

✓ BIBLIOGRAPHIE

A. Babuty *et al.*, **Semiconductor surface plasmon sources**, *Physical Review Letters*, vol. 104, article 226806, 2010.

R. Heintzmann et M. G. Gustafsson, **Subdiffraction resolution in continuous samples**, *Nature Photonics*, vol. 3, p. 362, 2009.

E. Betzig *et al.*, **Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution**, *Science*, vol. 313, p. 1642, 2006.

L. Aigouy, Y. De Wilde et C. Fréty, **Les nouvelles microscopies : à la découverte du nanomonde**, Belin, 2006.

C. Boccara et R. Carminati, **Champ proche optique : de l'expérience à la théorie**, *Les nanosciences : nanotechnologies et nanophysique*, Belin, 2004.

J. J. Greffet et R. Carminati, **Image formation in near-field optics**, *Progress in Surface Science*, vol. 56, p. 133, 1997.

Un autre domaine d'application de la microscopie en champ proche est la réalisation d'images d'ondes évanescentes à la surface de guides d'ondes. Quand des ondes se propagent dans un prisme transparent (dont l'indice optique est supérieur à un) et subissent une réflexion totale à la surface interne de ce prisme, elles produisent des ondes réfléchies propagatives qui poursuivent leur route dans le prisme. La réflexion engendre aussi des ondes dans l'air sur la surface externe du prisme, mais ces ondes ne se voient pas : elles sont évanescentes, c'est-à-dire qu'elles déclinent rapidement à la surface du prisme sans qu'aucune composante propagative qui permettrait de les observer en se plaçant loin de la surface du prisme n'y soit associée.

Un phénomène analogue a lieu quand des ondes se propagent dans un guide d'onde diélectrique (d'indice optique supérieur à un). Les ondes propagatives confinées dans le guide se prolongent dans l'air à la surface du guide sur une distance de l'ordre d'une fraction de la longueur d'onde, sous la forme d'ondes évanescentes. Des ondes peuvent également se propager sur des surfaces métalliques et présentent dans ce cas un caractère éva-

nescent à la fois dans l'air et dans le métal. On les nomme des plasmons (polaritons) de surface. Ces ondes qui restent naturellement confinées à la surface lorsqu'elles se propagent sur une piste métallique suscitent aujourd'hui beaucoup d'intérêt, car elles devraient permettre la réalisation de nouveaux types de dispositifs d'optique intégrée. Le microscope optique en champ proche est capable de caractériser la propagation des ondes évanescentes à la surface de ces structures guidantes.

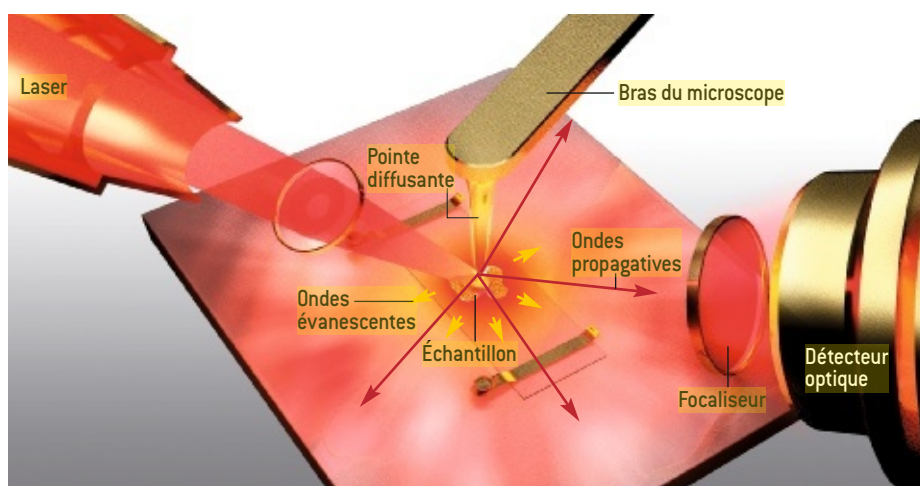
Qui plus est, le microscope optique en champ proche présente un intérêt dans des domaines situés à l'interface de la recherche fondamentale et appliquée. En 2010, nous avons observé des dispositifs laser semi-conducteurs (conçus par l'équipe de Raffaele Colombelli à l'Institut d'électronique fondamentale du CNRS et de l'Université Paris Sud), avec un microscope en champ proche fonctionnant dans l'infrarouge. Ces dispositifs produisent des plasmons à la surface du réseau métallique situé sur la cavité du laser, l'émission du laser vers l'extérieur se faisant par les deux extrémités de la cavité.

Le microscope en champ proche donne une image super-résolue des plasmons de

LE MICROSCOPE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE

Ce microscope détecte des ondes dites évanescentes, uniquement présentes à des distances de l'échantillon très inférieures à la longueur d'onde d'observation. La sonde utilisée se termine par une pointe de taille nanométrique qui réalise une cartographie du champ proche. Des translations piézo-électriques contrôlées par ordinateur déplacent la pointe avec précision. Un faisceau laser de longueur d'onde λ est focalisé sur la zone de l'échantillon où se trouve l'extrémité de la pointe, ce qui produit des ondes évanescentes près de tout objet de taille inférieure à λ se trouvant dans la zone éclairée. On balaye l'échantillon latéralement sous la pointe maintenue à une distance nanométrique de la surface grâce au dispositif d'asservissement qui agit sur sa position verticale.

L'enregistrement de la position verticale de la pointe en chaque point de la zone balayée donne une image topographique, qui rensei-



gne sur le relief de l'échantillon. Par ailleurs, les ondes évanescentes présentes à la surface de l'échantillon sont diffusées à l'extrémité de la pointe pendant le balayage. Comme elles subissent des diffusions, elles deviennent des ondes propagatives classiques, lesquelles sont collectées et focalisées sur un détecteur optique. L'enregistrement de l'inten-

sité du signal selon la position de la pointe à la surface de l'échantillon pendant le balayage fournit une image optique de l'échantillon. La résolution spatiale dépend uniquement de la taille de l'extrémité diffusante de la sonde, soit quelques nanomètres.

Différentes sondes en forme de pointe sont utilisées pour diffuser

les ondes évanescentes dans la zone de champ proche. Le choix de la sonde dépend des conditions expérimentales, telles que la longueur d'onde d'éclairage, la façon dont la lumière est collectée, etc.

Ainsi, ce microscope fournit une image topographique et une image optique de l'échantillon avec une résolution de quelques nanomètres.

Didier Florentz

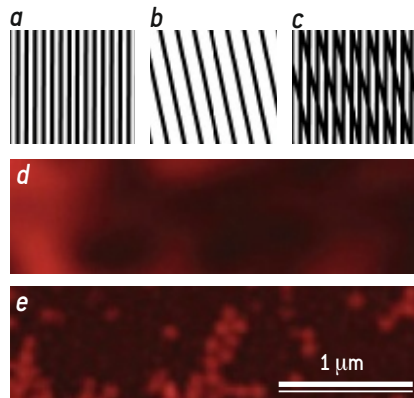
surface, alors qu'aucune lumière émise sur la cavité du laser ne peut être observée sans la sonde locale diffusante. En général, les études menées dans l'industrie pour caractériser l'émission d'un laser semi-conducteur portent sur son spectre et la qualité du faisceau qu'il produit à grande distance. L'image super-résolue que nous avons obtenue montre que le microscope en champ proche permet d'aller plus loin : en étudiant la distribution spatiale des ondes évanescentes sur la cavité du laser en fonctionnement, nous déterminons celle des ondes dans la cavité (voir la figure 3). Cette information est importante pour la fabrication de tels dispositifs.

La super-résolution en champ lointain

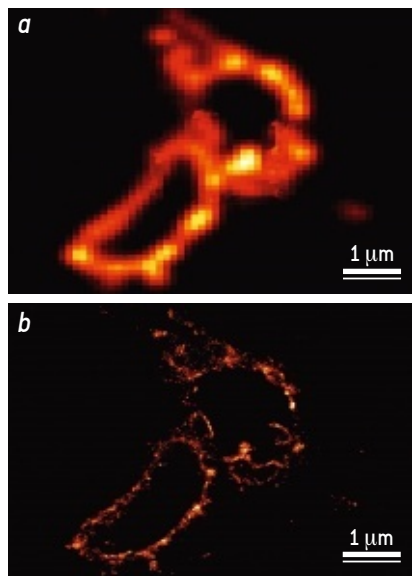
Les techniques de microscopie en champ proche sont au cœur de l'optique sub-longueur d'onde et ont donné naissance au domaine de la nano-optique. Toutefois, de récentes études ont montré que des images super-résolues peuvent être formées quand on utilise des instruments fonctionnant en champ lointain et donc limités par la diffraction, en particulier des microscopes optiques classiques. Illustrons deux principes de ces nouvelles approches, dans le cadre de l'imagerie de fluorescence.

En imagerie de fluorescence, on enregistre la distribution spatiale d'émetteurs fluorescents ou fluorophores, souvent des molécules organiques, répartis dans l'échantillon. L'imagerie en biologie étant le champ d'application privilégié de ces techniques, les échantillons sont en général des cellules ou des tissus vivants. L'intensité de la lumière fluorescente émise est proportionnelle au produit de la densité de fluorophores ($n(r)$, r étant la position du point observé dans l'échantillon) et de l'intensité incidente I_{inc} provenant de la source extérieure, un laser la plupart du temps.

Lorsqu'on forme l'image de l'intensité de fluorescence émise avec un microscope classique, la résolution est limitée à environ $\lambda/2$, où λ est la longueur d'onde de fluorescence. Une première approche pour améliorer la résolution est d'éclairer l'échantillon avec une intensité non uniforme. On parle alors de microscopie par « éclairage structuré ». Grâce au produit $n(r) I_{\text{inc}}(r)$, tout en ne détectant dans l'intensité de fluorescence que des variations spatiales supérieures à $\lambda/2$, on a accès



4. L'AMÉLIORATION DE LA RÉOLUTION en microscopie de fluorescence par éclairage dit structuré repose sur l'effet de moiré. En combinant l'objet (a) avec une illumination structurée (b), on obtient dans l'image un motif de grande période (c) qui peut être détecté par un système limité par la diffraction. En connaissant la structuration imposée à la lumière excitatrice, on retrouve à partir du motif les détails de l'objet. Ainsi, des billes fluorescentes de 50 nanomètres sont peu visibles en microscopie classique (d), mais nettes avec un éclairage structuré (e).



5. DES CELLULES produisent dans leur membrane des molécules fluorescentes – des fluorophores. En observant ces cellules en microscopie classique de fluorescence (a), on obtient une image de la distribution spatiale des fluorophores avec une résolution limitée à $\lambda/2$, λ étant la longueur d'onde de fluorescence. Pour améliorer la résolution, on utilise des fluorophores photoactivables (par une autre source de lumière), que l'on stimule à tour de rôle au cours de cycles de photoactivation. Quand une source isolée émet, on la localise avec précision en repérant le centre de la tache de diffraction qu'elle produit. Au cycle suivant, on peut localiser une autre molécule même si la distance la séparant de la précédente est inférieure à la longueur d'onde. L'image super-résolue (b) s'obtient en répétant ce processus.

à des informations sur la distribution des fluorophores à des échelles plus petites. Le principe repose sur un analogue de l'effet Moiré : en structurant l'intensité incidente à une échelle de $\lambda/2$, on gagne un facteur deux en résolution, limitée alors à $\lambda/4$ (voir la figure 4). En utilisant la réponse non linéaire des fluorophores, due à la saturation de l'émission fluorescente, on peut même aller au-delà de $\lambda/4$ et atteindre des résolutions de quelques dizaines de nanomètres.

Une autre approche consiste à former des images super-résolues en ne détectant l'émission que d'un seul fluorophore à la fois. En effet, même avec un microscope classique, on peut localiser une source unique avec précision en déterminant le maximum de la tache de diffraction produite. Même si la tache a une taille de l'ordre de $\lambda/2$, on peut localiser son maximum avec une précision inférieure à $\lambda/2$ si le rapport signal sur bruit est suffisant et si le détecteur a des pixels assez petits pour enregistrer précisément la tache de diffraction. La limite est alors contrôlée par le bruit de fond, et non par la longueur d'onde.

Mais quand l'échantillon contient un grand nombre de fluorophores, comment faire en sorte qu'un seul émette à la fois ? En 2006, deux équipes ont répondu à la question en obtenant des images super-résolues de distribution de fluorophores dans des cellules biologiques. Elles ont utilisé des fluorophores photo-activables : excités par un laser, ces particules émettent seulement quand une impulsion produite par un autre laser de longueur d'onde différente les rend actives. Si à chaque instant, une seule source émet dans une zone de taille limitée par la diffraction, on peut localiser cette source avec précision en utilisant un microscope classique (voir la figure 5). En enregistrant les positions de chaque source, on réalise une image de la distribution des fluorophores avec une résolution bien inférieure à λ . Mais la technique est limitée par la probabilité faible d'avoir deux sources émettant en même temps tout en étant séparées de moins de $\lambda/2$.

Ces nouvelles approches en champ proche et en imagerie de fluorescence permettent aujourd'hui aux scientifiques d'obtenir des images avec une résolution spatiale de l'ordre de quelques nanomètres. En imagerie optique, l'exploitation des lois de la physique sous de nouveaux angles permet encore de spectaculaires progrès...