

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Boulanger Benoit, Directeur du Laboratoire de spectrométrie Physique, de m'avoir permis d'effectuer ce stage dans le laboratoire.

Naturellement, je remercie M. Woehl Jörg, responsable du stage, de m'avoir guider dans mon travail pendant ces quatre mois. Il s'est montré constamment enthousiaste face aux résultats étranges ou habituels, ce qui m'a permis personnellement de vouloir toujours aller plus loin. Sa vision pragmatique m'a aussi beaucoup plu.

Que serait devenu mon stage sans la précieuse aide de M. Nasse Michaël, doctorant en troisième année, qui a monté le microscope confocal de ses mains et qui m'a appris son intégrale utilisation. Il a été pour moi le «second» maître de stage, qui m'a dévoilé toutes les facettes techniques. Je l'en remercie.

Je tiens à remercier M. Chevalier Nicolas, lui aussi doctorant en troisième année, pour son aide au quotidien, et qui m'a appris l'utilisation du spectromètre et du microscope en champ proche.

Je tiens à remercier M. Motte Jean-François qui a pu être présent sur mes problèmes techniques.

Je remercie toute l'équipe NOSE, dont M. Huant Serge.

A tous, je vous remercie de votre patience pour la correction de ce rapport.

1. Introduction

Ce rapport est l'aboutissement d'une collecte d'information de la fluorescence des objets nanoscopiques comme les molécules d'anthracène de 2 à 3 nm de longueur, des nanobilles de 23 nm de diamètre et des nanocristaux semiconducteurs de 4 nm de diamètre.

Le travail était effectué au sein du groupe NOSE (Nanooptique et Systèmes Electro-actifs). Le Laboratoire de spectrométrie Physique est une unité mixte CNRS-Université Joseph Fourier située sur le Campus. Il y a près de 110 permanents, comprenant des chercheurs et enseignants chercheurs, des ingénieurs et agents administratifs qui encadrent une cinquantaine de thésards, de visiteurs ou stagiaires. Les sujets de recherche sont très diversifiés, allant de la spectroscopie laser, l'optique, la RMN, la diffusion des rayons X et des neutrons aux thématiques plus récentes se situant à l'interface physique-biologie, en regroupant aussi la chimie et l'astrophysique. Il existe une forte collaboration avec d'autres institutions grenobloises telles que le LCMI, l'ILL, l'ESRF, ainsi que le CEA.

Le travail de ce stage s'inscrit dans deux cadres :

- étude de la fluorescence résolue en polarisation à l'échelle d'une molécule unique, appliquée en mode confocal à une nouvelle molécule utilisée ailleurs pour l'étude du transport électronique par une molécule individuelle.
- Développement instrumental d'un microscope optique hybride confocal / champ proche fonctionnant à basse température pour la détection et la manipulation des molécules uniques.

L'étude a été réalisée par un microscope confocal, qui a permis de réaliser des images reconstruites, des traces temporelles et, relié à un spectromètre des spectres en longueur d'onde, qui ensemble nous renseignent sur la physique de ces objets.

2. Présentation du microscope confocal

Dans ce chapitre sera présentée la technique de microscopie confocale utilisée au laboratoire de spectrométrie : une vue schématique des appareillages introduira les différents éléments essentiels du microscope.

2.1 Introduction

Deux microscopes différents s'offrent à l'étude de nos objets. L'un est un microscope optique en champ proche, ou *NSOM* (*Near Field Scanning Optical Microscope*), fonctionnant avec une pointe optique métallisée. L'autre instrument, utilisé principalement durant le stage, est un microscope confocal. Tous deux sont de conception artisanale.

Avant d'entamer leur description, il convient de préciser quels sont leurs avantages et inconvénients. La résolution des techniques optiques standard, telle que la microscopie confocale, est bornée par la *limite de diffraction*, qui fixe la distance minimale entre deux points adjacents qui sont tout juste séparables :

$$d_{min} = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$$

Ici $NA = n \sin(\theta)$ est l'ouverture numérique de l'objet diffractant (d'une lentille par exemple), n étant l'indice du milieu entre l'échantillon et la lentille et θ l'angle incident d'acceptation .

Le critère de Rayleigh définit la limite de résolution comme la distance entre deux courbes de diffraction, où le maximum de la première courbe tombe justement sur le minimum de la seconde courbe. Si on prend une ouverture numérique d'environ 1, on obtient :

$$d_{min} \approx 0,61 \lambda$$

Par conséquent, la résolution optique en microscopie NSOM se limite au diamètre de l'ouverture optique, soit en pratique 150 nm. La pointe NSOM contient une ouverture sub-longueur d'onde, ce qui implique qu'il existe à sa proximité des ondes évanescentes confinées à la surface. Il reste que la technique champ proche est une méthode délicate à mettre en oeuvre.

2.2 Vue d'ensemble du microscope confocal

Pour des raisons historiques la conception du microscope confocal dérive de celle du NSOM qui est illustré schématiquement en Annexe. Le laser utilisé pour nos expériences est un laser à ion d' Ar^+ qui possède plusieurs raies dans le visible, dont on choisit une pour exciter l'échantillon.

Le microscope confocal monté au laboratoire, dont le schéma est représenté sur la fig. 2.1, se révèle être un outil très puissant à l'observation d'objets uniques. En effet, le microscope confocal a l'avantage d'éviter le contact avec la molécule [PhT]. Cependant d'autres méthodes sont aussi envisageables (méthodes à champ large) [WEM2].

1 Le seul NSOM qui fonctionne à 4 K en France ; cf <http://nsom.online.fr>

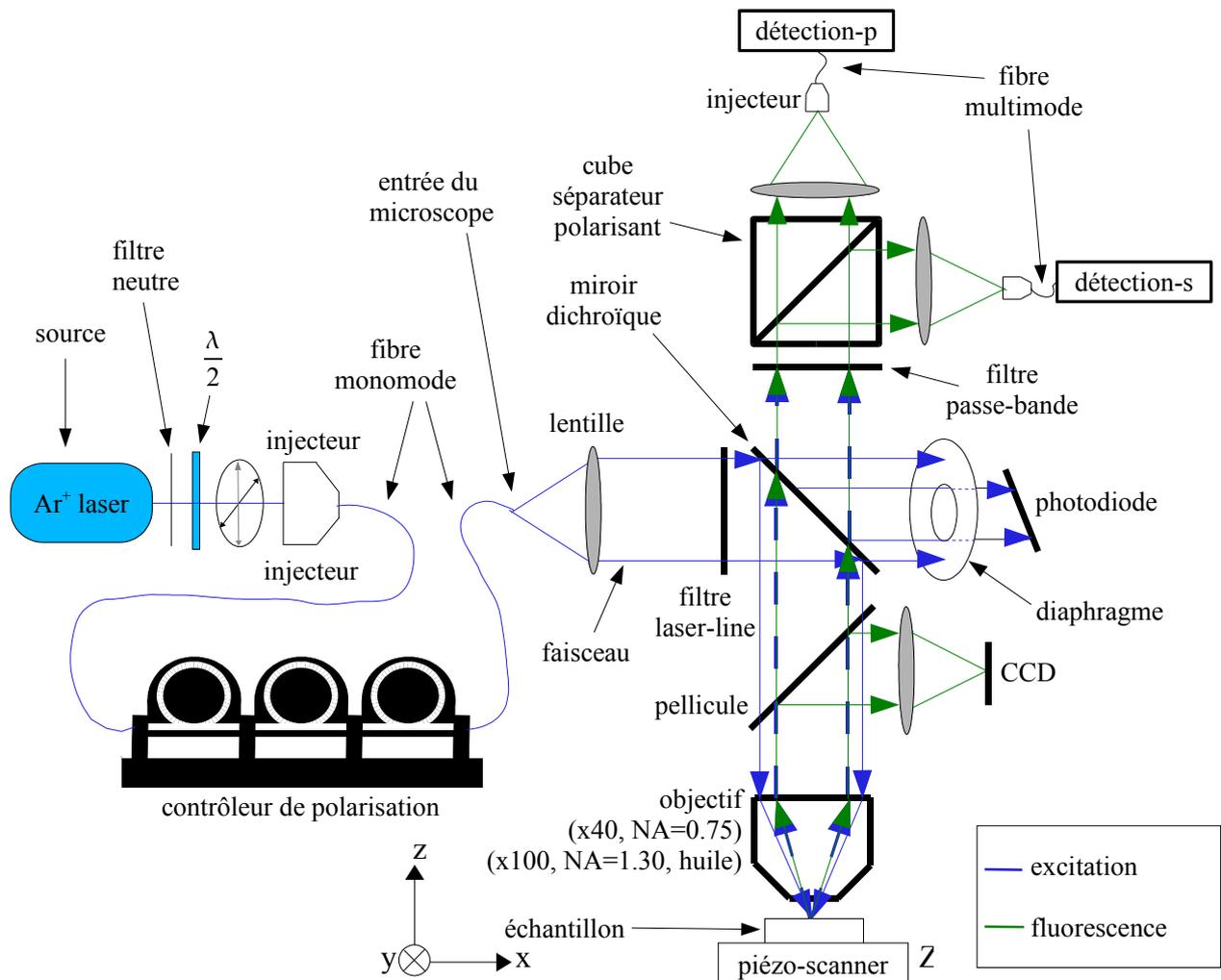


Fig. 2.1 Principe du microscope confocal contenant le cube séparateur de faisceau polarisant s et p. Une partie des expériences a été effectuée sans le cube séparateur polarisant, dans le cas contraire les polarisations s ou p sont indiquées.

La raie d'excitation la plus adaptée est celle de 458 nm pour les molécules et les nanocristaux, et de 488 nm pour les nanobilles. Ces nano-objets sont décrits plus loin (cf chap 3.1). Le faisceau laser suit un chemin optique contenant des filtres neutres, et une lame demi-onde avant d'être injecté dans une fibre monomode. Entre la source et le microscope, un contrôleur de polarisation est inséré le long de la fibre monomode, et profitant de la propriété de sa biréfringence il est possible d'adapter la polarisation de l'excitation (par ex linéaire ou circulaire). On se sert du degré de polarisation défini par :

$$P = \frac{(I_{max} - I_{min})}{(I_{max} + I_{min})}$$

où I_{min} et I_{max} sont les intensités minimales et maximales mesurées à l'entrée du microscope. Lorsque $P=0$, la polarisation est circulaire, et lorsque $P=1$ la polarisation est linéaire.

La lumière sortant de la fibre monomode est injectée dans le microscope, via une lentille, et via un filtre interférentiel *laser line* afin de filtrer la fluorescence parasite de la fibre. En effet, la

une fibre optique monomode est une fibre optique à saut d'indice créée par un dopant qui lui-même crée de la fluorescence. Les caractéristiques de la fibre monomode sont de 33 μm de diamètre pour le cœur et de 125 μm pour le manteau. La fibre est monomode entre 488nm et 515nm. En dessous de cette gamme de longueur d'onde, la fibre devient multimode, alors qu'au-dessus elle ne transporte pas la lumière.

La lentille est insérée pour rendre le faisceau parallèle. Un miroir dichroïque a pour but de réfléchir le maximum d'intensité à la longueur d'onde d'excitation en direction de l'objectif et de l'échantillon, cependant une petite partie est transmise dans la photodiode qui sert de canal de référence pour d'éventuelles fluctuations d'intensité d'excitation. Selon notre étude, il faut changer le miroir dichroïque. Une fois dans l'objectif (X40 ou X100 à immersion d'huile), le faisceau est mis au foyer de l'objectif sur l'échantillon grâce au moteur Z. Le dispositif expérimental est fait de telle sorte que pour trouver le foyer il faut faire une série d'images à différentes hauteurs à l'aide du moteur Z.

La fluorescence de l'objet et l'excitation sont collectées par l'objectif, une pellicule séparatrice de faisceau est destinée à une caméra CCD (*charge coupled device*) qui permet de se situer au foyer. Avant la détection de photons, on introduit un filtre passe-bande² destiné à laisser passer la fluorescence et à supprimer l'excitation.

La détection du signal peut s'effectuer de diverses manières selon que la fibre multimode soit branchée à :

- une photodiode à avalanche en silicium sans cube polarisant (ou APD : *avalanche photodiode*),
- deux APD, chacune est connectée à une branche du cube séparateur polarisant³, afin de voir les polarisations s et p tournées de 90°,
- un spectromètre à CCD refroidi à l'azote liquide, associé à un ordinateur d'acquisition et de traitement d'image. Il permet de déterminer le spectre des objets fluorescents.

Dans les deux cas les APD sont reliées à un compteur de photons puis l'acquisition se fait par un ordinateur. Les images de fluorescence sont obtenues en déplaçant l'échantillon par un tube scanner piézoélectrique point par point en x et y.

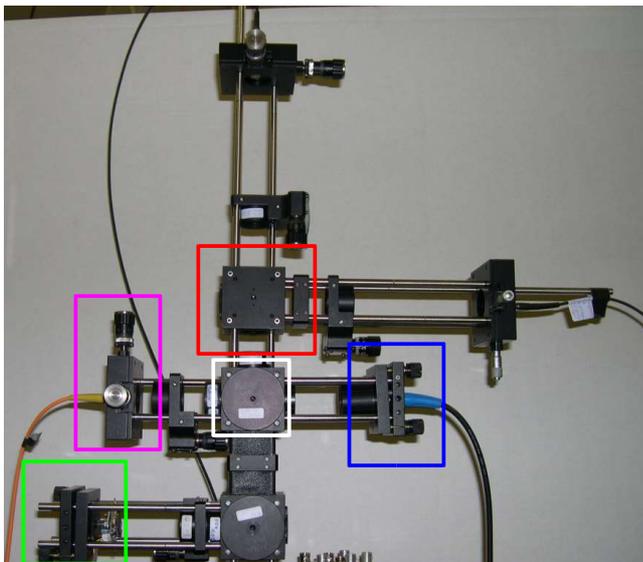
L'APD est plus sensible que le spectromètre à CCD, mais l'APD intègre sur toutes les longueurs d'ondes. La bande spectrale de détection de l'APD s'étend de 390nm à 1300nm. A titre indicatif, son efficacité quantique à 458nm est de 32%, à 488nm de 43%, à 550 nm de 60% et à 600 nm de 67%. Pour ce faire, l'APD travaille dans le mode de comptage de photon unique : elle génère un TTL par photon détecté. L'intérêt du filtre passe-bande est de rejeter la longueur d'onde de l'excitation afin de pouvoir détecter le signal de fluorescence étant très faible devant l'excitation. On utilise pour cela un filtre passe-bande de densité optique d'au moins de 6 (OD6). Selon l'objet étudié le filtre sera différent. Pour les molécules on utilise une gamme passe-bande de 470 nm à 560 nm, pour les nanocristaux de 540 nm à 620 nm, et pour les nanobilles de 500 nm à 590 nm.

Les fig. 2.2 a) et b) illustrent respectivement le microscope entier, sans l'objectif qui est au-dessous, et le module de déplacement nanométriques (scanneur piézoélectrique). Les moteurs X, Y ou Z sont alimentés par une boîte de contrôle qui décharge une pulse de tension en dent de scie. Selon que l'on veuille descendre ou monter l'échantillon, la dent de scie est inversement symétrique. Durant mon stage, j'ai dû calibrer le moteur Z, c'est à dire que lors de la recherche du foyer (en Z) on

² Filtre de bonne qualité OD6 (densité optique) à la longueur d'onde d'excitation.

³ Cube polarisant séparateur de faisceau à large bande, 450-680 nm, 25.4 mm de côté.

souhaite connaître la distance parcourue lors d'un pulse de courant (Typiquement 100 nm par pulse). Le tube scanneur X et Y est alimenté par une unité de contrôle, c'est lui qui balaye dans le plan X et Y pour effectuer une image. Le phénomène de dérive vu plus loin (cf fig. 3.3.10), provient que si le tube est trop contraint (c'est à dire par exemple trop loin de sa position d'équilibre) alors sa réponse devient mauvaise.



a)



b)

Fig. 2.2 Photographies des appareils du microscope confocal

a) Vue d'ensemble des éléments du microscope. Carré rouge : cube polarisant. Carré bleu : photodiode. Carré vert : caméra CCD. Carré magenta : entrée du microscope. Carré blanc : miroir dichroïque. L'objectif qui est au-dessous n'est pas visible.

b) Module de déplacement : au sommet, l'échantillon, juste au-dessous, le scanneur piézoélectrique, en bas, les moteurs nanométriques X, Y et Z.

3. Résultats des études par fluorescence au microscope confocal

Dans ce chapitre seront présentées les expériences utilisées pour l'étude de la fluorescence des objets : l'absorption, l'imagerie, les traces temporelles et la spectroscopie. Grâce à ces techniques, de nombreuses informations fondamentales peuvent être extraites des objets, telles que le moment dipolaire, la durée de vie d'un état excité, sa section efficace.

L'étude de l'absorption est à la base du choix de la raie excitatrice de l'objet à fluorescer. Pour avoir un bon rendement en fluorescence, il faut que les molécules absorbent le plus possible la lumière d'excitation. L'appareil qui mesure le spectre d'absorption est un spectrophotomètre.

L'imagerie consiste à balayer l'échantillon grâce au scanner X et Y, l'objectif restant fixe. L'image est une reconstitution de pixels représentant le nombre de photons détectés par seconde. Il faut que la taille du pixel soit plus petite que la taille du spot qui éclaire l'échantillon au risque de passer à côté d'un objet. Tous les objets seront visualisés dans la limite de résolution.

L'autre moyen d'étudier la fluorescence de nos objets est de faire une trace temporelle. Une trace temporelle est une acquisition continue de photons d'un objet fluorescent sur une durée que l'on choisit, sans balayage donc à une position fixe de l'échantillon par rapport à l'objectif. La trace temporelle résultante montre le nombre de photons détectés par unité de temps en fonction du temps. Un trait de caractère des molécules est le « clignotement », c'est à dire que pendant le cycle de fluorescence, l'électron reste dans un état non-radiatif pendant une durée relativement longue comparée à un cycle d'absorption-émission.

Cependant, une information supplémentaire sur l'orientation du moment dipolaire peut être déterminée si l'on dispose d'un cube polarisant. Le cube va séparer le faisceau entrant dans ses deux composantes de polarisation s et p. Si le moment dipolaire projeté à la surface de l'objet est parallèle à la diagonale du cube, les traces temporelles devraient être identiques en amplitude⁴, par contre si l'un des deux spectres est quasi-nul alors cela signifie que le moment dipolaire est parallèle à un côté du cube.

La spectroscopie de fluorescence d'objets uniques met en évidence de manière claire les niveaux d'énergies, ce qui expérimentalement relève beaucoup de difficultés pour les molécules uniques du fait de leur faible puissance de fluorescence.

3.1 Descriptions des échantillons

Divers objets ont été étudiés à l'aide du microscope confocal, des molécules dérivées de l'anthracènes, des nanocristaux et des nanorods de CdSe entourés de ZnSe qui ont la particularité d'être utilisés comme des nanosources à grande efficacité quantique, et des nanobilles faites en polystyrène dopées de centaines de molécules fluorescentes.

⁴ Chaque canal de détection possède une différence d'efficacité d'origine purement expérimentale, provenant d'une différence d'injection des faisceaux, des fibres multimodes et des APDs.

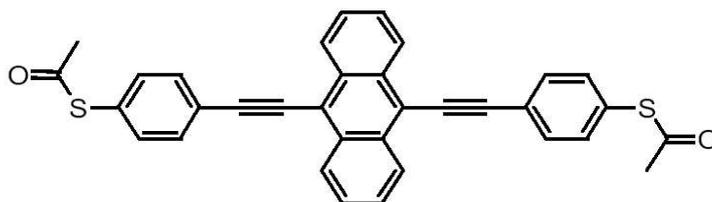


Fig. 3.1.1 Molécule symétrique 9,10-Bis((2'-para-mercaptophényl)-éthynyl-anthracène) synthétisées par l'Institut für Nanotechnologie au Forschungszentrum Karlsruhe en Allemagne contenant un groupement d'anthracène au centre.

3.1.1 Molécule dérivée de l'anthracène

Les molécules symétriques dérivées de l'anthracène de la fig. 3.1.1, ont été synthétisées pour la première fois dans le but d'étudier les propriétés électroniques grâce à une méthode appelé « break junction ». Chacune des extrémités de la molécule en contact avec une électrode en or est soumise à une différence de potentiel, l'étude du courant informe sur les niveaux d'énergies électroniques. La distance des électrodes est ajustable. Notre étude apporte un complément sur la physique de cette molécule.

La préparation des échantillons nécessite une tournette (spin-coater), de polyméthylméthacrylate (PMMA) en solution de toluène contenant les molécules en concentration connue⁵ et un substrat de verre préalablement nettoyée évitant ainsi la présence de toutes molécules organiques. Le substrat de verre est passée dans l'isopropanol chauffé à 60°C puis agité par ultrasons. Un frottement avec papier optique contenant de l'isopropanol puis de l'acétone a été effectué. Le traitement final consiste à traiter à l'ozone la surface de verre qui ainsi est rendue propre et hydrophile.

La tournette permet le dépôt des molécules dans la matrice polymérique de PMMA en évaporant le toluène. Les molécules sont piégées dans une matrice de PMMA qui permet d'une part d'augmenter la durée de vie de la fluorescence car la matrice limite la photooxydation en protégeant les molécules de l'atmosphère (encapsulation), et qui d'autre part diminue les degrés de liberté tels que la rotation et la courbure. Une concentration typique est de 10^{-9} mol/L d'objets fluorescents, ce qui correspond à peu près à 500 molécules sur $100\mu\text{m}^2$. Le PMMA ne fluorescence que très peu et la couche finale a une épaisseur de 20 nm environ.

Les molécules possèdent des niveaux d'énergies moléculaires comme illustré sur la fig. 3.1.2 qui est dans une première approche un schéma simplifié. Cette figure est à la base de la compréhension des cycles absorption-émission. S_0 représente le niveau le plus haut occupé par des électrons délocalisés (appelé HOMO : *highest occupied molecular orbital*). Sous une excitation, un électron de *spin up* ou *down* va transiter du niveau S_0 vers un niveau excité S_1 (appelé LUMO : *lowest unoccupied molecular orbital*) conservant l'état up ou down. Plusieurs possibilités s'offrent à l'électron, soit il transite vers S_0 en conservant son spin et en émettant un photon, soit il transite vers T_1 en inversant son spin et en n'émettant pas de lumière. T_1 est appelé état triplet du fait de l'existence de deux spins de même direction, un dans T_1 et un dans S_0 . Le passage vers le niveau T_1 est non radiatif et l'électron peut rester quelques μs sur T_1 [CGH]. Ce cycle permet entre autre d'expliquer le clignotement de la fluorescence de la molécule. Sachant que la durée de vie de l'électron est de quelques ns sur S_1 et de quelques μs sur T_1 , alors il est facile d'imaginer que la molécule n'émette rien pendant ce μs ce qui conduit à l'effet de clignotement. Cette durée de non-

⁵ Typiquement une solution contient 7,44 mg/mL de PMMA, $2,6 \cdot 10^{-9}$ mol/L de molécules d'anthracène et 7 mol/L de toluène.

radiation peut être extraite de la trace temporelle par un calcul d'autocorrélation. Le nombre de cycle limite est d'environ plusieurs millions avant photoblanchiment⁶ selon la molécule.

Un spectre d'absorption-émission de cette molécule dans une solution de chloroforme à $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L sur la fig. 3.1.3 a été effectué par des collaborateurs américains. Il présente plus précisément l'absorption (trait bleu) et l'émission (trait rouge) qui ont une symétrie autour de 480 nm.

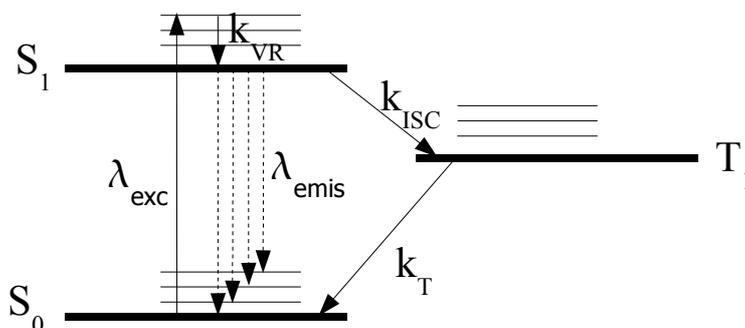


Fig. 3.1.2 Représentation schématique des niveaux d'énergie électronique pour des études optiques de molécule unique. S_0 est le niveau le plus haut occupé par des électrons délocalisés, S_1 est le premier niveau occupé, T_1 est l'état triplet le plus bas, le pompage de photons à la longueur d'onde λ_{exc} excite la transition S_0 à S_1 . Le taux de production intermédiaire est k_{ISC} , le taux de descente est k_T .

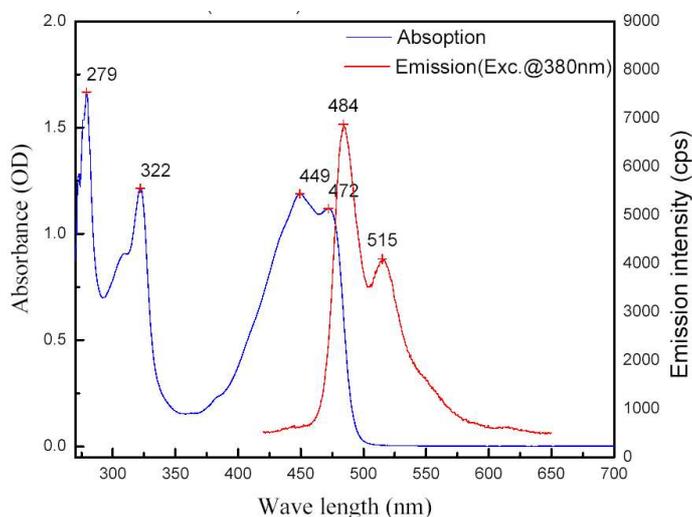


Fig. 3.1.3 Spectre d'absorption-émission de la molécule dérivée de l'anthracène à $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L dans une solution de chloroforme effectué par des collaborateurs de l'Université de Californie Riverside.

3.1.2 Nanobilles

Les nanobilles ont une forme sphérique de diamètre d'environ 23 nm contenant des centaines de molécules fluorescentes, la matrice de polystyrène formant la bille confine les molécules. Cette matrice réduit la photooxydation, en augmentant la durée de vie. Du fait de la centaine de molécules

⁶ Perte définitive de la fluorescence due par exemple à une photooxydation.

présentes, la bille a tendance à fluorescer beaucoup plus longtemps qu'une molécule individuelle. Ces billes contiennent des molécules dérivées de la rhodamine 6G et sont stockées dans de l'eau à $\text{pH} = 11$ (NaOH rajouté). Leur dépôt consiste à poser une goutte sur une surface de PMMA sur un substrat de verre propre, et de laisser évaporer l'eau, de cette manière les billes sont simplement posées à la surface. Cette technique est cependant peu reproductible en homogénéité.

3.1.3 Nanocristaux semiconducteurs

Les nanocristaux sphériques et les nanorods (nanocristaux allongés), illustré par des images au microscope électronique à balayages sur la fig. 3.1.4 a) et b), sont utilisés dans notre laboratoire en NSOM pour développer des nanosources fixées au bout de la pointe métallique [NC]. L'étude en microscopie confocale permet la première caractérisation de l'échantillon en champ lointain. Les nanocristaux sont synthétisés par une méthode organo-métallique [PR] et sont homogènes en taille de 4 nm de diamètre de cœur CdSe et 1 nm d'épaisseur de manteau de ZnSe, avec cependant une faible dispersion en taille, tandis que les nanorods ont une direction de croissance privilégiée, et se trouvent en surépaisseur de ZnSe selon la direction de croissance [LM]. Les nanocristaux sont déposés sur une lame de verre par tournette et sont insérés dans une matrice de PMMA de 100 nm à 200 nm d'épaisseur.

Les nanocristaux semiconducteurs de CdSe ont été préparés comme sonde fluorescente dans des diagnostics biologiques. Comparés aux fluorophores conventionnels, ils ont l'avantage d'avoir un spectre d'émission symétrique et d'être photochimiquement stable [BMJr].

La physique des nanocristaux est différentes des molécules, l'absorption d'un photon crée une paire électron-trou appelé exciton [MB]. L'électron se trouve dans un état excité au $N^{\text{ième}}$ niveau, puis cet électron est relaxé de manière non-radiative (par l'intermédiaire de phonons) dans des états excités de plus basse énergie avant de retomber à l'état fondamental en émettant un photon (phénomène de luminescence). La recombinaison de cet exciton ne se fait pas instantanément [MGB]. Cette relaxation par les phonons est plus rapide que la relaxation immédiate de l'électron du état excité vers l'état fondamental avec émission de photon. La raie de photoluminescence est donc observée à plus basse énergie (plus haute longueur d'onde) que le pic d'absorption. Le CdSe se prête bien à ces études [KTS]. Les nanorods ont une « dimension » (leur longueur) en plus dans leur boîte quantique, ce qui les distinguent en terme de niveaux d'énergies [HH].

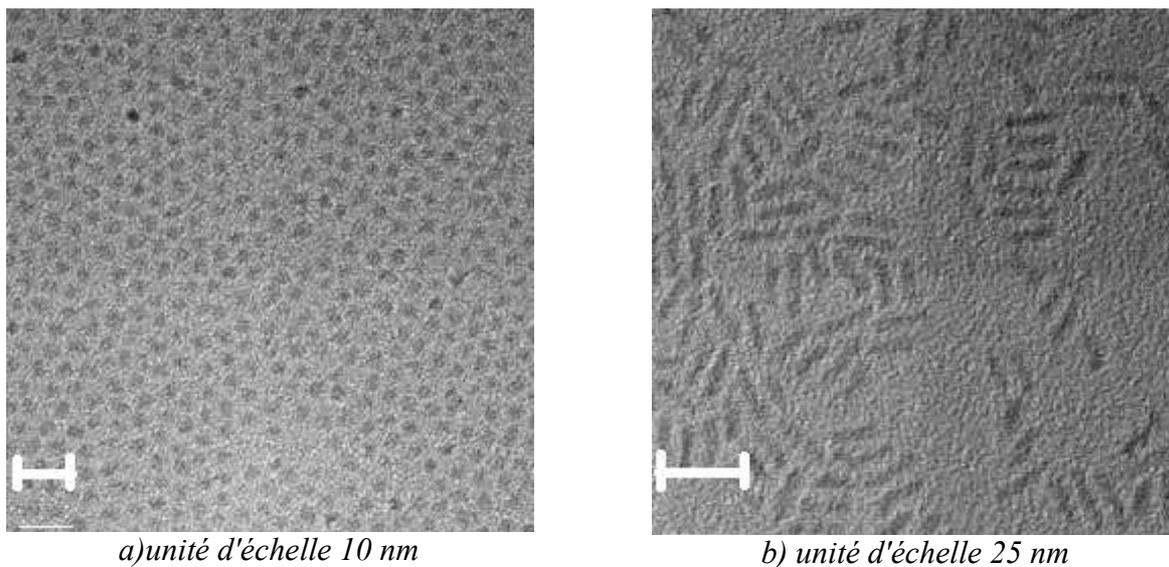


Fig. 3.1.4 Images prises au microscope électronique à balayage de nanocristaux de CdSe encapsulé par du ZnSe.

a) Sphériques.

b) Nanorods, leur forme allongé est très visible.

Pour tous les objets cités précédemment, le choix de l'échantillon est fait de telle sorte que la densité d'objets par unité de surface ne soit pas supérieure à la limite de résolution de l'objectif, à titre indicatif l'objectif à huile X100 ne résout pas les objets distants de 300 nm, il ne faut donc pas plus d'un objet par $(300\text{nm})^2$.

3.2 Absorption et section efficace de la molécule dérivée de l'antracène

Une série de mesures d'absorption à différentes concentrations a été effectuée, voir fig. 3.2.1 sur les molécules dérivées d'antracène.

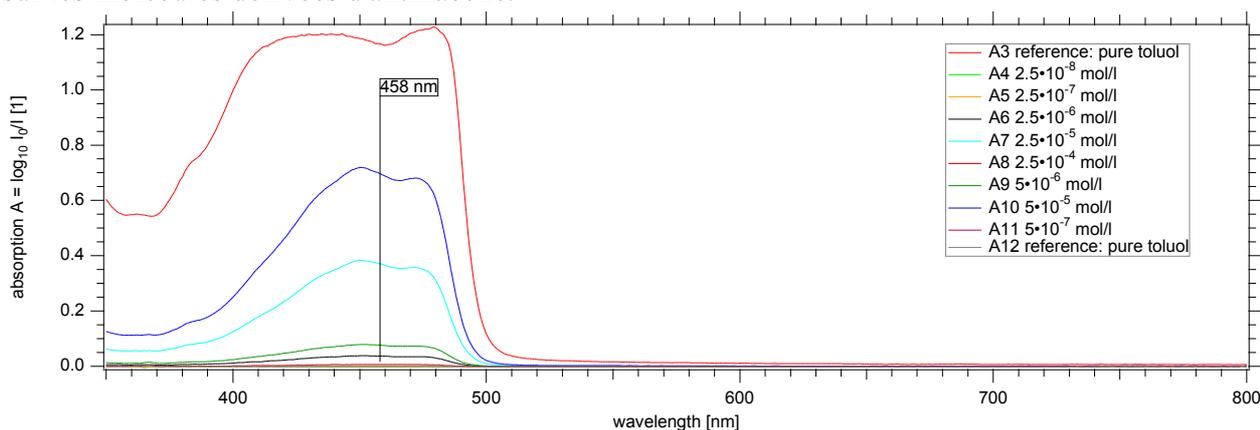


Fig. 3.2.1 Spectre d'absorption de la molécule dérivée d'antracène à différentes concentrations en fonction de la longueur d'onde (nm) d'excitation, réalisé par un spectrophotomètre.

Cette mesure est faite à partir d'un spectrophotomètre qui mesure l'absorption relative déterminée par la relation suivante :

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) ,$$

où I_0 est l'intensité du faisceau incident et I est l'intensité transmise. De plus, l'expression de Beer-Lambert, qui est une approximation du premier ordre, est donnée par :

$$I = I_0 \exp(-\alpha C x) ,$$

où C est la concentration de la solution, α le coefficient d'absorption et x l'épaisseur de la cuvette contenant la solution.

Partant d'une solution mère à $5.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, une série de dilutions a été effectuée, dans le but de faire varier le facteur de concentration C dans l'expression de l'absorption A , qui se déduit des deux expressions précédentes égale à :

$$A = \log_{10}(\exp(\alpha C x)) = \frac{(\alpha C x)}{\ln 10} .$$

Connaissant l'épaisseur de la cuvette x , il suffit de tracer A à la longueur d'onde de 458 nm (raie du laser Ar^+), mesurée par le spectrophotomètre en fonction de C , illustrée sur la fig. 3.2.2, afin de déterminer le coefficient d'absorption α , par ajustement linéaire. On trouve finalement une valeur de : $\alpha = 32361.10^5 \pm 454.10^5 \text{ mm}^2 . \text{mol}^{-1}$.

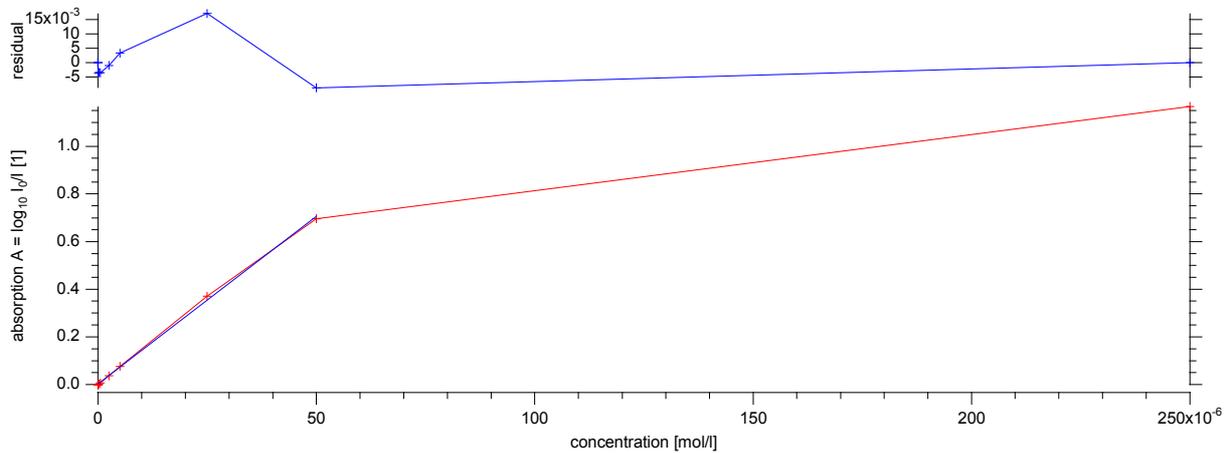


Fig. 3.2.2 Courbe rouge : absorption relative A en fonction de la concentration en mol/L, trait bleu correspondant à l'ajustement (fit linéaire).

Courbe bleue : résidus de l'ajustement.

Une grandeur microscopique reliée au coefficient d'absorption est la section efficace de la molécule qui correspond à la surface de la molécule qui absorbe efficacement tous les photons incidents. Elle est déterminée par le rapport du coefficient d'absorption α et du nombre d'Avogadro N_A comme suit:

$$\sigma = \frac{\alpha}{N_A} = 5,374.10^{-17} \pm 7,5.10^{-19} \text{ cm}^2$$

pour notre molécule d'anthracène. Typiquement, la section efficace s'exprime en cm^2 et est par exemple égale à $3,8.10^{-16} \text{ cm}^2$ pour la rhodamine 6G à 530 nm.

3.3 Imagerie et traces temporelles d'objets uniques

Ce chapitre constitue la plus grande partie du travail expérimental réunissant 1290 images et 193 traces temporelles effectuées pendant mon stage. Un choix judicieux d'images et de traces temporelles a été effectué pour mettre en avant des phénomènes de blanchiment, de clignotement et d'effet de polarisation.

Pour chaque objet étudié (molécules d'anthracène, nanobilles, nanocristaux et nanorods), des séries d'images ont été effectuées que ce soit en détection simple ou en détection polarisée-s et polarisée-p. La détection polarisée a pour but de mettre en évidence la projection du moment dipolaire de transition sur le plan de la surface éclairée qui, a priori, devrait être nulle sur les nanobilles et les nanocristaux qui sont à géométrie sphérique, et non nulle sur les molécules d'anthracène et les nanorods [LsL].

L'une des premières préoccupations pour détecter la fluorescence d'objets uniques est savoir quelle puissance laser faut-il leur fournir ? La mesure de la puissance laser se fait à l'entrée du microscope et notre mesureur de puissance ne peut pas détecter une puissance inférieure à 1 nW. De plus, la puissance nécessaire pour avoir un taux de fluorescence correct sur le détecteur peut varier. Typiquement avec l'objectif x40 et les molécules d'anthracène, il faut une puissance de 10 μW à l'entrée du microscope, avec l'objectif x100 à huile et les nanobilles 3 nW suffisent à la détection pour ne pas saturer l'APD.

Le phénomène appelé photoblanchiment se manifeste par l'extinction définitive de la fluorescence de la molécule, qui trouve plusieurs origines selon l'objet considéré. Sur la fig. 3.3.1 est illustrée une zone contenant des événements visibles de photoblanchiment de molécules d'anthracène sous une densité d'excitation⁷ de $D=4,2 \mu\text{W} * f=1780 \text{ W} . \text{cm}^{-2}$ et polarisée avec un degré de polarisation de $P=0,96$ (cf. chap.2.2). La taille de l'image est de 8 μm x 8 μm et le nombre de pixel de 128 x 128. L'objectif utilisé est un X100 à huile d'ouverture numérique égale à 1,3. Le temps d'acquisition est de 3 ms par pixel, cependant le pixel affiché ramène le nombre de photons détecté par seconde. On peut remarquer que le photoblanchiment a lieu sur la partie inférieure de l'objet, cela s'explique par le fait que l'image est effectuée par un balayage en ligne de haut en bas.

Le phénomène de photoblanchiment est un problème qu'il faut pouvoir limiter, c'est à dire qu'il faudrait pouvoir allonger la durée de fluorescence. La fig. 3.3.2 b) montre une trace temporelle d'une molécule unique d'anthracène, trois paliers sont visibles sous une densité d'excitation de $D=737 \text{ nW} * f=313 \text{ W} . \text{cm}^{-2}$. Le faisceau a un degré de polarisation de $P=0,96$.

Le premier palier (1) étant l'acquisition sans faisceau laser, les coups visibles correspondent aux coups dans le noir provenant de la lumière ambiante résiduelle⁸. Le second palier (2) manifeste la fluorescence lorsque le laser est activé sur la molécule unique, cependant ce palier s'arrête brusquement marquant le photoblanchiment de la molécule. Le palier suivant (3) correspond à l'échantillon éclairé par laser sans fluorescence, les photons détectés proviennent d'une émission d'impuretés dans le PMMA et du fait que le filtre passe-bande n'est pas parfait.

A ce stade, on peut calculer le nombre de photons *absorbés* par la molécule pendant la trace

7 Le facteur multiplicatif f tient compte de la surface du spot S éclairé sur l'échantillon en largeur à mi-hauteur et de la transmission T de l'objectif $f = \frac{T}{S}$ avec l'objectif x100 $T = 30\%$ et $S = 0,0707 \mu\text{m}^2$ et avec l'objectif x40 $S =$

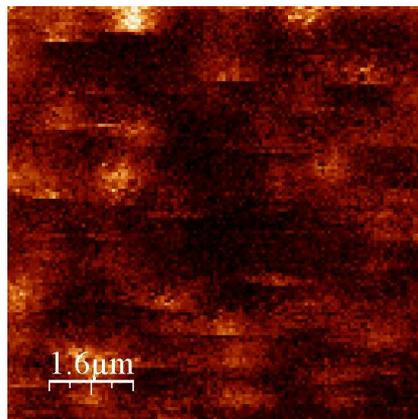
$0,503 \mu\text{m}^2$. T est faible parce que notre faisceau ne rentre pas complètement dans la pupille de l'objectif.

8 Même si l'expérience se fait dans l'obscurité, il reste toujours un bruit d'origine électronique.

temporelle de la fig. 3.3.2 b), en sachant que le nombre de photons est égal à $N(t_{\text{abs}}) = (\sigma D \lambda t_{\text{abs}}) / (hc)$, où σ est la section efficace (calculée cf. chap 3.2), D la densité d'excitation, λ la longueur d'onde utilisée (ici $\lambda = 458 \text{ nm}$), h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière et t_{abs} (ici $\approx 60 \text{ s}$) le temps de fluorescence de la molécule, on trouve finalement $N \approx 2.327.400$ photons.

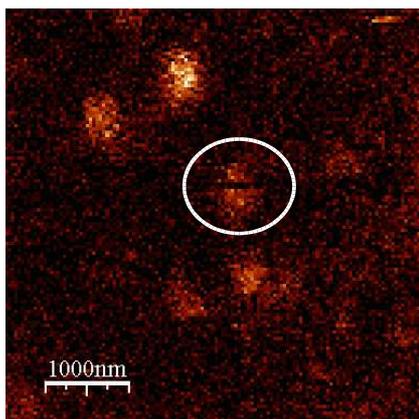
Pour faciliter leur visualisation, les traces temporelles ont été moyennées sur des fenêtres de 0.1 ms (*binning* : mettre en paquets), pour diminuer le nombre de points. Sur une trace temporelle à un canal (sans cube polarisant), il y a un point tous les $22 \mu\text{s}$, et sur deux canaux (avec cube polarisant) tous les $33 \mu\text{s}$.

D'autres objets possèdent la caractéristique du photoblanchiment dans le cas d'un nanocrystal et d'un nanorod, il est difficile dans leur cas de distinguer le photoblanchiment d'un clignotement long.

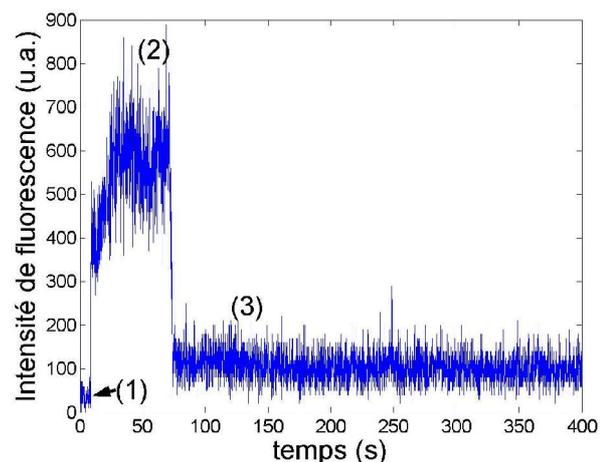


(mka527.sm2)

Fig. 3.3.1 Image de fluorescence de molécules individuelles d'anthracène. Balayage de droite à gauche et de haut en bas. Format $(8 \mu\text{m})^2$, 128×128 pixels, 3 ms d'intégration par pixel. Densité d'excitation $D = 1,78 \text{ kW/cm}^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P = 0,96$.



a) (mka453.sm2)



b) (mka093.dat)

Fig. 3.3.2 Molécules individuelles d'anthracène. Densité d'excitation $D = 313 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P = 0,96$.

a) Image à balayage de fluorescence. Format $(5 \mu\text{m})^2$, 128×128 pixels, 4 ms d'intégration par pixel.

b) Trace temporelle de l'objet entouré en blanc. Durée totale 400 s .

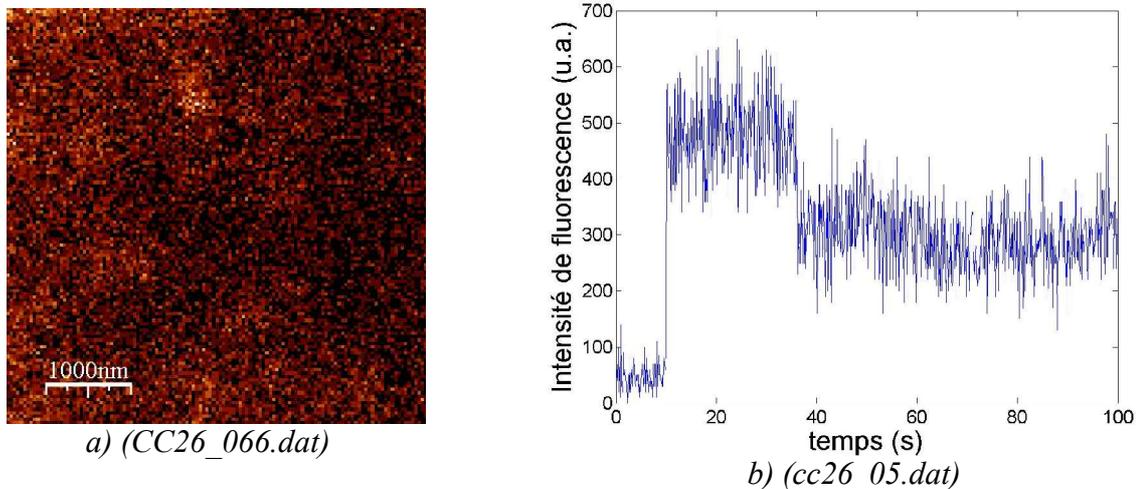


Fig. 3.3.3 Nanorod de CdSe. Densité d'excitation $D=224,9 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P=0,9$.

a) Image de luminescence.

b) Trace temporelle lors de son photoblanchiment ou d'un clignotement long. Durée totale 400 s.

Les fig. 3.3.3 et 3.3.4 montrent respectivement, le clignotement long ou le blanchiment, d'un nanorod et d'un nanocrystal.

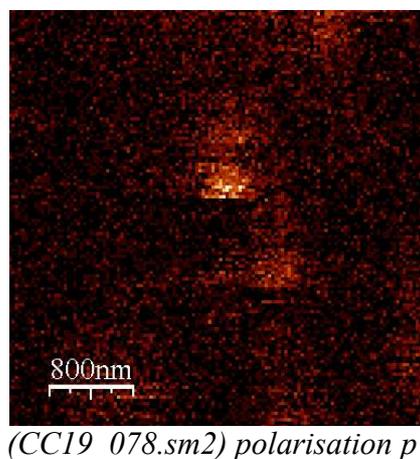
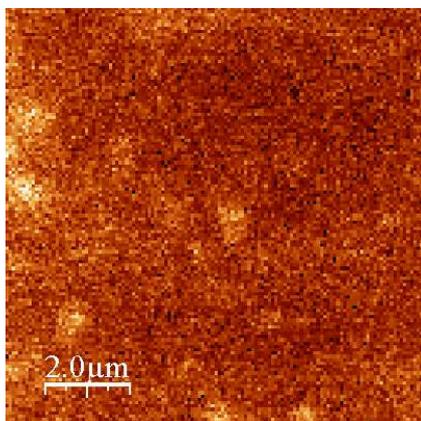


Fig. 3.3.4 Image de luminescence d'un nanocrystal de CdSe lors de son clignotement long ou photoblanchiment (visualisation en polarisation p). Format $(8\mu\text{m})^2$, 128×128 pixels, 2 ms d'intégration par pixel. Densité d'excitation $D=153,6 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P=0,96$.

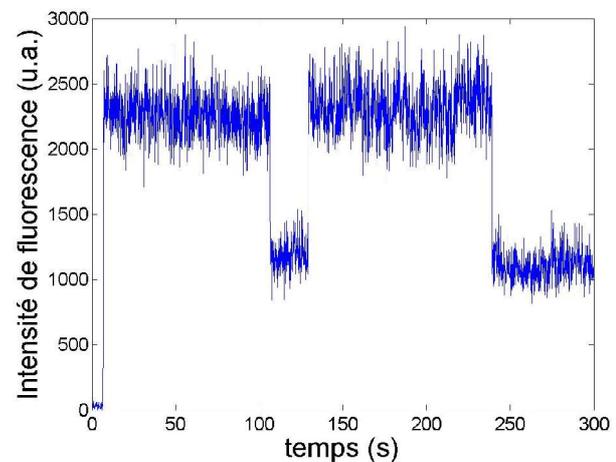
En résumé, il faut trouver le compromis entre peu de puissance qui génère un signal de fluorescence non détectable et trop de puissance qui blanchisse rapidement l'objet étudié.

Le clignotement renseigne sur les passages entre les niveaux électroniques de la molécule observée. La fig. 3.3.5 a) représente une image d'une molécule de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthyl-indocarbocyanine perchlorate (diI-C18), qui est un colorant commercial de type cyanine. Cette molécule a une grande section efficace et une bonne efficacité quantique, c'est

pour cela que l'on l'illustre. La fig. 3.3.5 b) est une trace temporelle de la molécule de diI-C18,, le clignotement se manifeste par un palier d'extinction de 20 secondes.



a) (dii116.sm2)



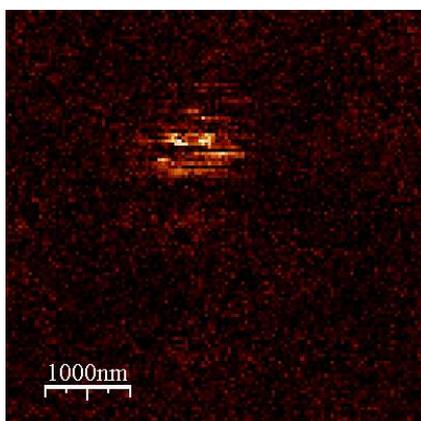
b) (dii012.dat)

Fig. 3.3.5 Molécule unique de diI-C18. Objectif $\times 40$. Puissance entrée microscope $P=13 \mu W$.

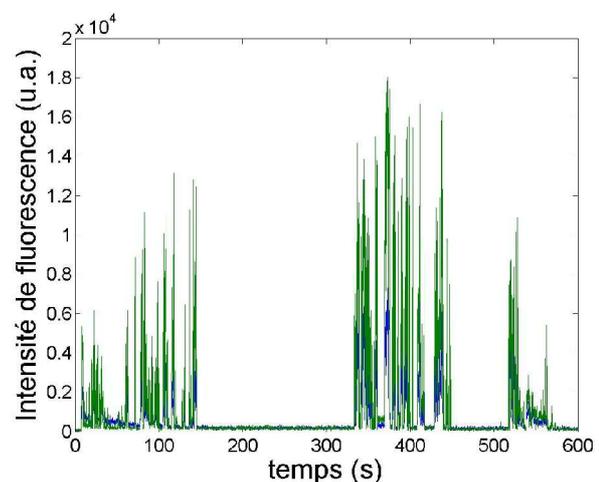
a) Image à balayage de fluorescence.

b) Trace temporelle. Durée totale 300 s.

Les molécules ne sont pas les seuls objets à clignoter, la fig. 3.3.6 a) illustre le clignotement d'un nanorod, le balayage est effectué de droite à gauche et de haut en bas. La fig. 3.3.6 b) illustre le clignotement d'un nanorod par une trace temporelle où l'on aperçoit des pauses sans émission séparées par des zones d'émissions.



a) (CC26_003.sm2)



b) (CC26_01.dat)

Fig. 3.3.6 Nanorod de CdSe. Densité d'excitation $D=90,8 W/cm^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P=0,9$.

a) Image de luminescence lors de son clignotement. Format $(4\mu m)^2$, 128×128 pixels, 3 ms d'intégration par pixel. Polarisation p.

b) Trace temporelle lors de son clignotement avec les polarisation s (bleue) et p (verte) superposées. Durée totale 600 s.

Le cube séparateur polarisant permet, à l'aide de deux APDs de séparer des photons selon deux polarisations différentes. Ces deux canaux sont traités simultanément par l'ordinateur, soit pour faire deux images de la même zone illustrées sur la fig. 3.3.7, soit pour acquérir deux traces temporelles simultanément, illustrées sur la fig. 3.3.8 a) et b). Les fig. 3.3.7 montre des objets selon une direction de polarisation, c'est pour cela qu'en polarisation s on voit des objets n'apparaissant pas en polarisation p. Les cercles blancs illustrent des objets présents sur une image et pas sur l'autre.

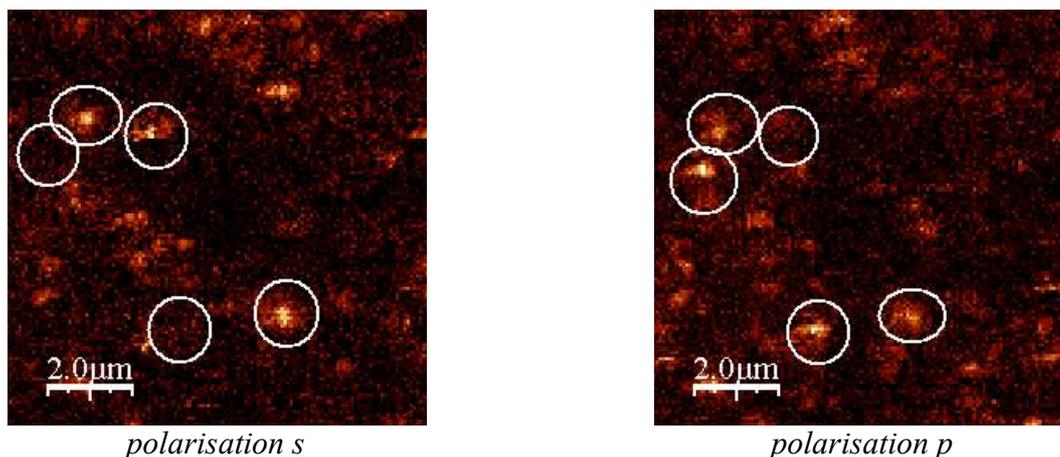
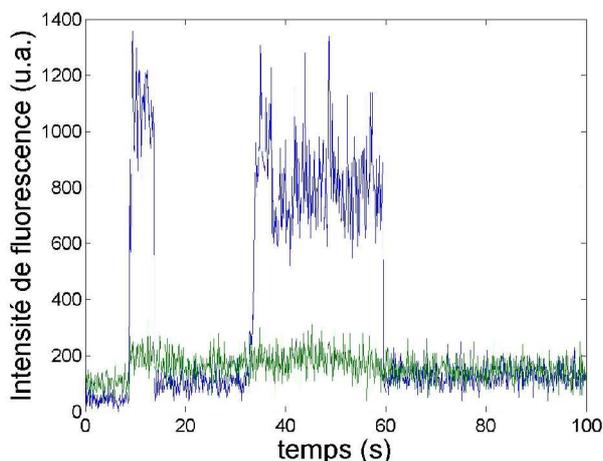


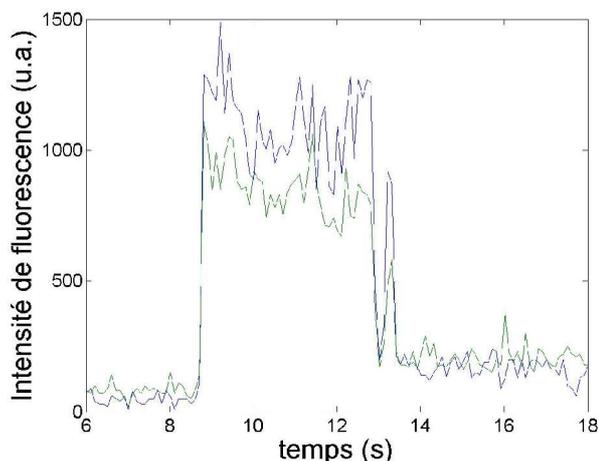
Fig. 3.3.7 Image de fluorescence de molécules d'anthracène lors de leur clignotement. Format $(10\mu\text{m})^2$, 128×128 pixels, 3 ms d'intégration par pixel. Densité d'excitation $D=148,5 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation circulaire $P=0,06$. (mka696.sm2)



a) (mka118.dat)

Densité d'excitation $D=205.3 \text{ W/cm}^2$.

Polarisation d'excitation linéaire $P=0,9$



b) (mka135.dat)

Densité d'excitation $D=326.7 \text{ W/cm}^2$.

Polarisation d'excitation circulaire $P=0,0967$

Fig. 3.3.8 Traces temporelles de molécules uniques d'anthracène qui clignotent et qui photoblanchissent, le canal bleu représente la polarisation p et le canal vert représente la polarisation s.

En théorie, les nanobilles sont considérées comme des objets scalaires, c'est à dire que leur moment dipolaire ne doit pas faire apparaître une différence entre les canaux s et p [AD]. La fig. 3.3.9 illustre deux images prises au même endroit de nanobilles en polarisation s et p, en conformité avec la théorie. De même que la trace temporelle de la fig. 3.3.10 d'une nanobille montre que les deux canaux se suivent de manière identique. Les deux traces ont une amplitude différente, cela provient de la différence d'injection dans la fibre multimode, la variation de l'amplitude provient de la lente dérive du scanneur.

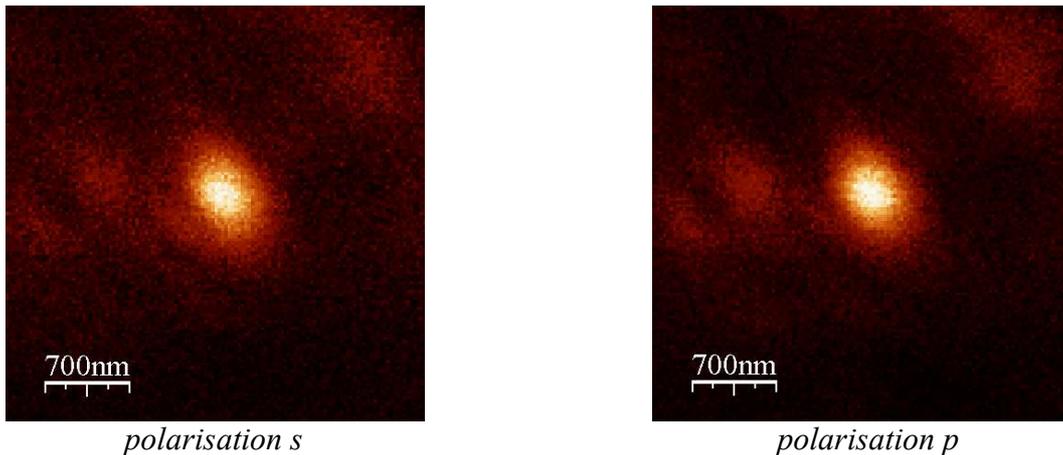


Fig. 3.3.9 Image de fluorescence d'une nanobille de 23 nm de diamètre. Format $(3,5\mu\text{m})^2$, 128x128 pixels, 25 ms d'intégration par pixel. Densité d'excitation $D=2,29 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation circulaire $P=0,11$. (20SP_145.sm2)

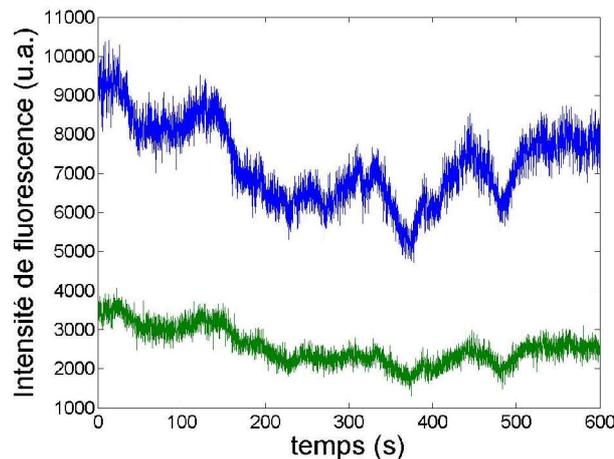
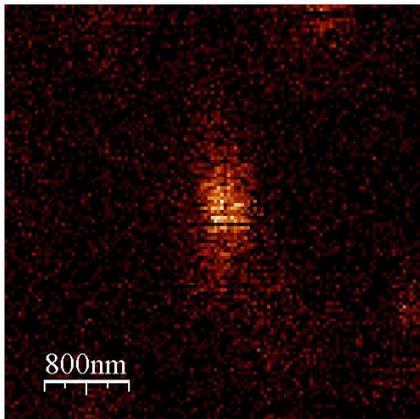
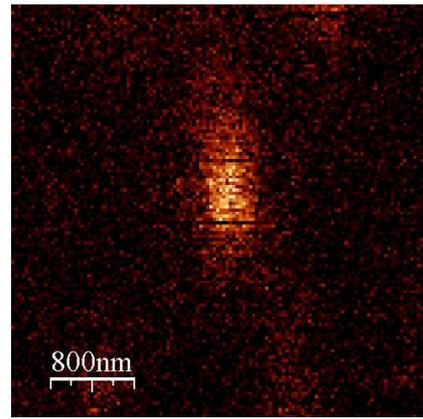


Fig. 3.3.10 Trace temporelle d'une nanobille, le canal bleu représente la polarisation p et le canal vert représente la polarisation s. Densité d'excitation $D=1,27 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation elliptique $P=0,62$. Durée totale 600 s. (20SP_005.dat)



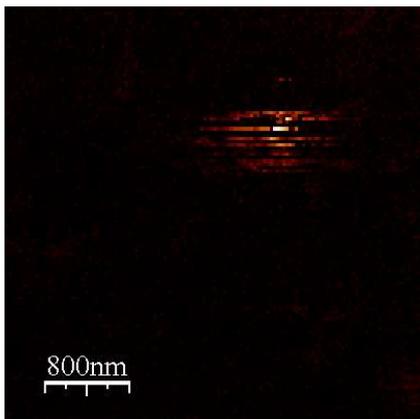
polarisation s



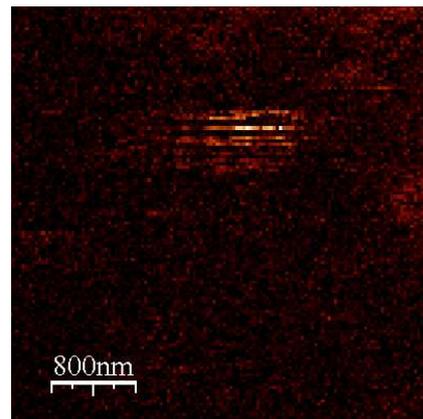
polarisation p

Fig. 3.3.11 Image de luminescence d'un clignotement d'un nanocrystal. Format $(4\mu\text{m})^2$, 128×128 pixels, 2 ms d'intégration par pixel. Densité d'excitation $D=153,6 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P=0,96$. (CC19_079.sm2)

Les nanocristaux, voir fig. 3.3.11 et fig. 3.3.13 ont quant à eux une possibilité d'orientation du moment dipolaire, grâce à leur structure cristalline surtout ceux qui ont une forme allongée (nanorods), voir 3.3.12.



polarisation s
(image 4)



polarisation p
(image 6)

Fig. 3.3.12 Images de luminescence d'un clignotement d'un nanorod. Format $(4\mu\text{m})^2$, 128×128 pixels, 3 ms d'intégration par pixel. Densité d'excitation $D=90,8 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P=0,9$. (CC26_012.sm2)

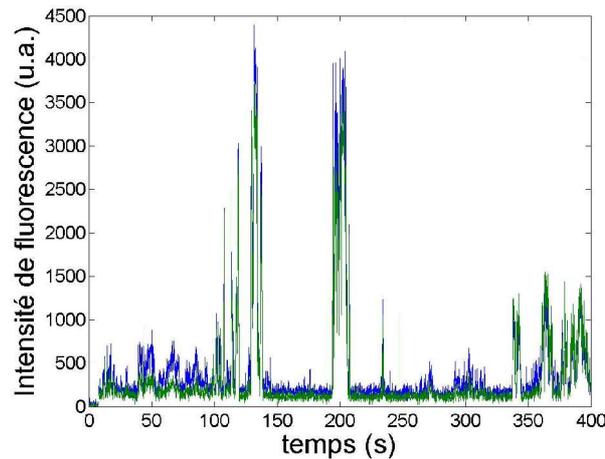


Fig. 3.3.13 Trace temporelle d'un nanocristal de CdSe, le canal bleu représente la polarisation p et le canal vert représente la polarisation s. Densité d'excitation $D=203,7 \text{ W/cm}^2$. Polarisation d'excitation linéaire $P=0,96$. Durée totale 600 s. (CC19_011.dat)

3.4 Effet de polarisation par extraction du bruit de fond

Une fois les traces temporelles effectuées pour l'étude de polarisation, il a fallu les interpréter. La fig. 3.4.2 illustre le résultat du travail de traitement de données, en haut, la trace temporelle de la fig. 3.3.8 b) est reprise, toujours avec un temps de binning égal à 0,1 seconde. Pour ce faire nous avons écrit un programme sous MatLab. On peut définir le bruit de fond pour les canaux s et p que l'on appelle bruit_s et bruit_p. Il suffit de prendre un intervalle sur l'échelle du temps où il n'y a pas de fluorescence, et on moyenne tous les points du signal compris dans cet intervalle. Si les deux canaux ont une injection strictement identique, alors les deux valeurs bruit_s et bruit_p doivent être égales, ce qui n'est jamais le cas. Pour surmonter ce problème, on procède à une renormalisation d'un des deux canaux en le multipliant par le rapport bruit_s/bruit_p, par exemple si l'on veut renormaliser le canal p sur s. Une fois la renormalisation d'un des deux canaux exécutée, il faut soustraire sur les deux le même bruit de fond, qui dans notre exemple est le bruit de fond de s (bruit_s).

Notre objet fluorescent possède un moment dipolaire, illustré sur la fig. 3.4.1, la seule partie visible est la composante parallèle à la surface de l'échantillon, donc à partir des mesures de polarisation on a accès aux deux grandeurs suivantes :

→ au module du moment dipolaire de transition projeté sur la surface de l'échantillon. L'intensité d'absorption (et donc de l'émission, polarisée dans la direction du dipôle) est proportionnelle à :

$$I \propto (\vec{\mu}_{proj} \cdot \vec{E})^2 \propto \sqrt{s^2 + p^2} \quad \text{où } s \text{ et } p \text{ sont les amplitudes sur les canaux s et p sans le bruit.}$$

→ à l'angle de la direction du moment dipolaire de transition par rapport à l'une des deux directions s ou p du cube.

Pour des raisons mathématiques on calcule l'angle en passant par $\cos(\theta) = \frac{s}{r}$ où θ est l'angle entre la direction du moment dipolaire et le canal s sans bruit, et $r = \sqrt{p^2 + s^2}$ voir fig. 3.4.1.

Si l'on reprend les équations ci-dessus, θ s'exprime comme $\theta = \arccos\left(\frac{s}{\sqrt{p^2 + s^2}}\right)$, l'unité est en radian, la conversion en degré nécessite de multiplier l'expression par $180/\pi$. L'angle, entre la direction du moment dipolaire et celle du canal s, est ainsi exprimé en fonction des deux canaux.

La fig. 3.4.2 illustre le résultat que l'on peut extraire des deux canaux de détection, c'est à dire l'angle de la direction du moment dipolaire et son module. On constate que l'angle et le module varient peu, cela signifie que la molécule conserve son orientation dans le plan de l'échantillon..

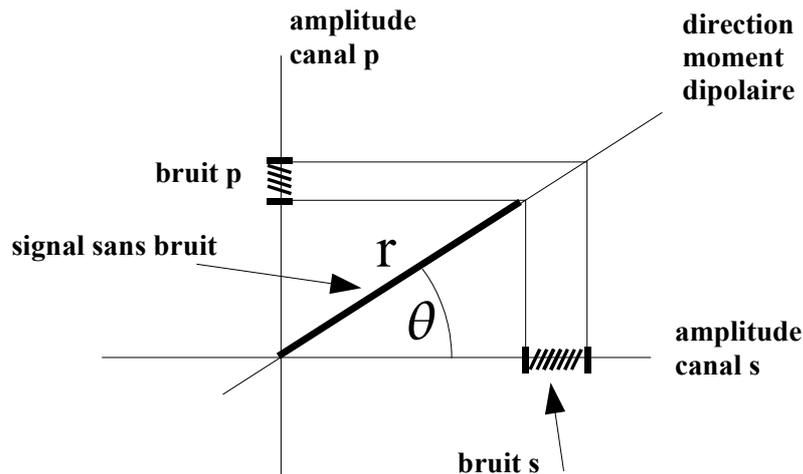


Fig. 3.4.1 Représentation schématique des amplitudes détectées sur les canaux s et p comprenant le bruit en \sqrt{N} et de l'angle fait entre la direction du moment dipolaire et celle du canal s.

Une trace temporelle a manifesté un clignotement seulement sur l'un des deux canaux, ce qui a première vue nous a fait penser à un système de deux molécules, et qu'une seule clignoterait. Puis, l'idée qu'une molécule puisse changer de position est venue, des travaux théoriques ont montré qu'une molécule peut avoir plusieurs positions dans une matrice [VS].

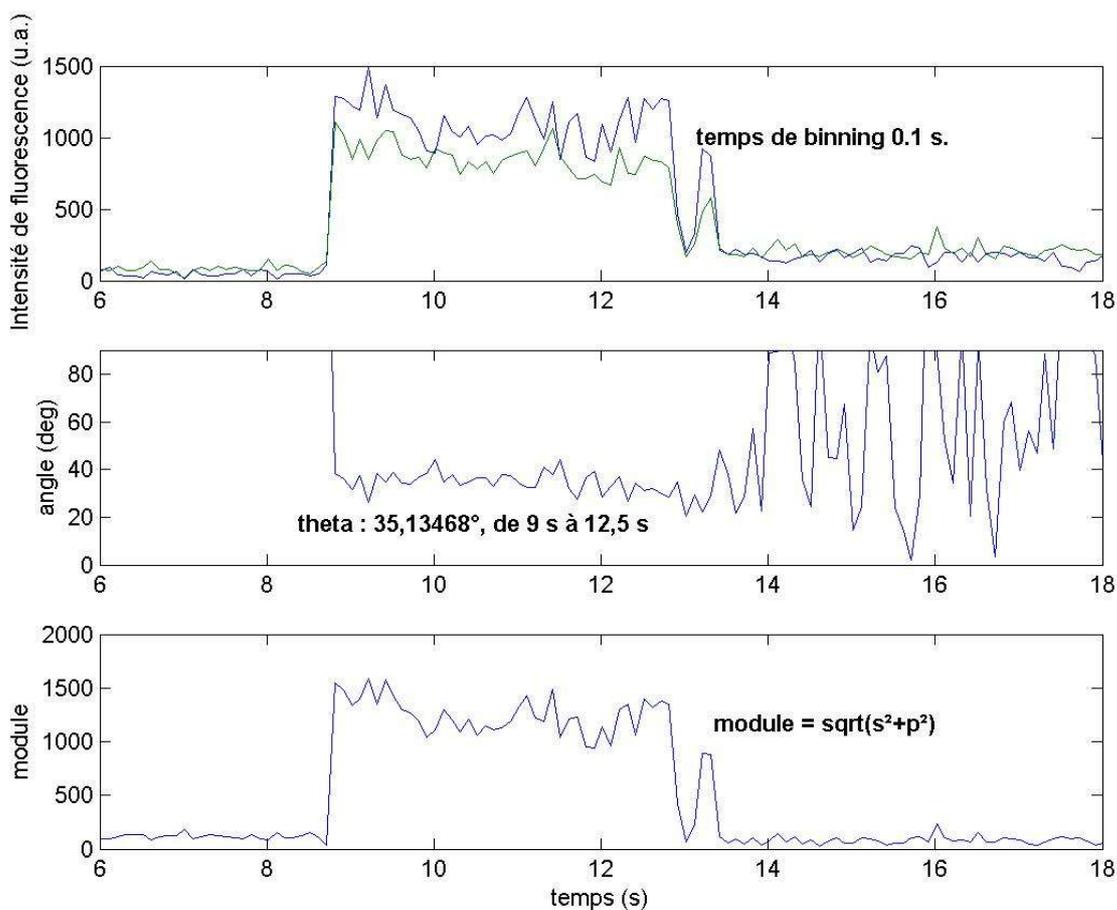


Fig. 3.4.2

En haut, trace temporelle de la fig. 3.8 b) d'une molécule unique d'anthracène sur deux canaux de polarisation s et p avec un temps de binning de 0,1 s. Canal vert : s , canal bleu : p .

Au milieu, après renormalisation du canal s sur p et soustraction du bruit de fond du canal p sur chaque canal, on détermine l'angle fait par la projection du moment dipolaire de transition sur la surface, par rapport au canal s . Entre 9 et 12,5 seconde, on mesure un angle de $35,1^\circ$.

Au dessous, calcul du module des deux signaux renormalisé et sans bruit de fond pour faire apparaître le module de la projection du moment dipolaire de transition sur la surface.

Relativement aux traces temporelles données précédemment, on a trouvé un angle :

- pour la molécule d'anthracène de la fig. 3.3.8 a), $\theta = 2.9^\circ$, de 35 s à 55 s,
- pour le nanocrystal de la fig. 3.3.13, $\theta = 53.2^\circ$, de 196 s à 204 s.

En NSOM, il est possible aussi de travailler en décomposant les polarisations de la fluorescence, d'ailleurs par cette technique de microscopie de nanocristaux de CdSe, des résultats ont montré que ces objets connaissent un effet de polarisation [ESA].

3.5 Spectroscopie d'objet unique

Des travaux ont déjà été effectués sur des molécules fluorescentes uniques, [MO], [WEM], [PhT]. Nos tentatives de réaliser un spectre sur une molécule unique ont toutes échouées, que ce soit avec l'objectif x40 ou x100, avec des molécules d'anthracène ou de diI-C18. La raison se trouve sûrement dans la durée de vie des molécules. Le spectre se réalise par une accumulation de photons de fluorescence sur une gamme de longueur d'onde déterminée. Le compromis entre la puissance nécessaire à la détection de la fluorescence et la vitesse de blanchiment est un critère crucial pour satisfaire la sensibilité limitée du spectromètre CCD.

Les spectres ont été réalisés sur des nanocristaux uniques de CdSe. Les images à gauche de la fig. 3.5 montrent deux objets uniques pris avant l'enregistrement des courbes de fluorescence montrées à droite. On constate que les maxima d'intensité émis par les deux objets uniques sont situés sur deux longueurs d'onde différentes, un est à 600 nm et l'autre à 608 nm. Cette écart en longueur d'onde s'explique par les différences en taille créées lors de formation des nanocristaux, la dispersion en taille de ces objets est de 5% [DJN]. Le nanocristal se comporte comme une boîte quantique, où plus la boîte est petite plus forte sera l'énergie du photon. Ceci implique que le nanocristal qui émet à 608 nm est plus grand que celui émettant à 600 nm.

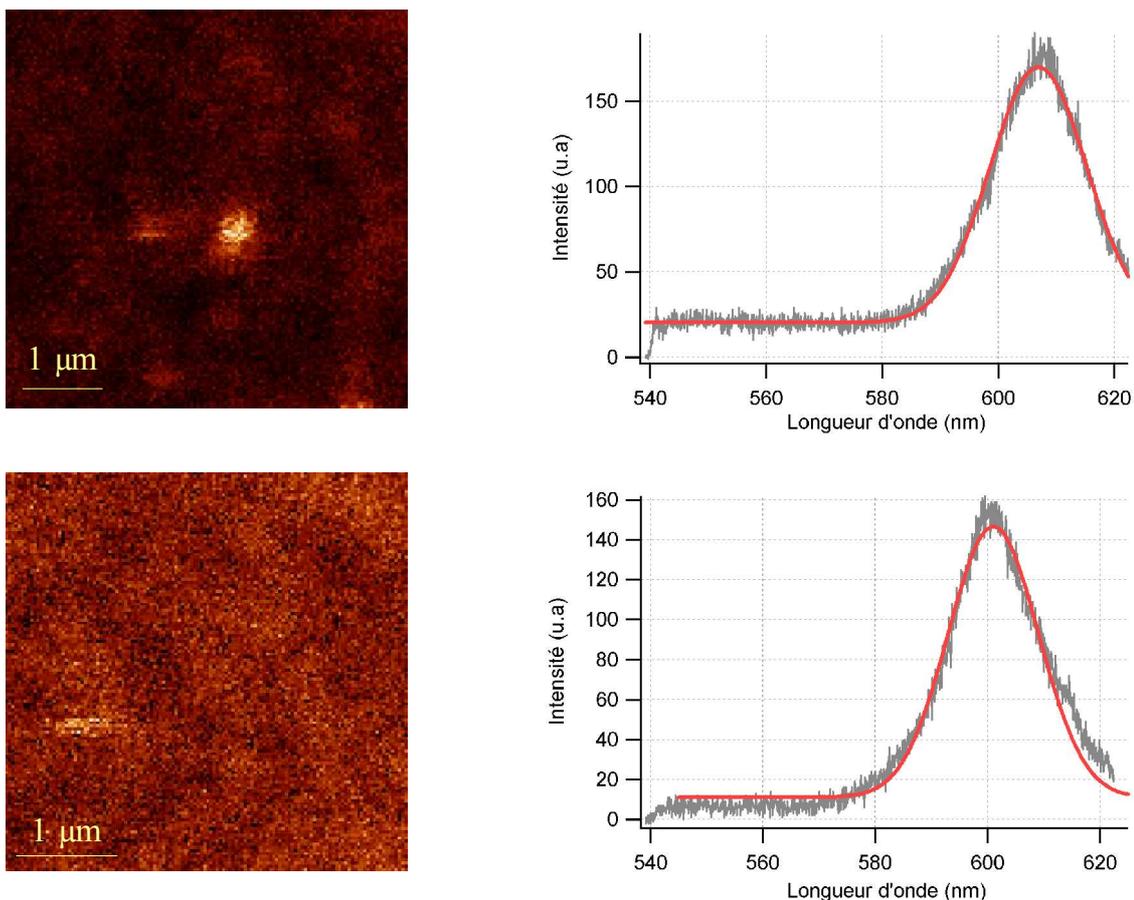


Fig. 3.5 Spectre de luminescence de deux nanocristaux de CdSe, à gauche un objet unique avant enregistrement du spectre.

5. Conclusion

Le but de ce stage était de se familiariser avec le microscope confocal ainsi que des techniques associées (cryogénie pour le spectromètre, laser à ions d'Ar⁺, APD détecteur de photons uniques, piézoélectriques pour les mouvements nanométriques, technologies des fibres optiques...). Pour que les mesures puissent se réaliser, le microscope confocal a été adapté pour chaque objet avec les raies du laser Ar, avec les filtres interférentiels passe-bande et le miroir dichroïque.

A l'issu de ce stage, on peut dire que de nombreuses informations physiques ont vu le jour s'agissant de la dynamique d'objets fluorescents.

Un résultat trouvé durant le stage est la détermination de l'orientation du moment dipolaire et de son module grâce à un cube séparateur polarisant, pour les molécules d'anthracène et pour les nanorods. On peut de ce fait voir si l'objet tourne ou reste immobile.

Nous avons déterminé la section efficace de la molécule dérivée d'anthracène, à partir de cette valeur on est en mesure de calculer le nombre de photons absorbées par cette molécule, et si l'on connaît l'efficacité quantique alors on pourrait prédire le nombre de photons émis. La mesure de l'efficacité quantique de la molécule d'anthracène va se faire prochainement.

La durée de vie des niveaux d'énergie sur l'état triplet peut être déterminée par des calculs d'autocorrélation grâce aux traces temporelles effectuées. On a vu sur certaines traces temporelles que la fluorescence des molécules (même des nanocristaux) peut clignoter sous une excitation.

Nos tentatives de réaliser un spectre sur une molécule unique ont toutes échouées car elles photoblanchissent trop vite. Sur les nanocristaux, connaissant la position de la raie spectrale on peut déterminer le diamètre du cœur avec une grande précision.

Bibliographie

- [PhT] Ph. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, and M. Orrit, Ten years of Single-Molecule Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry*, **104**, No. 1, 1, (2000).
- [WEM2] W. E. Moerner and David P. Fromm, Methods of single-molecules fluorescence spectroscopy and microscopy, *Review of Scientific Instruments*, **74**, No. 8, 3597, (2003).
- [CGH] Christian G. Hübner, Alois Renn, Inek Renge, and Urs P. Wild, *Journal of Chemical Physics*, **115**, No. 21, 9619, (2001).
- [NC] Nicolas Chevalier, Thèse de doctorat à *paraître*, Réalisation de sondes actives pour l'optique en champ proche, 2004.
- [PR] Peter Reiss, Joël Bleuse, and Adam Pron, Highly Luminescent CdSe/ZnSe Core/Shell Nanocrystals of Low Size Dispersion, *Nanoletters*, **2**, No. 7, 781, (2002).
- [LM] Liberato Manna, Erik C. Scher, Liang-Shi Li, and A. Paul Alivisatos, *Journal of American Chemistry Society*, **124**, No. 24, 7136, (2002).
- [BMJr] Bruchez, -M., -Jr.; Moronne, -M.; Gin, -P.; Weiss, -S.; Alivisato, -A., -P., Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science*, **281**, No. 5385, 2013, (1998).
- [MB] Mickäel Brun, Thèse de doctorat, Microscopie et spectroscopie optique en champ proche de nanostructures semiconductrices à basse température, 2002.
- [MGB] M. G. Bawendi, P. J. Carroll, William L. Wilson, and L. E. Brus, Luminescence properties of CdSe quantum crystallites: Resonance between interior and surface localized states, *Journal of Chemical Physics*, **96**, No. 2, 948, (1991).
- [KTS] K. T. Shimizu, W. K. Woo, B. R. Fisher, H. J. Eisler, and M. G. Bawendi, Surface-Enhanced Emission from Single Semiconductor Nanocrystals, *Physical Review Letters*, **89**, No. 11, 1, (2002).
- [HH] H. Htoon, J. A. Hollingsworth, R. Dickerson, and V. I. Klimov, Effect of Zero- to One-Dimensional Transformation on Multiparticle Auger Recombination in Semiconductor Quantum Rods, *Physical Review Letters*, **91**, No. 22, 1, (2003).
- [LsL] Liang-shi Li and A. Paul Alivisatos, Origin and Scaling of the Permanent Dipole Moment in CdSe Nanorods, *Physical Review Letters*, **90**, No. 9, 1, (2003).
- [AD] Aurélien Drezet, Thèse de doctorat, Le champ proche optique et la détection de nanoobjets moléculaires individuels, 2002.
- [VS] Viktor Szalay, Juan Ortigoso, The internal axis system of molecules with one large amplitude internal motion, *Journal of Chemical Physics*, **109**, No. 10, 3911, (1998).
- [ESA] Empedocles, S. A.; Neuhauser, R.; Bawendi, M. G., Three-dimensional orientation measurements of symmetric single chromophores using polarization microscopy, *Nature*, **399**, No. 6732, 126, (1999).
- [MO] M. Orrit and J. Bernard, Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a p-Terphenyl Crystal, *Physical Review Letters*, **65**, No. 21, 2716, (1990).
- [WEM] W. E. Moerner and Michel Orrit, Illuminating Single Molecules in Condensed Matter, *Science*, **283**, No. Review, 1670, (1999).
- [DJN] D. J. Norris and M. G. Bawendi, Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots, *Physical Review B*, **53**, No. 24, 16338, (1996).

Annexe - Vue d'ensemble de l'installation NSOM

Le laser utilisé pour nos expériences est un laser à ion d' Ar^+ qui possède plusieurs raies dans le visible, dont on choisit une pour exciter l'échantillon. Lors des réglages optiques on choisit une raie vers le rouge afin de ne pas photoblanchir les objets. Le faisceau monochromatique passe par des filtres neutres afin d'adapter la puissance aux objets et aux détecteurs sensibles telle qu'une photodiode à avalanche (*APD : avalanche photodiode*). Ensuite le faisceau est injecté dans une fibre monomode qui entre dans le microscope.

L'extrémité de la fibre métallisée est approchée à environ 10 nm de l'échantillon, de sorte qu'elle soit immergée par le champ proche, émis par l'ouverture optique en bout de pointe. La fibre, mise en vibration par un dither⁹, entraîne dans son mouvement le diapason, qui, de son côté, convertit les oscillations mécaniques en oscillations électriques. En dessous d'une distance de 40 nm, ces vibrations sont amorties par la force de cisaillement et ce d'autant plus que la pointe s'approche de la surface de l'échantillon. Une boucle d'asservissement permet de garder la distance constante entre l'échantillon et la pointe (indiquée par les flèches rouges). La fréquence de vibration est fixée dès le début de l'expérience au maximum de la courbe de résonance du système pointe-diapason. Si l'amplitude de l'oscillation du système pointe-diapason varie, à cause d'un changement de la distance pointe-échantillon, l'électronique de contrôle (fabricant RHK) ferme la boucle d'asservissement en déplaçant le scanner dans la direction Oz. Le montage comporte une variante au sujet de la collection de la lumière, ici c'est un miroir elliptique, mais il est possible de trouver un miroir parabolique muni d'une lentille dont la focale soit sur l'entrée de la fibre multimode.

Il y a ensuite deux possibilités de détecter les photons émis par l'échantillon, soit avec:

- un spectromètre à CCD (*charge coupled device*) refroidi à l'azote liquide, associé à un ordinateur d'acquisition et de traitement d'image,
- une APD, plus sensible mais elle intègre sur toutes les longueurs d'ondes

9 Dispositif piézoélectrique

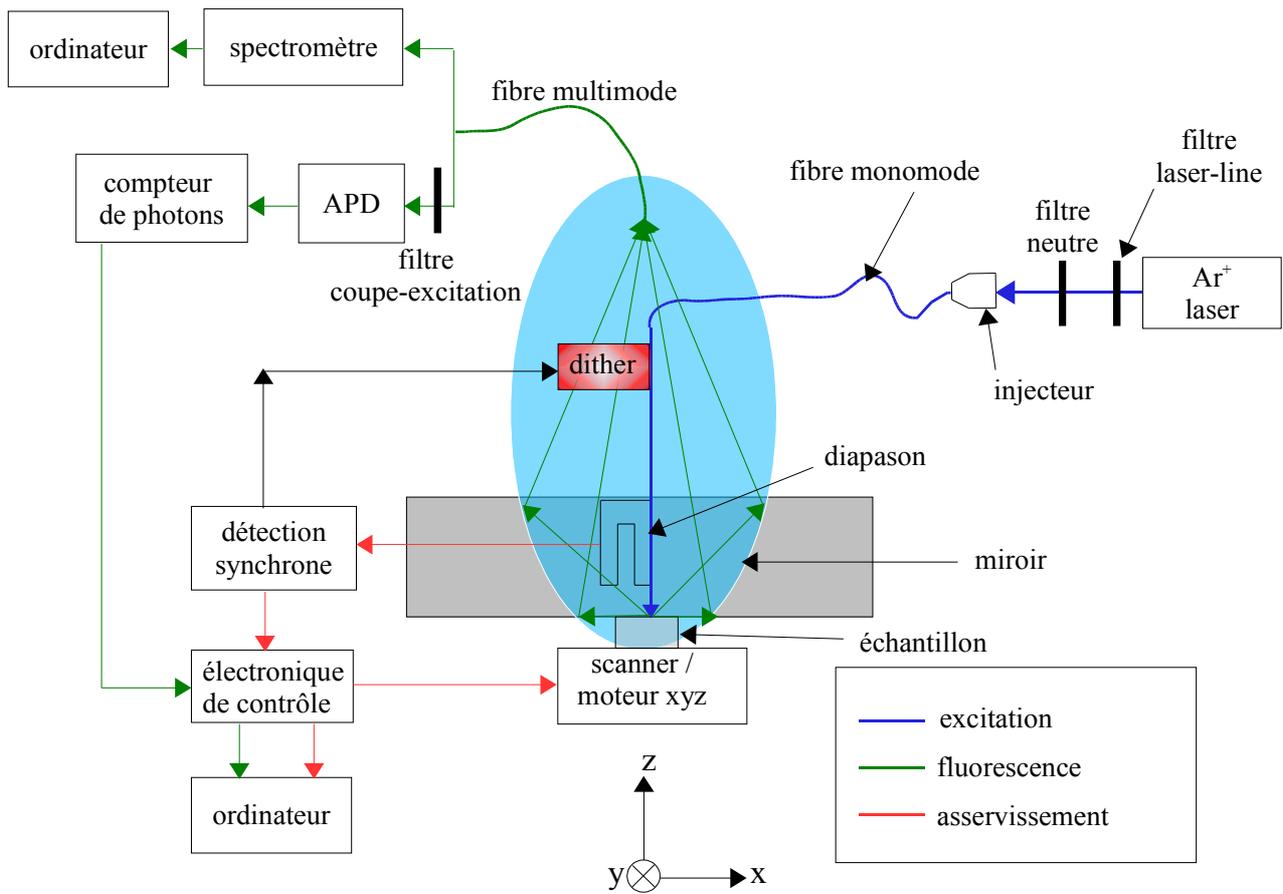


Fig. A Vue d'ensemble schématique de l'installation NSOM à collection de lumière elliptique.