115449 (2010).

[48] J. J. Greffet, J. P. Hugonin, M. Besbes, N. D. Lai, F. Treussart, et J. F. Roch. "Diamond particles as nanoantennas for nitrogen-vacancy color centers." *arXiv* (2011). 1107.0502v1.

[49] R. Hanbury Brown et R. Q. Twiss. "A Test of a New Type of Stellar Interferometer on Sirius." (1956).

[50] A. Beveratos, S. Kühn, R. Brouri, T. Gacoin, J.-P. Poizat, et P. Grangier. "Room temperature stable single-photon source." *The European Physical Journal D - Atomic, Molecular and Optical Physics*, **18**, 191 (2002).

[51] J. R. Moffitt, C. Osseforth, et J. Michaelis. "Time-gating improves the spatial resolution of STED microscopy." *Optics Express*, **19**, 4242 (2011).

[52] G. Vicidomini, *et al.* "Sharper low-power STED nanoscopy by time gating." *Nature Methods*, **8**, 571 (2011).

[53] N. D. Lai, O. Faklaris, D. Zheng, V. Jacques, H.-C. Chang, J.-F. Roch, et F. Treussart. "Quenching nitrogen–vacancy center photoluminescence with an infrared pulsed laser." *New Journal of Physics*, **15**, 033030 (2013).

[54] D. M. Toyli, D. J. Christle, A. Alkauskas, B. B. Buckley, C. G. Van de Walle, et D. D. Awschalom. "Measurement and Control of Single Nitrogen-Vacancy Center Spins above 600 K." *Physical Review X*, **2**, 031001 (2012).

[55] T. Plakhotnik et R. Chapman. "Nitrogen-vacancy centers in nano-diamond reversibly decrease the luminescence quantum yield under strong pulsed-laser irradiation." *New Journal of Physics*, **13**, 045001 (2011).

[56] T. Plakhotnik et D. Gruber. "Luminescence of nitrogen-vacancy centers in nanodiamonds at temperatures between 300 and 700 K: perspectives on nanothermometry." *Physical Chemistry Chemical Physics*, **12**, 9751 (2010).

[57] H. Schniepp et V. Sandoghdar. "Spontaneous Emission of Europium Ions Embedded in Dielectric Nanospheres." *Physical Review Letters*, **89**, 257403 (2002).

[58] A. Bossavit. "A rationale for 'edge-elements' in 3-D fields computations." *IEEE Transaction on Magnetism*, **24**, 74 (1988).

[59] Y. Chalopin, H. Dammak, M. Hayoun, M. Besbes, et J.-J. Greffet. "Size-dependent infrared properties of MgO nanoparticles with evidence of screening effect." *Applied Physics Letters*, **100**, 241904 (2012).

[60] G. Balasubramanian, *et al.* "Nanoscale imaging magnetometry with diamond spins under ambient conditions." *Nature*, **455**, 648 (2008).

[61] L. Rondin, *et al.* "Nanoscale magnetic field mapping with a single spin scanning probe magnetometer." *Applied Physics Letters*, **100**, 153118 (2012).

[62] P. Neumann, *et al.* "Excited-state spectroscopy of single NV defects in diamond using optically detected magnetic resonance." *New Journal of Physics*, **11**, 013017 (2009).

[63] V. Acosta, *et al.* "Diamonds with a high density of nitrogen-vacancy centers for magnetometry applications." *Physical Review B*, **80**, 115202 (2009).

[64] W. Zhang, B. Gallinet, et O. J. F. Martin. "Symmetry and selection rules for localized surface plasmon resonances in nanostructures." *Physical Review B*, **81**, 233407 (2010).

[65] N. M. Mojarad et M. Agio. "Tailoring the excitation of localized surface plasmon-polariton resonances by focusing radially-polarized beams." *Optic Express*, **17**, 117 (2009).

[66] S. Arroyo-Camejo, *et al.* "Stimulated emission depletion microscopy resolves individual nitrogen vacancy centers in diamond nanocrystals." *ACS Nano*, **7**, 10912 (2013).

[67] M. Gu, Y. Cao, S. Castelletto, B. Kouskousis, et X. Li. "Super-resolving single nitrogen vacancy centers within single nanodiamonds using a localization microscope." *Optics Express*, **21**, 17639 (2013).

[68] E. H. Chen, O. Gaathon, M. E. Trusheim, et D. Englund. "Wide-field multispectral super-resolution imaging using spin-dependent fluorescence in nanodiamonds." *Nano Letters*, **13**, 2073 (2013).

[69] H. V. Mudrakola, K. Zhang, et B. Cui. "Optically resolving individual microtubules in live axons." *Structure (London, England : 1993)*, **17**, 1433 (2009).

[70] O. Faklaris, *et al.* "Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway." *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **4**, 2236 (2008).

[71] O. Faklaris, *et al.* "Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: study of the uptake mechanism in mammalian cells." *ACS Nano*, **3**, 3955 (2009).

[72] A. Alhaddad, C. Durieu, G. Dantelle, E. Le Cam, C. Malvy, F. Treussart, et J.-R. Bertrand. "Influence of the Internalization Pathway on the Efficacy of siRNA Delivery by Cationic Fluorescent Nanodiamonds in the Ewing Sarcoma Cell Model." *PLoS ONE*, **7**, e52207 (2012).

[73] K.-K. Liu, C.-C. Wang, C.-L. Cheng, et J.-I. Chao. "Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells." *Biomaterials*, **30**, 4249 (2009).

[74] T.-J. Wu, *et al.* "Tracking the engraftment and regenerative capabilities of transplanted lung stem cells using fluorescent nanodiamonds." *Nature Nanotechnology*, pages 1–8 (2013).

[75] A. Alhaddad, *et al.* "Nanodiamond as a vector for siRNA delivery to Ewing sarcoma cells." *Small*, **7**, 3087 (2011).

[76] Y. Loe-mie, *et al.* "SMARCA2 and other genome-wide supported schizophrenia-associated genes : regulation by REST / NRSF , network organization and primate-specific evolution." *Human Molecular Genetics*, **19**, 2841 (2010).

[77] M. Kvajo, *et al.* "Altered axonal targeting and short-term plasticity in the hippocampus of Disc1 mutant mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, E1349 (2011).

[78] O. Flaklaris. *Photoluminescent diamond nanoparticles as labels in cells : study of their optical properties and investigation of their cellular uptake mechanism.* Thèse de Doctorat, ENS Cachan (2009).

[79] A. Kusumi, Y. Sako, et M. Yamamoto. "Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells." *Biophysical Journal*, **65**, 2021 (1993).

[80] D. Sage, F. R. Neumann, F. Hediger, S. M. Gasser, et M. Unser. "Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics." *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society*, **14**, 1372 (2005).

[81] S. Courty, C. Luccardini, Y. Bellaiche, G. Cappello, et M. Dahan. "Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging." *Nano Letters*, **6**, 1491 (2006).

[82] Y. Kanai, N. Dohmae, et N. Hirokawa. "Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule." *Neuron*, **43**, 513 (2004).

[83] Z. Li, K.-I. Okamoto, Y. Hayashi, et M. Sheng. "The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses." *Cell*, **119**, 873 (2004).

[84] J. Chen, Y. Kanai, N. J. Cowan, et N. Hirokawa. "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." *Nature*, **360**, 674 (1992).

[85] T.-L. Wee, Y.-W. Mau, C.-Y. Fang, H.-L. Hsu, C.-C. Han, et H.-C. Chang. "Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications." *Diamond and Related Materials*, **18**, 567 (2009).

[86] G. Maussion, *et al.* "Convergent evidence identifying MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) as a susceptibility gene for autism." *Human Molecular Genetics*, **17**, 2541 (2008).

[87] O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi, J.-P. Boudou, T. Sauvage, P. a. Curmi, et F. Treussart. "Comparison of the photoluminescence properties of semiconductor quantum dots and non-blinking diamond nanoparticles. Observation of the diffusion of diamond nanoparticles in living cells." *J. Eur. Opt. Soc. Rapid Public.*, **4**, 9032 (2009).

[88] O. Faklaris, J. Botsoa, T. Sauvage, J.-F. Roch, et F. Treussart. "Photoluminescent nanodiamonds: Comparison of the photoluminescence saturation properties of the NV color center and a cyanine dye at the single emitter level, and study of the color center concentration under different preparation conditions." *Diamond and Related Materials*, **19**, 988 (2010).

[89] "Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin." *Bioconjugate Chemistry*, **11**, 696 (2000).

[90] F. Treussart, R. Alléaume, V. Le Floc'h, et J.-F. Roch. "Single photon emission from a single molecule." *Comptes Rendus Physique*, **3**, 501 (2002).

[91] B. Lounis, H. A. Bechtel, D. Gerion, P. Alivisatos, et W. E. Moerner. "Photon antibunching in single CdSe/ZnS quantum dot fluorescence." *Chemical Physics Letters*, **329**, 399 (2000).

[92] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. S. Chemla, a. P. Alivisatos, M. Sauer, et S. Weiss. "Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots." *Optics Letters*, **26**, 825 (2001).

[93] T.-L. Wee, *et al.* "Two-photon excited fluorescence of nitrogen-vacancy centers in proton-irradiated type Ib diamond." *Journal of Physical Chemistry*, **111**, 9379 (2007).

[94] J. Tisler, *et al.* "Fluorescence and spin properties of defects in single digit nanodiamonds." *ACS nano*, **3**, 1959 (2009).

Résumé

Les microscopies optiques super-résolues aident à mieux comprendre certains mécanismes biomoléculaires, notamment au sein des neurones. Nous avons construit un tel microscope de type STED (STimulated Emission Depletion) pour observer des défauts azote-lacune (NV) fluorescents dans le diamant, et avons atteint une résolution de 50 nm. À plus long terme, cet instrument permettra d'étudier l'organisation macromoléculaire de protéines impliquées dans la plasticité synaptique, et marquées avec des nanodiamants (ND) fluorescents. Dans cette perspective, nous avons étudié la limite de résolution du STED pour des ND de tailles sub-longueur d'onde. Nos expériences, menées avec l'équipe de Stefan Hell (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry) ont montré que la taille du spot STED d'un NV dans un ND pouvait atteindre 10 nm, performance similaire à celle obtenue dans un diamant macroscopique. Nous pouvons aussi résoudre plusieurs centres NV dans un ND séparés de seulement $\approx$ 15 nm. Ces résultats sont en accord avec les simulations numériques faites par l'équipe de Jean-Jacques Greffet (Laboratoire Charles Fabry). En parallèle, nous avons démontré l'internalisation spontanée de ND fluorescents dans des neurones corticaux d'embryons de souris en culture primaire, et étudié leur colocalisation avec des vésicules du réseau trans-Golgi. Enfin, nous avons débuté l'étude du trafic des vésicules contenant les ND et montré qu'il dépend du réseau de microtubules. Les paramètres du mouvement sont compatibles avec ceux des moteurs moléculaires, mais nous nous attendons à ce qu'ils soient différents dans le cas de la sur-expression de protéines impliquées dans le trafic (travail en cours).

Abstract

Super resolution microscopy techniques are a useful tool to understand various biomolecular mechanisms, particularly in neurons. We have built a STED (STimulated Emission Depletion) microscope for observing Nitrogen-Vacancy (NV) fluorescent defect in diamond, and have reached a resolution of 50 nm. In the long term, this instrument will allow the study of macromolecular organization of proteins involved in synaptic plasticity and marked with fluorescent nanodiamonds (ND). In this context, we studied the resolution limit of STED for ND of subwavelength size. Our experiments, conducted with the team of Stefan Hell (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry) showed that the STED spot size of an NV in ND could reach 10 nm, which is similar to performances obtained in a macroscopic diamond. We could also resolve several NV centers, which were separated from only $\approx$ 15 nm in the same ND. These results are in agreement with numerical simulations carried out by the team of Jean-Jacques Greffet (Laboratoire Charles Fabry). In parallel, we have demonstrated the spontaneous internalization of fluorescent ND in primary culture of cortical neurons from mouse embryos, and studied their colocalization with vesicles of the trans-Golgi network. Finally, we started the study of trafficking vesicles containing ND and showed that it is related to the microtubule network. The motion parameters are compatible with those of molecular motors, but we expect them to be different in the case of over-expression of proteins involved in traffic (work in progress).