

Étude expérimentale de la fluorescence et du transfert non-radiatif en champ proche de nanostructures métalliques

Da Cao

► To cite this version:

Da Cao. Étude expérimentale de la fluorescence et du transfert non-radiatif en champ proche de nanostructures métalliques. Physique [physics]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT: 2014PA066530. tel-01134425

HAL Id: tel-01134425 https://theses.hal.science/tel-01134425v1

Submitted on 23 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Spécialité

Physique

Présentée par

Da Cao

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 6

Sujet de la thèse :

Etude expérimentale de la fluorescence et du transfert non-radiatif en champ proche de nanostructures métalliques

Exemplaire provisoire

devant le jury composé de :

M.	Bachelot	Renaud	Rapporteur
Mme.	Maitre	Agnès	Examinateur
M.	Charra	Fabrice	Examinateur
М.	Collin	Stéphane	Examinateur
$\mathbf{M}.$	Carminati	Rémi	Directeur de thèse
$\mathbf{M}.$	De Wilde	Yannick	Invité
Mme.	Krachmalnicoff	Valentina	Invitée (Encadrante)

Université Pierre & Marie Curie - Paris VI Bureau de la Scolarité Doctorat Esc. G, 2^e étage 15 rue de l'École de Médecine 75270 PARIS Cedex 06 $\begin{array}{c} {\rm T\acute{e}l} \ {\rm Secr\acute{e}tariat} : 01 \ 42 \ 34 \ 68 \ 35 \\ {\rm Fax} : 01 \ 42 \ 34 \ 68 \ 40 \\ {\rm T\acute{e}l} \ {\rm pour} \ {\rm les} \ {\rm \acute{e}tudiants} \ {\rm de} \ {\rm A} \ {\rm a} \ {\rm ME} : 01 \ 42 \ 34 \ 68 \ 41 \\ {\rm T\acute{e}l} \ {\rm pour} \ {\rm les} \ {\rm \acute{e}tudiants} \ {\rm de} \ {\rm MG} \ {\rm a} \ {\rm Z} : 01 \ 42 \ 34 \ 68 \ 51 \\ {\rm E-mail} : \ {\rm scolarite.doctorat@upmc.fr} \end{array}$

Résumé

L'interaction lumière-matière dépend fortement de l'environnement de l'émetteur fluorescent. Il est gouverné par une quantité fondamentale en physique : la densité locale d'états électromagnétiques (LDOS), qui est proportionnelle au taux de désexcitation de l'émetteur fluorescent à l'endroit où il se trouve dans son environnement.

La partie principale de ce travail de thèse a consisté en la réalisation d'études expérimentales spatialement résolues du taux de désexcitation et de l'intensité de fluorescence d'un nanoémetteur en champ proche d'une nanoantenne plasmonique. Ceci a été rendu possible grâce à l'utilisation d'un microscope de champ proche à sonde fluorescente récemment développé à l'Institut Langevin. L'amélioration des performances de ce dispositif apportée au cours de cette thèse, nous a permis de cartographier le taux de désexcitation radiatif et non-radiatif apparent en champ proche d'un milieu nanostructuré avec une résolution spatiale nanométrique.

Par la suite, nous avons commencé à nous intéresser au transfert d'énergie nonradiatif entre deux molécules fluorescentes. Ce phénomène, connu sous le nom de FRET (Förster Resonance Energy Transfer), a lieu habituellement sur des distances de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres. En utilisant comme vecteur pour le transfert d'énergie un plasmon se propageant à la surface d'un film d'or continu, nous avons démontré qu'il est possible d'étendre la portée du FRET sur des distances supérieures à un micromètre. Dans la suite de cette thèse, l'influence de l'environnement sur l'efficacité et la portée du FRET sera étudiée.

Mots-clés

fluorescence, densité locale d'états électromagnétique, champ proche optique, nanostructures plasmoniques, microscope à force atomique, FRET

Summary

Light-matter interaction strongly depends on the environment of the fluorescent emitter. It is governed by a fundamental physical quantity : the local density of electromagnetic states (LDOS), which is proportional to the decay rate of the fluorescent emitter in a given environment.

The main part of this experimental thesis is devoted to the spatially resolved study of the decay rate and the fluorescence intensity of a nano-emitter in the near field of plasmonic nanoantennas. This study has been made possible by the use of a near field scanning fluorescence microscope recently developed at Institut Langevin. During this thesis we obtained a substantial improvement of the performances of this device. This allowed us to map the radiative and apparent non-radiative decay rates in the near field of a nanostructure with nanometer spatial resolution.

Thereafter, we started to investigate the non-radiative energy transfer between two fluorescent molecules. This phenomenon, known as FRET (Förster Resonance Energy Transfer), usually takes place over distances of the order of several tens of nanometers. Using a plasmon propagating on the surface of a continuous gold film as a vehicle to transfer the energy between the two molecules, we have demonstrated that it is possible to extend the range of FRET on distances greater than one micron. The perspective after the end of this thesis, is the study of the influence of the environment on the efficiency and the range of FRET.

Key words fluorescence, local density of states, near-field optics, plasmonic nanostructures, atomique force microscope, FRET

Table des matières

Introduction

Ι	Intr	oducti	on sur la fluorescence	1
	I.1	Émissi	ion spontanée	2
		I.1.1	Principe de la fluorescence	2
		I.1.2	Puissance émise par un dipôle oscillant classique	3
		I.1.3	Taux de désexcitation d'un système quantique à deux niveaux	5
		I.1.4	Équivalence entre puissance émise et temps de vie	6
	I.2	Densit	é locale d'états électromagnétiques	7
		I.2.1	Définition	7
		I.2.2	Lien entre puissance émise, taux de désexcitation et LDOS	7
		I.2.3	Taux de désexcitation radiatif et non-radiatif	8
	I.3	Intens	ité de fluorescence	9
	I.4	Quelqu	ues expériences pionnières et motivations	10
		I.4.1	Expérience de Drexhage (1966)	10
		I.4.2	Expérience de Buchler et al. (2005)	11
		I.4.3	Motivations du présent travail de thèse	12
	I.5	Conclu	usion	13
II	Mo	ntage e	expérimental	15
	II.1	Princi	pe de l'expérience	16
	II.2	Micros	scope AFM en mode <i>shear force</i>	18
	II.3	Implér	nentation d'une nouvelle tête de balayage	19
		II.3.1	Positionnement de la pointe AFM	20
		II.3.2	Electronique de contrôle : Développement d'un amplificateur à bas	
			bruit	22
		II.3.3	Performances de l'AFM	25
	II.4	Sonde	fluorescente	26
		II.4.1	Fabrication des pointes	26
		II.4.2	Choix de la source fluorescente	29
		II.4.3	Protocole d'accroche	33
	II.5	Monta	ge expérimental : Schémas de l'expérience	34
		II.5.1	Excitation	36
		II.5.2	Détection	37
		II.5.3	Mesure d'intensité et de temps de vie	39
	II.6	Conclu	ision	40
IT	I Car	actéris	ation en champ proche d'une antenne plasmonique	41
	III.1	Introd	uction \ldots	42

 $\mathbf{x}\mathbf{v}$

	III.2	Résultats	. 46
		III.2.1 Echantillons étudiés	. 46
		III.2.2 Cartes expérimentales	. 48
	III.3	Simulations numériques	. 51
		III.3.1 Méthode de simulation	. 51
		III.3.2 Résultats des simulations et comparaison avec l'expérience	. 54
		III.3.3 Résolution de la sonde fluorescente	. 55
	III.4	Conclusions et perspectives	. 57
тт			F 0
IV	Cart	Matinition et état de l'art	59 60
	1V.1 IV.9	Modèle théorique	. 00 61
	10.2	Wodele theorique	. 01
		IV.2.1 Theoreme de reciprocite	. 01 69
	117.9	IV.2.2 Application au cas experimental	. 03
	11.3	Mesures statistiques	. 66 . cc
		IV.3.1 Description des echantillons etudies	. 66
		IV.3.2 Problèmes rencontrés	. 69
	IV.4	Mesures AFM	. 71
		IV.4.1 Echantillons étudiés et source fluorescente	. 71
		IV.4.2 Résultats	. 71
	IV.5	Comparaison avec les simulations	. 75
		IV.5.1 Comparaison avec les cartes effectives	. 75
		IV.5.2 Comparaison avec les cartes réelles	. 75
	IV.6	Conclusions et perspectives	. 77
\mathbf{V}	Intr	oduction au transfert d'énergie entre molécules fluorescentes	79
	V.1	Introduction	. 80
		V.1.1 Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes	. 80
		V.1.2 Conditions du transfert d'énergie	. 81
		V.1.3 Signatures du FRET	. 85
	V.2	Effet de l'environnement sur le FRET	. 87
		V.2.1 Etat de l'art	. 87
		V.2.2 Plasmon de surface	. 89
		V.2.3 FRET à longue portée engendré par le plasmon de surface	. 93
	V.3	Conclusion	. 95
T 7			07
V	$\operatorname{Lrar}_{\mathrm{VI}}$	Chain de comple demons accenteur	97
	V1.1	Unit au couple donneur-accepteur	. 98
		VI.I.I Candidats potentiels	. 98
		VI.1.2 Choix du polymere	. 99
		VI.1.3 Donneur, accepteur et polymere choisi	. 101
	V1.2	Preparation des échantillons	. 101
		VI.2.1 Dépôt des donneur et des accepteurs	. 101
		V1.2.2 Film d'or continu	. 103
	VI.3	Montage expérimental	. 104
		VI.3.1 Montage avec excitation en champ large	. 104
		VI.3.2 Montage avec fibre micro-lentillée	. 106
	VI.4	Mesures spectrales	. 107
		VI.4.1 Signature spectrale du FRET à courte portée	. 107

VI.4.2 Signature spectrale du FRET à longue distance	109
VI.5 Mesures de temps de vie	113
VI.6 Confirmation des résultats préliminaires par photoblanchiement	114
VI.7 Perspectives : influence de la LDOS sur le FRET	117
VI.7.1 Simulation des comportements attendus	118
VI.7.2 Vers l'observation expérimentale	119
VI.8 Conclusion	121
onclusion	123

Conclusion

Annexes

129

\mathbf{A}	Préj	paration des échantillons pour les expériences du FRE	ET engendré
	par	plasmon	129
	A.1	Préparation de la solution	129
	A.2	Programme de dépôt	130
Ré	éférei	ences	131

Table des figures

I.1 I.2	Diagramme de Jablonski d'une molécule à deux niveaux électroniques (a) Représentation schématique du mécanisme d'émission spontanée pour un système quantique à deux niveaux (b) Le déclin de fluerescence d'un	3
	émetteur fluorescent donne la probabilité de désexcitation de l'émetteur	5
I.3	Temps de vie de fluorescence des ions $Eu3+$ en fonction de la distance émetteurs-surface d mesuré expérimentalement (points) et les calculs théo-	0
	riques (courbes continue noire). Image tirée de la référence [1]	11
I.4	Intensité (a) et temps de fluorescence (b) d'une molécule unique face à un miroir d'argent. (c) Intensité d'excitation à la position de la molécule.	
	Courbe tirée de la référence [2]	12
II.1	Schéma de principe de la sonde fluorescente à balayage en mode shear- force. L'échantillon est monté sur une platine piézoélectrique à trois axes de translation orthogonaux. Un objectif de microscope à grande ouverture numérique est positionné sous l'échantillon. Il permet d'exciter et récolter la fluorescence du nano-émetteur fluorescent greffé à la pointe AFM située	
II.2	au dessus de l'échantillon	17
	la disposition de la pointe par rapport au diapason.	18
II.3	Modes de fonctionnement AFM. (a) Contact mode. (b) Non-contact mode.	19
II.4	(a) Ancienne tête de balayage. (b) Vue de coté du positionnement de la	
	pointe par rapport à la seringue et au bras du diapason. \ldots \ldots \ldots \ldots	20
II.5	Nouvelle tête de balayage	21
II.6	Circuit équivalent du diapason.	22
II.7	Circuit de transimpédance. Le diapason fonctionne comme un générateur	
	de courant.	23
II.8	(a) Topographie d'une nano-antenne composée de 3 disques de diamètre	
	130 nm, hauteur 30 nm et gap de 30 nm. Barre d'échelle : 200 nm. (b)	
	Profil axial de la ligne A sur la topographie. (c) Profil axial de la ligne B	<u>م</u> ۲
ΠO	sur la topographie.	20
11.9	18, <i>Delay</i> 126, <i>Pull</i> 150 à trois grossissements différents : $50, 5 \times 10^3$ et	
	3×10^4 . Les lignes jaunes dans (a), (b) et (c) indiquent respectivement la	
	longueur, l'angle d'ouverture et le rayon de courbure de la pointe. $\ .\ .\ .$	27
II.10	La longueur de la pointe en fonction de $velocity$ à deux valeurs du paramètre	
	heat différents	28
II.11	(a) La longueur de la pointe en fonction de <i>heat</i> . (b) L'angle d'ouverture	
	de la pointe en fonction de <i>heat</i>	28

II.12	(a) Structure schématisée d'un QD. (b) Large gamme de spectre d'émission des QDs	30
II 13	Structure cristallographique d'un centre NV du diamant	31
II.14	 (a) Image MEB des billes de silice dopées de Ruthénium fournies par Philippe Boutinaut à Clermont-Ferrand. Le diamètre de ces billes est de 20 nm. (b) Image de microscope de fluorescence des billes de silice en champ large sur une caméra EMCCD. 	31
II.15	Spectre d'excitation et d'émission pour les billes de polystyrène FluoS- pheres Red (Invitrogene).	33
II.16	Protocole d'accroche d'une bille de 100 nm. (a) Vue en champ large de l'échantillion avant l'accroche. (b) Champ large de la zone après l'accroche. La bille indiquée par la flèche n'est plus sur l'échantillon et elle est accrochée sur la pointe AFM.	33
II.17	Taux de désexcitation spontané de la bille fluorescente avant (courbe bleue claire) et après (courbe rouge) accrochage à une pointe en silice. Les courbes bleues sont les fits. (a) Le cas où le temps de vie change beaucoup après accrochage. (b) Le cas où le temps de vie ne change pas après accrochage.	35
II.18	Montage expérimental pour l'expérience de mesure de temps de vie et de l'intensité de fluorescence.	35
II.19	Schéma de la partie d'excitation optique du montage [3].	36
II 20	Schéma de la partie optique de détection du montage [3]	38
II.20 II.21	(a) Illustration du processus <i>start-stop</i> de la mesure de temps de vie de fluorescence. (b) Histogramme de temps de vie de fluorescence du processus	00
	start-stop.	39
111.1	Les deux méthode existantes pour sonder expérimentalement la LDOS. (a)	49
	Methode statistique. (b) Methode deterministe.	43
111.2	La procedure de lithographie electronique.	40
111.3	(b) deux rectangles, (c) deux triangles	47
III.4	(a) Image MEB d'une antenne de 3 disques typique avant le balayage. (b) Image MEB d'une autre antenne de 3 disques après le balayage. Barre	10
III.5	Carte de l'intensité de fluorescence (a) et carte de taux de désexcitation	48
	(LDOS) (b) réalisées sur une nano-antennes d'or composée de trois disques de diamètre de 150 nm, hauteur de 30 nm et espacés de 75 nm.	49
III.6	Sonde fluorescente à balayage en champ proche de nano-antenne en or	49
III.7	Résultats expérimentaux : (a) Topographie de l'échantillon. (b) Carte de l'intensité de fluorescence. (c) Carte de taux de désexcitation (LDOS). Les cercles en pointillé, tirées de la carte de topographie et de la carte d'inten-	50
	site, representent la position des disques. \dots	90
111.8	Schema simplifie pour les simulations. (a) Chemin d'excitation. (b) Chemin d'émission	53
III.9	 (a) Vue de dessus de la topographie du trimère discrétisé. A noter que le trimer est de 30 nm d'épaisseur comme celui que nous utilisons dans l'expérience. (b) Carte de l'intensité de fluorescence simulée (unité arbitraire). 	
	(c) Carte de LDOS simulée, normalisée par son valeur dans le vide	55

III.1	0Cartes de LDOS simulées pour deux distances d entre le bas de la bille et le haut de l'antenne : (a,b) Cartes moyennées sur les 100 émetteurs répartis aléatoirement dans la bille normalisées par la LDOS du vide ρ_0 . (c,d) Cartes moyennées sur les 48 émetteurs localisés dans la partie basse de la bille. (e,f) Cartes moyennées sur les 52 émetteurs localisés dans la partie haute de la bille. (g,h) Profil axial des cartes (a,c,e) et (b,d,f) respectivement suivant les lignes indiquées dans les cartes. Dans les deux cartes, la LDOS est normalisée par sa valeur maximale ρ_{max} pour quantifier le contraste de l'image. Diamètre de la bille : 100 nm.	56
IV.1	(a) Un dipôle \mathbf{u}_a au point \mathbf{r}_D émet un champ dans un environnement dif- fusant et absorbant, mesuré au point \mathbf{r}_0 . (b) Un dipôle \mathbf{u}_1 au point \mathbf{r}_0 émet un champ dans un environnement diffusant et absorbant, mesuré au point \mathbf{r}_D	62
IV.2	(a) Montage expérimental complet pour l'expérience. L'échantillon est monté sur un microscope confocal inversé combiné à un système AFM fait maison. Une pointe AFM en silice, au bout de laquelle une bille fluorescente de 100 nm est accrochée, est amenée en champ proche de l'échantillon. Une source laser super-continuum pulsée est spectralement filtrée à $\lambda_{exc} = 560$ nm (filtre passe bande, SemRock FF01-560/14-25), passe à travers le trou de confocalité de 150 μm et puis est focalisé sur la bille fluorescente à travers un objectif à l'huile de grande ouverture numérique (NA=1.4). La fluorescence est collectée par le même objectif à huile, passe par le même trou de confocalité et puis est séparée de l'excitation par un miroir dichroïque (SemRock BLP01-594R-25X36) ainsi qu'un filtre de fluorescence (filtre passe haut, SemRock BLP01-594R-25). Enfin, un miroir amovible permet de choisir entre l'observation plein champ de l'échantillon sur la caméra CCD ou les mesures de l'intensité de fluorescence et de temps de vie à l'aide d'une photodiode à avalanche, qui nous permet d'acquérir simultanément les cartes d'intensité et de durée de vie. (b,c) Schémas simplifiés du montage optique de l'expérience : (b) Chemin d'excitation. (c) Chemin de détection	63
IV.3	Spectre de réflexion simulé d'un disque d'or de diamètre 150 nm (Extrait de la thèse de Sarah Suck [4])	64
IV.4	L'intensité du champ calculée sur un films semi-continus au seuil de percola- tion. Les modes du champ électrique sur les films métalliques semi-continus peuvent être localisés ou délocalisés, radiatifs ($luminous$) ou non-radiatifs ($dark$) [5]	67
IV.5	(a) Variance normalisée de la distribution des taux de désexcitation en fonction de la fraction surfacique. (b) Rapport des surfaces fractales et des surfaces euclidiennes en fonction de la fraction surfacique d'or [6]	68
IV.6	(a) La distribution de l'intensité de fluorescence pour les billes Dark Red spin-coatées sur un substrat de silice. (b) La fluctuation d'intensité d'une bille Dark Red sur un substrat de verre en fonction du temps	70
IV.7	(a,b) Cartes d'exaltations d'intensité pour l'émission (670 nm) et l'excita- tion (650 nm). (c) Topographie de l'échantillon simulé. (d)Différence rela- tive entre les deux cartes exprimée en pourcents	70

IV.8	(a) Carte de l'intensité de fluorescence sur un disque en or. (b) Carte de taux de désexcitation pour le même disque d'or. Encarts : cartes calculées numériquement. La carte de taux de désexcitation est normalisée par sa valeur dans le vide. (c) Trajet suivi par la sonde fluorescente pendant le scan (pas à l'échelle). (d) Coupe transversale de la carte de taux de désexcitation	
	indiquée par la ligne blanche pointillée dans (b)	72
IV.9	(a,b) Cartes de taux de désexcitation radiatif effectif $\Gamma^R_{rms,\Omega}$ et non-radiatif apparent $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}$ mesurées sur une disque d'or. (c,d) cartes de taux de désex- citation radiatif effectif et non-radiatif effectif normalisées par le taux de désexcitation total.	73
IV.10	0(a) Carte de l'intensité de fluorescence, (b) carte de taux de désexcitation, (c) carte de taux de désexcitation radiatif effectif normalisée $\Gamma^R_{rms,\Omega}/\Gamma$ et (d) carte de taux de désexcitation non-radiatif apparent normalisée $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}/\Gamma$ sur une chaîne linéaire de trois nano-disques en or. Encart : Image MEB de l'échantillon, barre d'échelle : 200 nm.	74
IV.1	1(a,b) Cartes de taux de désexcitation radiatif effectif $\Gamma^R_{rms,\Omega}$ et non-radiatif apparent $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}$ mesurées sur un disque d'or, normalisées par la carte de taux de désexcitation total mesurée. Encart : Image MEB de l'échantillon, barre d'échelle : 200 nm. (c,d) Cartes de taux de désexcitation radiatif ef- fectif $\Gamma^R_{rms,\Omega}$ et non-radiatif apparent $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}$ numériques normalisées par la carte de taux de désexcitation total calculée. (e,f) Cartes de taux de désexcitation radiatif moyen $\Gamma^R_{moy,\Omega}$ et non-radiatif moyen $\Gamma^{NR}_{moy,\Omega}$ calculées numériquement normalisées par la carte de taux de désexcitation total cal-	
	culée	76
V.1	Quand la distance entre le donneur et l'accepteur est très courte, la désex-	
V.O	citation du donneur est composée de Γ_D et Γ_{FRET}	82
V.2 V.3	Efficacité du FRE1 en fonction de la distance r [7]	83
V.4	Principe des mesures du FRET par mesure d'intensité en utilisant un spec-	
	trometre. (a) En l'absence de FRET. (b) En presence de FRET	85
V.5 V.6	Principe des mesures du FRE1 basee sur la mesure du temps de vie Cécmétrie du gustème étudié : SDD à l'interface entre un métal et un di	87
V.0	électrique [8]	90
V.7	Relation de dispersion des SPP (en continu) et ligne de lumière (en poin- tillé) [8]	91
V.8	 (a) Superposition de la vue de section de l'échantillon et le profil des champs liés aux plasmons de surface symétriques (haut) ou antisymétriques (bas) couplés. (b) Spectres obtenus sur l'échantillon d'argent d'épaisseur 90 nm : spectres du donneur seul (bleu), de l'accepteur seul (rouge) et du donneur+accepteur (noir). Figures tirées de [9]. 	93
V.9	Principe du FRET à longue portée en utilisant le plasmon de surface	95
VI.1	Spectre d'émission du donneur (Red FluoSphere 580/605) et spectres d'ab- sorption des accepteurs : Atto647N, Alexafluor647 et Atto665, de gauche à droite.	99

VI.2 Le tranfert FRET entre le donneur et les accepteurs est engendré par le	
plasmon de surface sur une barrette d'or. Les accepteurs sont déposés à	
l'extrémité de la barrette par lithographie électronique	. 100
VI.3 Spectres d'absorption et d'émission pour le donneur (Red FluoSphere 580/60	5)
et l'accepteur (Atto665). \ldots	. 101
VI.4 Décalage du spectre d'émission normalisé des accepteurs suivant la concen-	
tration	. 102
VI.5 Echantillons finaux : les donneurs et les accepteurs sont déposés à la tour-	
nette sur un film d'or.	. 104
VI.6 (a) Montage expérimental pour les mesures de FRET en spectroscopie ou en	
temps de vie. (b) Schéma agrandi de l'échantillon : principe de l'expérience	
de FRET avec excitation en champ large	. 105
VI.7 Montage expérimental avec une fibre micro-lentillée [10]	. 106
VI.8 Schémas de la mesure et observation spectrale du FRET	. 107
VI.9 Spectres obtenus sur un film d'or de 30 nm à différentes distances d du	
donneur. (a) $d=0$ nm. (b) $d=300$ nm. (c) $d=2000$ nm. L'intégrale de la	
partie hachurée (proportionnel au signal d'intensité du FRET) vaut (a)	
5065, (b) 1695 et (c) 103 . Nous remarquons que pour d= 2000 nm, le signal	
FRET a disparu et que cette intégrale nous renseigne sur la valeur du brui	t.110
VI.10Distribution de l'intensité de fluorescence du donneur (courbe verte) et du	
signal FRET (courbe rouge) en fonction de la distance entre le donneur et	
le point de détection sur un film d'or de 30 nm d'épaisseur.	. 111
VI.11Montage expérimental pour le FRET	. 112
VI.12Distribution de l'intensité de fluorescence du donneur (courbe verte) et du	
signal FRET (courbe rouge) en fonction de la distance entre le donneur et	
le point de détection sur un film d'or de 40 nm d'épaisseur.	. 113
VI.13Observation du FRET en temps de vie	. 114
VI.14Principe de la procédure de photoblanchiment.	. 115
VI.15Evolution temporelle de la fluorescence des accepteurs en fonction du temps	
et de la distance pendant la procédure de photoblanchiement, sur un échan-	
tillon d'or	. 115
VI.16Evolution spectrale de la fluorescence des accepteurs en fonction du temps	
et de la distance pendant la procédure de photoblanchiement, sur un échan-	440
tillon d'or.	. 116
VI.17Distributions d'intensité de la fluorescence en fonction de la distance d entre	
le point de détection et le donneur dans trois contextes différents, sur des	115
echantillon d'or.	. 117
VI.18Deux dipôles distants de d se situent à la même hauteur z du miroir d'or.	118
V1.19Deux émetteurs à longue distance d en champ proche d'un miroir d'or.	
Les simulations sont effectuees a trois distances : $z = 10, 50$ et 500 nm. (a)	
Efficacite du FRET η_{FRET} . (b) Augmentation du transfere FRET f_{FRET}	110
en fonction de d .	. 119
VI.20Principe d'étude de l'influence de LDOS sur l'efficacite du FRET en chan-	110
geant la distance entre le donneur et l'échantillon.	. 119
VI.211emps de vie d'une blie nuorescente accroche a l'extremite d'une pointe	
u Ar M en lace u un substrat de verre en fonction de la distance entre pointe et échentiller (x) . Les deux seure et (x) et (b) seut réalisée	
pointe et echantinon (z). Les deux courbes (a) et (b) sont realisées avec	100
aeux sonaes nuorescentes amerentes.	. 120

Introduction

La nature a développé différentes structures à l'échelle nanométrique qui mettent en jeu des effets optiques uniques qui sont à l'origine, par exemple, de la couleur de certains insectes ou de fleurs. Ces phénomènes exigent une explication à l'échelle nanométrique où les phénomènes de champ proche jouent un rôle prépondérant. Par ailleurs, les applications dans le monde "nano" sont quasi illimitées puisqu'elles concernent à la fois la physiques des matériaux et des surfaces, la biologie, la chimie et la nanoélectronique.

Dans le domaine de l'optique, la résolution des microscopes optiques classiques est limitée par le phénomène de diffraction à quelques centaines de nanomètres (décrit par le critère de Rayleigh, la distance la plus petite entre deux objets que nous pouvons distinguer $\Delta x = 0, 6\lambda/ON$, où λ est la longueur d'onde de la source utilisé et ON l'ouverture numérique de l'objectif). Ceci est insuffisant pour résoudre spatialement des détails de taille nanométrique.

Pour surmonter le phénomène de la limite de diffraction en champ lointain, les microscopes à sonde locale (SPM, *Scanning Probe Microscopy*) ont vu le jour. Ces techniques permettent de voir et d'étudier des objets et des surfaces avec une précision de l'ordre de l'angström, sur des distances allant de quelques nanomètres jusqu'au millimètre. Dans ces instruments, une sonde miniature (souvent en forme de pointe effilée) est placée très proche de la surface à analyser et mesure des grandeurs physiques liées aux propriétés locales de la surface.

Le premier microscope à sonde locale a été conçu en 1982 par G. Binnig, H. Rohrer [11, 12] du laboratoire de recherche d'IBM à Zurich. Il s'agit d'un microscope à effet tunnel (STM, *Scanning Tunneling Microscopy*) qui permet de parcourir des surfaces conductrices ou semi-conductrices en mesurant l'intensité du courant électrique circulant entre la surface et le capteur ou la sonde afin de déterminer la morphologie et les propriétés électroniques des surfaces qu'il explore. Cette technique de microscopie permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de l'angström, mais son utilisation est limitée à des échantillons dont la surface est suffisamment conductrice pour permettre au courant tunnel de s'établir.

Pour remédier à l'inconvénient principal du STM, l'impossibilité d'étudier des surfaces isolantes, G. Binnig, C. F. Quate et Ch. Gerber [13] ont développé le microscope à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscopy*) en 1986, qui permet de mesurer les forces d'interactions entre la pointe du microscope placée à quelques nanomètre de la surface et la surface explorée, qu'elle soit conductrice ou isolante. Cette technique permet d'obtenir le profil de la surface sondée (la topographie).

Ces deux techniques possèdent la même propriété : placer un détecteur à une distance très proche de l'objet à étudier. Pour atteindre un résolution nanométrique, il existe une autre possibilité qui va consister non pas à détecter, mais à éclairer très localement un objet avec une source de lumière de très petite dimension : une nanosource.

Historiquement, l'idée de la nanosource remonte à 1928. Elle a été proposée par le physicien E. H. Synge [14] : il propose d'utiliser comme nanosource un trou de taille sub-longueur d'onde dans un plan opaque, et d'approcher cette ouverture très près d'une surface pour éclairer localement l'échantillon. L'image optique obtenue contiendra les informations relatives aux objets de taille sub-longueur d'onde illuminés.

L'ouverture de taille sub-longueur d'onde n'est pas la seule nanosource proposée par Synge. Il a proposé dans une note [15] d'utiliser une molécule fluorescente isolée comme nanosource. Cette idée ne sera concrétisée qu'à la fin du vingtième siècle. Les premières expériences d'imagerie optique locale basées sur ce principe ont été réalisées à l'aide de groupes de molécules fluorescentes. Lieberman et al. [16] ont fabriqué des micropipettes fluorescentes, par cristallisation à l'extrémité d'une micropipette étirée et métallisée, en utilisant des molécules d'anthracène. En 1991, Lewis et al. [17] ont reporté une image de champ proche sur les billes d'or de diamètre de 40 nm en utilisant une micropipette étirée, métallisée et remplie de molécules de pérylène piégées dans une matrice de polymère.

L'avantage principal de cette sonde fluorescente est que la longueur d'onde d'émission est différente de la longueur d'onde d'excitation, il est donc très facile de l'isoler avec un filtre approprié et de ne collecter que la fluorescence. En plus, les propriétés de l'émetteur fluorescent tels que le temps de vie et l'intensité de fluorescence permettent de relier directement l'émission de la fluorescence de l'émetteur avec les caractéristiques de l'environnement électromagnétique dans lequel il se situe.

Un émetteur fluorescent est caractérisé par un temps de vie τ ou un taux de désexcitation $\Gamma = 1/\tau$. Ce temps caractéristique n'est pas une propriété intrinsèque de l'émetteur mais dépend de son environnement. La modification du temps de vie de l'émetteur par l'environnement peut être décrite par la densité locale d'états électromagnétiques (LDOS, *Local density of states*). Cette quantité décrit le nombre de modes disponibles pour la désexcitation fluorescente de l'émetteur.

La première expérience qui a démontré que l'émission spontanée d'un système quantique dépend de son environnement, à été réalisée par K. H. Drexhage dans les années 60 [18]. La variation de la distance entre l'émetteur quantique et un miroir d'argent modifie le temps de vie de luminescence d'ions d'europium.

Après cette expérience pionnière, de nombreuses démonstrations expérimentales ont montré que l'émission fluorescente peut être utilisée pour caractériser l'environnement. Il existe deux méthodes dans la littérature pour sonder expérimentalement la LDOS aux longueurs d'onde du visible en utilisant les émetteurs fluorescents : une méthode statistique et une méthode déterministe. La méthode statistique consiste à disperser les émetteurs fluorescents sur l'échantillon pour accéder à la distribution de la LDOS de l'échantillon, tandis que la méthode déterministe permet de cartographier la LDOS de l'échantillon avec une résolution nanométrique en utilisant des microscopes de champ proche.

C'est dans ce cadre général qu'interviennent mes travaux de thèse, qui porte sur l'utilisation d'une sonde fluorescente à balayage afin de caractériser les nanostructures plasmoniques et sur l'étude de l'influence de l'environnement plasmonique sur le transfert non-radiatif entre émetteurs fluorescents (FRET, *Förster resonance energy transfer*).

Le premier chapitre de cette thèse est une introduction générale à la fluorescence.

vironnement quelconque. Nous établissons les liens qui existent entre la modification de la puissance cédée par un dipôle classique, la modification du taux de désexcitation d'un système quantique à deux niveaux, le tenseur de Green et la LDOS. Ensuite, nous nous intéressons à l'expression du signal de fluorescence proprement dit. Ce premier chapitre a donc pour objectif de montrer comment le temps de vie et l'intensité de fluorescence sont affectés par l'environnement de l'émetteur.

Le chapitre 2 présente le montage expérimental de microscopie optique de champ proche avec une sonde fluorescente nanométrique que nous avons utilisée et optimisée au cours de ce travail de thèse. Cette sonde est constituée d'une pointe d'AFM à laquelle un émetteur fluorescent est gréffé. L'avantage majeur de ce montage est qu'il permet la cartographie simultanée de la LDOS, de l'intensité de fluorescence de l'émetteur fluorescent et de la topographie de l'échantillon. Dans ce chapitre, nous expliquons notamment la techniques de fabrication des sondes fluorescentes ainsi que le principe des parties AFM et optique du montage.

Le chapitre 3 présente les résultats que nous avons obtenus avec ce montage expérimental sur des nanoantennes optiques composées de disques d'or. Les cartes de l'intensité de fluorescence et du taux de désexcitation de l'émetteur fluorescent sont présentées ainsi que la topographie de l'antenne. Nous présentons aussi les simulations numériques que nous avons réalisées pour valider les résultats expérimentaux. Enfin, nous discutons de la résolution spatiale de la sonde fluorescente utilisée dans notre expérience.

Le chapitre 4 est consacré à la mesure des taux de désexcitation radiatif et nonradiatif. Nous présentons d'abord le théorème de réciprocité et ensuite son application au cas expérimental. Puis, nous présentons l'adaptation du montage expérimental pour appliquer le théorème de réciprocité. Nous rapportons nos résultats sur la cartographie de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif apparent sur des échantillons de nanoantennes. La comparaison avec les simulations numériques nous permet de consolider la méthode utilisée.

Concernant les deux derniers chapitres de cette thèse, nous nous intéressons à l'influence de l'environnement sur l'interaction entre deux émetteur fluorescents qui échangent de l'énergie non-radiativement. Le chapitre 5 est une introduction sur le mécanisme de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes et les paramètres qui le pilotent. Ensuite, nous présentons les études réalisées dans la littérature portant sur l'influence de l'environnement sur le transfert FRET. Enfin, nous proposons une expérience de FRET à longue portée engendré par plasmon de surface, dont le but ultime est d'apporter notre point de vue sur la façon dont le taux de transfert FRET dépend de la LDOS.

Le chapitre 6 présente la réalisation expérimentale de cette expérience de FRET à longue portée engendré par plasmon, à partir du choix du couple donneur-accepteur jusqu'à la mise en évidence des signatures du transfert d'énergie. Ensuite, nous présentons les montages expérimentaux que nous avons utilisé pour mettre en évidence le signal de FRET à longue distance. Enfin, nous présentons les résultats que nous avons obtenus sur l'expérience de FRET à longue portée sur des films d'or continu. La longue portée du FRET donne la possibilité d'étudier séparément l'influence de la LDOS expérimentée par le donneur et par l'accepteur sur le transfert FRET.

Chapitre I

Introduction sur la fluorescence

Table des matières

I.1 Émi	ssion spontanée	2
I.1.1	Principe de la fluorescence	2
I.1.2	Puissance émise par un dipôle oscillant classique	3
I.1.3	Taux de désexcitation d'un système quantique à deux niveaux	5
I.1.4	Équivalence entre puissance émise et temps de vie $\ldots \ldots \ldots$	6
I.2 Den	sité locale d'états électromagnétiques	7
I.2.1	Définition	7
I.2.2	Lien entre puissance émise, taux de désexcitation et LDOS	7
I.2.3	Taux de désexcitation radiatif et non-radiatif	8
I.3 Inte	nsité de fluorescence	9
I.4 Que	lques expériences pionnières et motivations	10
I.4.1	Expérience de Drexhage (1966)	10
I.4.2	Expérience de Buchler et al. (2005)	11
I.4.3	Motivations du présent travail de thèse	12
I.5 Con	clusion	13

Le sujet de mes travaux de thèse est l'étude de l'émission fluorescente en champ proche de nanostructures métalliques. L'étude du couplage entre un émetteur fluorescent et un milieu nanostructuré se fait par le biais de l'émission spontanée de l'émetteur fluorescent, dont certains paramètres clés tels que l'intensité et le taux d'émission spontanée sont sensiblement influencés par l'environnement physique de l'émetteur.

Dans ce chapitre, nous modélisons les émetteurs fluorescents que nous utilisons par des systèmes à deux niveaux. Nous présentons d'abord le calcul de la puissance émise par un dipôle oscillant classique et du temps de vie d'un système quantique à deux niveaux. Ensuite, nous relions ces deux grandeurs à la densité locale d'états électromagnétiques (LDOS, *Local density of states*), montrant que le temps de vie de l'émetteur fluorescent est proportionnel à l'inverse de la LDOS de l'environnement.

I.1 Émission spontanée

I.1.1 Principe de la fluorescence

Pour un émetteur fluorescent, le mécanisme d'émission est caractérisé par un temps de vie τ qui est le temps caractéristique pendant lequel l'émetteur reste dans son état excité avant de descendre à son état fondamental par émission d'un photon. De façon remarquable, le temps de vie n'est pas une propriété intrinsèque des émetteurs fluorescents, mais dépend du couplage des émetteurs avec l'environnement. Nous verrons plus loin dans ce chapitre qu'il nous renseigne sur une quantité fondamentale qui est la densité locale d'états électromagnétiques. Ce lien direct avec la LDOS a motivé l'intérêt que nous avons porté à la réalisation de mesures de temps de vie de nano-objets fluorescents en fonction de leur environnement au cours de cette thèse.

Les émetteurs fluorescents possèdent la propriété d'absorber un rayonnement lumineux (excitation) et d'émettre après un temps très bref sous forme d'émission de lumière (fluorescence) l'énergie qu'ils ont absorbée. La longueur d'onde d'émission fluorescente est plus élevée que celle du faisceau excitateur absorbé. La différence, entre la position du pic du spectre d'absorption et celle du pic de fluorescence est appelée le déplacement de Stokes.

Pour comprendre le phénomène, il est utile d'étudier le diagramme de Jablonski, qui décrit une molécule comme un système quantique avec des niveaux d'énergie discrets. Pour simplifier, nous limitons notre discussion à deux états électroniques comme présenté sur la figure I.1.

Supposons que la molécule soit initialement dans son état fondamental. Suite à l'absorption d'un photon, la molécule se trouve dans un nouvel état électronique plus éner-



Figure I.1 – Diagramme de Jablonski d'une molécule à deux niveaux électroniques.

gétique, l'état excité, donc instable. L'absorption d'un photon est un phénomène photophysique de très courte durée (10^{-15} s) [19]. Par relaxation vibrationnelle, la molécule atteint un état près du bord inférieur de la bande correspondant au niveau électronique excité. La molécule reste un certain temps dans cet état avant de retourner aux états fondamentaux par des processus radiatifs. Les relaxations vibrationnelles permettent à la molécule de revenir à son état fondamental correspondant au niveau électronique de plus basse énergie.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au temps de vie de l'état excité bas (le temps de vie de fluorescence), ainsi qu'au nombre de photons émis lorsque la molécule est soumise à un certain niveau d'excitation (intensité de fluorescence).

I.1.2 Puissance émise par un dipôle oscillant classique

Nous commençons par exprimer la puissance moyenne P cédée par un dipôle électrique classique, oscillant à la fréquence ω , à son environnement (on moyenne sur un temps grand devant la période d'oscillation $2\pi/\omega$).

La puissance moyenne rayonnée par une source décrite par une densité de courant, de la forme $\mathbf{j}(\mathbf{r}, t) = \operatorname{Re}[\mathbf{j}(\mathbf{r}) \exp(-i\omega t)]$, dans un milieu linéaire est donnée par [20]

$$P = -\frac{1}{2} \int_{V} \operatorname{Re}[\mathbf{j}^{*}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r})] d^{3}r \qquad (I.1)$$

où $\mathbf{E}(\mathbf{r})$ est le champ électrique à la positon \mathbf{r} , * désigne le complexe conjugué, Re la partie réelle et V est le volume occupé par la source.

Pour un dipôle électrique \mathbf{p} oscillant à la fréquence ω à la position \mathbf{r}_0 , orienté selon le vecteur unitaire \mathbf{u} ($\mathbf{p}=\mathbf{p}\mathbf{u}$), la densité de courant est

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}) = -i\omega\mathbf{p}\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \tag{I.2}$$

où δ est la distribution Dirac. La puis sance émise par ce dipôle électrique dans son environnement s'écrit donc :

$$P = \frac{\omega}{2} \operatorname{Im} \left[\mathbf{p}^*(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}_0) \right]$$
(I.3)

Nous pouvons utiliser le tenseur de Green G pour écrire le champ $\mathbf{E}(\mathbf{r})$ généré par le dipôle \mathbf{p} sous la forme

$$\mathbf{E}(r) = \mu_0 \omega^2 \mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{p} \tag{I.4}$$

 μ_0 est la perméabilité du vide. La fonction de Green permet de relier un dipôle source au champ électrique qu'il génère en tout point de l'espace en régime monochromatique. Le tenseur de Green est solution de l'équation de propagation suivante :

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, \omega) - \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon(\mathbf{r}, \omega) \mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, \omega) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \mathbf{I}$$
(I.5)

où ∇ est l'opérateur Nabla, I est le tenseur identité et $\epsilon(\mathbf{r}, \omega)$ la constante diélectrique de l'environnement. On choisit la solution satisfaisant la condition de rayonnement à l'infini (onde sortante).

En injectant l'équation I.4 dans I.3, la puissance rayonnée en $\mathbf{r} = \mathbf{r}_0$ peut être réécrite à l'aide du tenseur de Green :

$$P = \frac{\mu_0 \omega^3}{2} |\mathbf{p}|^2 \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{u} \right]$$
(I.6)

Nous pouvons donc calculer la puissance émise par un dipôle source en évaluant la partie imaginaire du tenseur de Green du milieu à la position du dipôle.

Dans le cas où le dipôle **p** se trouve dans le vide, la puissance P_0 peut être calculée en utilisant le tenseur de Green de l'espace libre \mathbf{G}_0 . L'expression de P_0 est :

$$P_0 = \frac{\mu_0 \omega^3}{2} \left| \mathbf{p} \right|^2 \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}_0(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{u} \right]$$
(I.7)

La partie imaginaire du tenseur de Green dans le vide à la position $\mathbf{r} = \mathbf{r}_0 \text{ est } [21]$:

$$\operatorname{Im}\left[\mathbf{u}\cdot\mathbf{G}_{0}(\mathbf{r}_{0},\mathbf{r}_{0},\omega)\mathbf{u}\right] = \frac{k_{0}}{6\pi}$$
(I.8)

où $k_0 = \omega/c$ avec c la vitesse de la lumière dans le vide.

En combinant les équations I.8 et I.7, la puissance émise par un dipôle électrique dans le vide devient :

$$P_0 = \frac{\omega^4}{12\pi\epsilon_0 c^3} \left|\mathbf{p}\right|^2 \tag{I.9}$$

En comparant les deux cas développés ci-dessus, un dipôle dans un environnement quelconque et un dipôle dans le vide, nous pouvons calculer la modification de la puissance émise par ce dipôle en divisant l'équation I.6 par l'équation I.9 :

$$\frac{P}{P_0} = \frac{6\pi}{k_0} \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{u} \right]$$
(I.10)

Il est important de remarquer que la puissance émise par un dipôle d'amplitude fixée **p** n'est pas une valeur intrinsèque au dipôle, mais dépend fortement de l'environnement. Nous allons montrer dans la suite que P/P_0 est proportionnelle à la modification du taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent (modélisé dans le formalisme quantique comme un système à deux niveaux d'énergie).

I.1.3 Taux de désexcitation d'un système quantique à deux niveaux

Considérons un système quantique à deux niveaux d'énergie tel que celui présenté sur la figure I.2(a). Lorsqu'il est dans l'état excité e, le système peut retourner à l'état fondamental g par des processus radiatifs. Si le système est excité à l'instant t = 0, la densité de probabilité $p_e(t)$ pour qu'il se désexcite entre t et t + dt vaut :

$$p_e(t) = \frac{1}{\tau} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \tag{I.11}$$

Le temps τ est appelé durée de vie de l'état excité. Expérimentalement, l'intervalle de temps pendant lequel le système reste dans son état excité avant de retourner à l'état fondamentale par émission d'un photon peut être déterminé en mesurant l'intervalle de temps entre l'émission de l'impulsion laser d'excitation et la réception sur une photodiode à avalanche du photon de fluorescence. En répétant cette mesure un grand nombre de fois, l'histogramme des t mesurés donne exactement $p_e(t)$ comme présenté sur la figure I.2(b). Le temps de vie du système peut être extrait par un ajustement mono-exponentiel. Les détails sur la mesure de temps de vie de la fluorescence d'un émetteur fluorescent seront présentés dans la section II.5.3.



Figure I.2 – (a) Représentation schématique du mécanisme d'émission spontanée pour un système quantique à deux niveaux. (b) Le déclin de fluorescence d'un émetteur fluorescent donne la probabilité de désexcitation de l'émetteur.

Nous définissons également le taux de désexcitation du système Γ comme l'inverse du temps de vie :

$$\Gamma = \frac{1}{\tau} \tag{I.12}$$

Un calcul perturbatif s'appuyant sur le règle d'or de Fermi permet de relier Γ au tenseur de Green [22] :

$$\Gamma = \frac{2}{\hbar} \mu_0 \omega^2 \left| \mathbf{p} \right|^2 \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{u} \right]$$
(I.13)

Ici, le tenseur de Green $\mathbf{G}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega)$ est défini comme dans le cas classique décrit dans la section I.1.2.

Dans le cas où l'émetteur se trouve dans le vide, le taux de désexcitation Γ_0 peut être calculé en utilisant l'équation I.13 :

$$\Gamma_{0} = \frac{2}{\hbar} \mu_{0} \omega^{2} \left| \mathbf{p} \right|^{2} \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}_{0}(\mathbf{r}_{0}, \mathbf{r}_{0}, \omega) \mathbf{u} \right] = \frac{\omega^{3}}{3\pi \hbar \epsilon_{0} c^{3}} \left| \mathbf{p}^{2} \right|$$
(I.14)

Nous pouvons maintenant calculer la modification du taux de désexcitation induite par l'environnement par rapport au taux de désexcitation dans le vide. Le calcul se fait en divisant l'équation I.13 par l'équation I.14 :

$$\frac{\Gamma}{\Gamma_0} = \frac{6\pi}{k_0} \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{u} \right]$$
(I.15)

Le taux de désexcitation spontané dépend donc aussi de l'environnement, comme dans le cas de la puissance émise par un dipôle classique. Ceci est un résultat central car il implique que l'influence de l'environnement peut être quantifiée à partir de la mesure du taux de désexcitation de l'émetteur. Sur ce résultat et sa relation avec la densité locale d'états électromagnétiques de l'environnement, que nous détaillerons dans la suite de ce chapitre, sont basées une grande partie des mesures que j'ai effectuées pendant ma thèse.

I.1.4 Équivalence entre puissance émise et temps de vie

En comparant les équation I.10 et I.15, nous retrouvons que la modification par rapport au vide de la puissance rayonnée par un dipôle classique est égale à la modification induite par l'environnement du taux de désexcitation d'un émetteur quantique :

$$\frac{P}{P_0} = \frac{6\pi}{k_0} \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{u} \right] = \frac{\Gamma}{\Gamma_0}$$
(I.16)

Cette égalité permet de prédire une quantité quantique Γ/Γ_0 à partir d'une quantité classique P/P_0 .

Dans la section suivante nous allons introduire une nouvelle grandeur, la densité locale d'états électromagnétiques et nous allons voir en quelle mesure elle est reliée à la puissance émise et au taux de désexcitation.

I.2 Densité locale d'états électromagnétiques

I.2.1 Définition

La densité locale d'état électromagnétiques (LDOS de l'anglais *Local Density of* States) partielle $\rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0, \omega)$, pour un dipôle orienté selon la direction \mathbf{u} , mesure le nombre de canaux de désexcitation disponibles à la position \mathbf{r}_0 et à la fréquence d'émission ω . Elle est appelé "partielle" puisque nous considérons un dipôle avec une orientation fixe.

La LDOS partielle peut être exprimée par le tenseur de Green de l'environnement calculé à la position \mathbf{r}_0 et à la fréquence ω [20] :

$$\rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0,\omega) = \frac{2\omega}{\pi c^2} \operatorname{Im}\left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_0,\mathbf{r}_0,\omega)\mathbf{u}\right]$$
(I.17)

Dans le cas où la puissance émise est moyennée sur les trois directions \mathbf{u}_x , \mathbf{u}_y et \mathbf{u}_z du dipôle, nous définissons la LDOS totale $\rho(\mathbf{r}_0, \omega)$ qui est égale à la somme de $\rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0, \omega)$ sur les orientations du dipôle de transition :

$$\rho(\mathbf{r}_0,\omega) = \sum_{\mathbf{u}=\mathbf{u}_x,\mathbf{u}_y,\mathbf{u}_z} \rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0,\omega) = \frac{2\omega}{\pi c^2} \operatorname{Im}\left[\operatorname{Tr}\left[\mathbf{G}(\mathbf{r}_0,\mathbf{r}_0,\omega)\right]\right]$$
(I.18)

Dans le cas particulier où le dipôle se trouve dans le vide, la LDOS partielle et la LDOS totale s'écrivent respectivement :

$$\rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0,\omega) = \frac{\omega^2}{3\pi^2 c^3}, \rho_0(\mathbf{r}_0,\omega) = \frac{\omega^2}{\pi^2 c^3}$$
(I.19)

I.2.2 Lien entre puissance émise, taux de désexcitation et LDOS

La définition de la LDOS introduite dans la section précédente permet de réécrire les expressions de la puissance rayonnée par un dipôle électrique classique et du taux d'émission spontanée d'un émetteur quantique.

En injectant l'équation I.17 dans I.6 et I.13, nous obtenons :

$$P_{\mathbf{u}} = \frac{\pi\omega^2}{4\epsilon_0} \left| \mathbf{p}^2 \right| \rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0, \omega) \tag{I.20}$$

 et

$$\Gamma_{\mathbf{u}} = \frac{\pi\omega}{\hbar\epsilon_0} \left| \mathbf{p}^2 \right| \rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0, \omega) \tag{I.21}$$

La puissance cédée par un dipôle classique à son environnement et le taux de désexcitation d'un émetteur quantique dépendent donc directement de la LDOS de l'environnement. De plus, nous pouvons réécrire l'équation I.16 en fonction du rapport entre la LDOS partielle du milieu dans lequel se trouve l'émetteur et du vide :

$$\frac{P}{P_0} = \frac{\Gamma}{\Gamma_0} = \frac{6\pi}{k_0} \operatorname{Im} \left[\mathbf{u} \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{u} \right] = \frac{3\rho_{\mathbf{u}}(\mathbf{r}_0, \omega)}{\rho_0(\omega)}$$
(I.22)

La relation I.22 est d'importance fondamentale pour les expériences de nanophotonique et en particulier pour toutes les expériences qui ont été menées au cours de ma thèse. En effet, elle permet, à partir de la mesure du taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent, d'avoir accès à la mesure d'une quantité aussi fondamentale et riche que la LDOS.

Il est à noter que P et Γ dépendent de l'orientation du dipôle, d'où l'utilisation de la LDOS partielle $\rho_{\mathbf{u}}$. Un émetteur fluorescent avec une orientation fixe ne donne accès qu'à la LDOS partielle mais pas à la LDOS totale. Afin d'obtenir la LDOS totale, il faut en principe répéter trois fois les mesures en utilisant des émetteurs fluorescents de moments dipolaires orthogonaux ou utiliser un ensemble d'émetteurs avec des orientations aléatoires.

I.2.3 Taux de désexcitation radiatif et non-radiatif

Le taux de désexcitation Γ intègre tous les canaux de désexcitation disponibles pour l'émission spontanée. Il peut se décomposer en deux parties : le taux de désexcitation radiatif Γ^R correspondant à l'émission d'un photon réel en champ lointain, et le taux de désexcitation non-radiatif Γ^{NR} correspondant à l'absorption par l'environnement. En négligeant le taux de désexcitation non-radiatif interne à l'émetteur, hypothèse qui est vérifiée pour un émetteur quantique présentant un rendement quantique intrinsèque proche de l'unité, le taux de désexcitation total peut se décomposer de la manière suivante :

$$\Gamma = \Gamma^R + \Gamma^{NR} \tag{I.23}$$

Nous pouvons définir les taux de désexcitation radiatif Γ_R et non-radiatif Γ_{NR} en utilisant la théorie classique . Pour un dipôle classique, la puissance cédée à l'environnement peut être séparée en contribution radiative et non-radiative. La contribution radiative P^R correspond à la puissance rayonnée en champ lointain, et elle s'écrit :

$$P^{R} = \int_{S} \frac{\epsilon_{0}c}{2} \left| \mathbf{E}(\mathbf{r}) \right|^{2} d^{2}r \tag{I.24}$$

où S est la surface d'une sphère de rayon $R \to \infty$ qui contient l'émetteur et le milieu structuré. La contribution non-radiative P^{NR} correspond à l'absorption par l'environnement et s'écrit :

$$P^{NR} = \int \frac{\epsilon_0 \omega}{2} \operatorname{Im} \left[\epsilon(\mathbf{r}, \omega) \right] \left| \mathbf{E}(\mathbf{r}) \right|^2 d^3 r \qquad (I.25)$$

où l'intégrale est effectuée sur tout l'espace.

A partir de l'équation I.16, nous pouvons définir les taux de désexcitation radiatif et non-radiatif en utilisant leur lien avec P^R et P^{NR} :

$$\frac{\Gamma^R}{\Gamma_0} = \frac{P^R}{P_0} \tag{I.26}$$

$$\frac{\Gamma^{NR}}{\Gamma_0} = \frac{P^{NR}}{P_0} \tag{I.27}$$

Comme le taux de désexcitation est proportionnel à la LDOS (voir l'équation I.21), nous pouvons aussi définir la LDOS radiative et non-radiative :

$$\rho(\mathbf{r}_0,\omega) = \rho^R(\mathbf{r}_0,\omega) + \rho^{NR}(\mathbf{r}_0,\omega)$$
(I.28)

La séparation des contributions radiatives et non-radiatives est un point clé dans le domaine de la plasmonique [23]. Dans le chapitre IV, nous présentons en détail la méthode que nous utilisons pour les séparer expérimentalement en exploitant la mesure simultanée de l'intensité de fluorescence et du temps de vie de l'émetteur. Dans la section suivante, nous allons parler plus en détail des paramètres dont dépend l'intensité de fluorescence.

I.3 Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence et le temps de vie de l'émetteur apportent des informations différentes. Une mesure de temps de vie τ de l'état excité d'un émetteur fluorescent fournit une mesure directe de la LDOS (équation I.21), tandis que l'intensité de la fluorescence dépend de plusieurs paramètres, tels que le facteur d'exaltation locale K^2 , qui caractérise la modification de l'intensité incidente due à la présence de l'environnement, et le rendement quantique apparent η , qui caractérise la probabilité qu'un photon soit émis en champ lointain lorsqu'un émetteur fluorescent se désexcite.

L'intensité de fluorescence I_{fluo} s'écrit donc

$$I_{fluo} = A\sigma(\omega_{exc}) \left[\int_{\Omega} \eta(\omega_{fluo}, \mathbf{u}_{\Omega}) d\Omega \right] K^2(\mathbf{r}, \omega_{exc}) I_{inc}$$
(I.29)

Dans cette équation, A est un paramètre de calibration de la chaîne de détection réelle. $\sigma(\omega_{exc})$ est la section efficace d'absorption de l'émetteur fluorescent, \mathbf{u}_{Ω} caractérise une direction d'émission et Ω est l'angle solide de détection. ω_{exc} et ω_{fluo} sont respectivement la fréquence d'excitation et d'émission de l'émetteur et I_{inc} l'intensité du champ qui éclaire l'émetteur dans son environnement.

Le facteur d'exaltation locale est défini comme suit :

$$K^{2}(\mathbf{r},\omega_{exc}) = \frac{|\mathbf{u}\cdot\mathbf{E}_{exc}(\mathbf{r},\omega_{exc})|^{2}}{|\mathbf{u}\cdot\mathbf{E}_{inc}(\mathbf{r},\omega_{exc})|^{2}}$$
(I.30)

où $\mathbf{E}_{inc}(\mathbf{r}, \omega_{exc})$ est le champ qui excite la fluorophore en l'absence d'interaction avec l'environnement, tandis que $\mathbf{E}_{exc}(\mathbf{r}, \omega_{exc})$ est le champ modifié à cause de l'interaction avec l'environnement.

Le rendement quantique apparent dans la direction de détection \mathbf{u}_{Ω} est défini comme

$$\eta(\mathbf{r}, \omega_{fluo}, \mathbf{u}_{\Omega}) = \frac{\Gamma^{R}(\mathbf{u}_{\Omega})}{\Gamma^{R} + \Gamma^{NR}}$$
(I.31)

où $\Gamma^{R}(\mathbf{u}_{\Omega})$ est le taux de désexcitation radiatif dans la direction \mathbf{u}_{Ω} . Dans cette définition, nous considérons des émetteurs fluorescents qui présentent un taux de désexcitation non-radiatif intrinsèque négligeable.

I.4 Quelques expériences pionnières et motivations

I.4.1 Expérience de Drexhage (1966)

Comme discuté précédemment, le temps de vie de l'état excité d'un émetteur n'est pas intrinsèque à l'émetteur et dépend fortement de l'environnement électromagnétique local. L'équation I.21 montre que le taux de désexcitation d'un émetteur dépend linéairement de la LDOS de l'environnement. Deux types d'expériences peuvent être imaginées en utilisant ce lien entre le taux de désexcitation spontané et la LDOS. (1) Il est possible de contrôler le taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent en le plaçant dans un milieu dont la LDOS est contrôlée. Par exemple, il est possible de réduire le taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent par rapport au vide en le plaçant dans un cristal photonique. En effet, les cristaux photoniques présentent des bandes spectrales interdites. Si l'émission de fluorophore a lieu pour des longueurs d'onde comprises dans la bande interdite du cristal, l'émission fluorescente peut être fortement inhibée et le taux de désexcitation très petit. Dans le cas opposé, nous pouvons concevoir des matériaux nanostructurés à proximité desquels la probabilité de désexcitation fluorescente est exaltée. Cela peut être le cas par exemple d'une nanoantenne plasmonique. (2) Il est possible de mesurer la LDOS en utilisant un émetteur fluorescent comme sonde d'un milieu inconnu. La modification de son temps de vie de fluorescence par rapport au vide donne alors la modification de la LDOS par rapport au vide. C'est dans ce dernier cas que se placent les études que nous avons réalisées au cours de ma thèse. Nous avons utilisé un émetteur fluorescent comme une sonde fluorescente pour caractériser l'environnement inconnu, et avons développé un instrument sensible au contraste de LDOS. De plus, la mesure simultanée du taux de desexcitation et de l'intensité de fluorescence à proximité d'une nanostructure nous a permis de mesurer séparément le taux de désexcitation (et donc la LDOS) radiatif et non-radiatif.

La première expérience qui a mis en évidence expérimentalement la modification du taux de désexcitation en fonction de l'environnement local a été réalisée par Drexhage en 1966 [1, 18]. Cette expérience consiste à mesurer le temps de vie de fluorescence d'émetteurs à proximité d'un miroir d'argent en fonction de la distance d émetteurs-surface. Le résultat de la mesure est présenté sur la figure I.3.

Le temps de vie de l'émetteur fluorescent, défini comme $\tau = 1/\Gamma$, est mesuré à différentes distances d du miroir. Des oscillations du temps de vie sont constatées pour une distance d entre 30 et 500 nm. Elles résultent de l'interaction entre le champ émis par les émetteurs et le même champ réfléchi sur le miroir. Une chute brutale du temps de vie peut être observée quand la distance continue à diminuer en raison du transfert d'énergie non-radiatif dans le métal qui se produit lorsque les émetteurs sont très près de la surface.



Figure 1.3 – Temps de vie de fluorescence des ions Eu3+ en fonction de la distance émetteurs-surface d mesuré expérimentalement (points) et les calculs théoriques (courbes continue noire). Image tirée de la référence [1].

Le temps de vie des émetteurs fluorescents permet de sonder des variations très petites de la LDOS. C'est une méthode très sensible. Il est à noter que la LDOS mesurée est une moyenne spatiale de la LDOS sur le volume de l'émetteur, la résolution dépend donc de la taille de l'émetteur fluorescent que nous utilisons.

I.4.2 Expérience de Buchler et al. (2005)

Mis à part le taux de désexcitation, l'intensité de fluorescence dépend aussi de l'environnement, qui est représenté par le facteur d'exaltation locale K^2 et le rendement quantique η . En effet, dans l'équation I.29, K^2 et η dépendent de la position de l'émetteur dans l'environnement.

Buchler et al. [2] ont reproduit l'expérience que Drexhage avait réalisé en remplaçant une monocouche de molécule de Eu3+ par une molécule fluorescente unique (Terrylène). Cette fois, l'intensité de fluorescence ainsi que le temps de vie de fluorescence de la molécule face au miroir d'argent sont mesurés. Les résultats sont présentés sur la figure I.4. La courbe (a) représente l'intensité de fluorescence face au miroir d'argent théorique et expérimentale, la courbe (b) le temps de vie de la molécule et la courbe (c) l'intensité d'excitation à la position de la molécule. Il est à noter qu'un comportement similaire de temps de vie a aussi été observé dans l'article en approchant un nanoparticule d'or vers un substrat de verre.

Nous pouvons aussi observer des oscillations sur la courbe d'intensité de fluorescence quand la distance émetteur-échantillon est entre 100 et 1000 nm, et aussi une diminution rapide de l'intensité de fluorescence quand cette distance tend vers zero. Cette oscillation résulte d'une modulation de la distribution angulaire de l'émission fluorescente en fonction de la distance qui sépare le dipôle du miroir métallique. L'intensité de fluorescence est donc très sensible à la position de l'émetteur par rapport à l'échantillon.



Figure I.4 – Intensité (a) et temps de fluorescence (b) d'une molécule unique face à un miroir d'argent. (c) Intensité d'excitation à la position de la molécule. Courbe tirée de la référence [2].

Les oscillations de l'intensité de la fluorescence et du temps de vie de la molécule sont clairement corrélées car elles sont toutes deux sensibles aux effets de retard du champ émis par le dipôle fluorescent et réfléchi sur le miroir. L'intensité de la fluorescence et le temps de vie portent des informations différentes. Il est intéressant de combiner les deux mesures afin d'avoir le plus d'informations possible sur l'environnement.

I.4.3 Motivations du présent travail de thèse

En plus des mesures de la LDOS et de l'intensité en fonction de la distance d émetteuréchantillon, nous pouvons mesurer la variation de la LDOS dans un plan parallèle à l'échantillon, à d fixe, afin de réaliser des cartes de LDOS et d'intensité en champ proche de l'échantillon. Ceci va permettre de caractériser la distribution du champ électromagnétique sur l'échantillon.

Un des buts de ma thèse a été donc de d'modifier et optimiser un montage expérimental existant qui permet de réaliser simultanément des cartes du taux de désexcitation et de l'intensité de fluorescence avec une résolution nanométrique en champ proche des nanostructures. Pour cela, le positionnement spatial précis de l'émetteur fluorescent par rapport à l'échantillon est indispensable. Le but ultime de cette thèse est de comprendre comment le taux de desexcitation et l'intensité de la fluorescence peuvent être pilotés par le positionnement d'un émetteur dans un environnement photonique.

Afin de répondre à cette question, nous avons mis au point un dispositif expérimental qui est capable de cartographier la LDOS et l'intensité de la fluorescence de tout échantillon. Ce système sera présenté dans le chapitre II et les résultats obtenus concernant la cartographie de la LDOS et de l'intensité de fluorescence en champ proche de nanoantennes plasmoniques seront présentés au chapitre III. Au moment où nous avons réalisé ce développement, il n'existait, à notre connaissance, qu'un seul dispositif analogue [24]. Après avoir atteint l'état de l'art, nous avons cherché à exploiter la complémentarité d'information disponible dans les cartes d'intensité et de taux de désexcitation de fluorescence, combinée avec une configuration expérimentale compatible avec l'application du théorème de réciprocité, pour établir des cartes de taux de pertes radiatives et non-radiatives, sur base d'un modèle purement analytique. Les résultats obtenus dans ce cadre seront décrits dans le chapitre IV. L'utilisation de cette sonde fluorescente va nous permettre d'étudier en détail l'interaction d'un émetteur fluorescent avec un environnement nanostructuré métallique ou diélectrique et d'étudier le couplage par l'environnement de deux émetteurs fluorescents. Ceci a été le sujet de recherche de ma dernière année de thèse et une mise en contexte ainsi que des résultats préliminaires seront présentés dans les chapitres V et VI de ce manuscrit.

I.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons introduit les concepts fondamentaux sur l'émission d'un émetteur fluorescent et comment décrire l'influence de l'environnement sur cette émission fluorescente.

Le résultat principal du chapitre est l'équation I.22. La première égalité affirme que la modification du taux de désexcitation Γ/Γ_0 d'un système quantique à deux niveaux dans un environnement est égale à la modification de la puissance P/P_0 cédée par un dipôle classique oscillant placé au même endroit. Nous pouvons donc prédire une quantité quantique Γ/Γ_0 à partir d'une quantité classique P/P_0 .

La deuxième égalité décrit que la modification du taux de désexcitation de l'émetteur fluorescent dépend de l'environnement (décrit par le tenseur de Green). Ceci implique que l'influence de l'environnement peut être quantifiée à partir de la mesure du taux de désexcitation de l'émetteur.

Dans la troisième égalité, nous avons relié ces grandeurs à la densité locale d'états électromagnétiques, qui est une grandeur fondamentale en physique. Cette égalité affirme qu'il est possible de mesurer les variations de la LDOS d'un environnement donné en mesurant la variation du taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent placé dans cet environnement.

Les expériences que nous allons présenter dans la suite de ce manuscrit sont basées en grande partie sur cette équation. Nous allons présenter dans les chapitres qui suivent comment nous avons utilisé les mesures de taux de désexcitation et d'intensité de la fluorescence des émetteurs pour caractériser l'environnement où se trouve l'émetteur fluorescent.

Chapitre II

Montage expérimental

Table des matières

II.1 Principe de l'expérience	16
II.2 Microscope AFM en mode shear force	18
II.3 Implémentation d'une nouvelle tête de balayage	19
II.3.1 Positionnement de la pointe AFM	20
II.3.2 Electronique de contrôle : Développement d'un amplificateur à	
bas bruit \ldots	22
II.3.3 Performances de l'AFM	25
II.4 Sonde fluorescente	26
II.4.1 Fabrication des pointes	26
II.4.2 Choix de la source fluorescente	29
II.4.3 Protocole d'accroche	33
II.5 Montage expérimental : Schémas de l'expérience	34
II.5.1 Excitation	36
II.5.2 Détection	37
II.5.3 Mesure d'intensité et de temps de vie	39
II.6 Conclusion	40
II.1 Principe de l'expérience

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent (le chapitre I), la mesure de la LDOS est directement liée à la mesure du taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent dans un environnement donné. Deux approches expérimentales différentes sont envisageables et ont été rapportées dans la littérature : (1) les émetteurs fluorescents sont dispersés aléatoirement à la surface ou à l'intérieur d'un milieu nanostructuré [25]. (2) l'émetteur fluorescent est balayé à la surface de la nanostructure à l'aide d'une pointe de microscope à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscope*) [26]. La première méthode permet d'effectuer des études statistiques, tandis que la deuxième permet de déplacer avec une précision nanométrique l'émetteur et donc d'avoir une caractérisation précise de la LDOS en champ proche d'un milieu nanostructuré.

Des études statistiques de variation de LDOS utilisant la mesure de temps de vie de fluorescence des émetteurs avaient été menées au sein de l'équipe avant le début de ma thèse de doctorat. Des billes fluorescentes de 25 nm de diamètre sont dispersées aléatoirement sur des échantillon d'or semi-continus avec un spacer de SiO_2 de différentes épaisseurs. Les temps de vie des billes fluorescentes sont mesurés un à un. Une première étude avait montré que les fluctuations spatiales de la LDOS présentent un maximum pour les films d'or semi-continus près de la percolation [6]. Ensuite, l'influence de la distance entre les émetteurs et le film d'or semi-continu sur la distribution de la LDOS avait été démontrée [25]. Afin de réaliser une caractérisation complète du champ électromagnétique en champ proche d'un milieu nanostructuré avec une résolution nanométrique, nous avons décidé de développer un montage expérimental qui permette de contrôler la position d'un émetteur fluorescent au nanomètre près. Il utilise une sonde fluorescente à balayage fixée sur une pointe de microscope à force atomique (AFM). L'objectif est de réaliser un instrument permettant la cartographie simultanée de la topographie, de l'intensité de fluorescence et du taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent en champ proche d'un milieu nanostructuré. La figure II.1 représente un schéma simplifié du montage expérimental que nous avons développé.

Une pointe d'AFM à laquelle un émetteur fluorescent est accroché est montée sur un système piézoélectrique permettant d'effectuer des déplacements nanométriques dans trois directions orthogonales. L'objet fluorescent est excité par l'intermédiaire d'un objectif de microscope qui se trouve sous l'échantillon (voir la figure II.1) et la lumière émise par fluorescence est récoltée par le même objectif. Le système de nanopositionnement à trois axes permet de placer l'émetteur fluorescent en correspondance avec le point focal objet de l'objectif. La position de l'échantillon peut être changée à l'aide d'un deuxième positionneur piezo-électrique à trois axes. Une boucle de rétroaction agissant sur l'axe Z (orthogonal au plan de l'échantillon) permet de maintenir constante la distance entre



Figure II.1 – Schéma de principe de la sonde fluorescente à balayage en mode shear-force. L'échantillon est monté sur une platine piézoélectrique à trois axes de translation orthogonaux. Un objectif de microscope à grande ouverture numérique est positionné sous l'échantillon. Il permet d'exciter et récolter la fluorescence du nano-émetteur fluorescent greffé à la pointe AFM située au dessus de l'échantillon.

l'échantillon et l'émetteur fluorescent grâce à une régulation par *shear force*. Ce système nous permet de positionner l'émetteur fluorescent dans la région où le faisceau d'excitation est focalisé, et ainsi de mesurer son intensité de fluorescence et son temps de vie de fluorescence.

Pour effectuer une cartographie de l'intensité de fluorescence et du temps de vie de fluorescence, la pointe reste immobile dans la région où le faisceau d'excitation est focalisé pendant que l'échantillon balaye dans le plan horizontal XY. En chaque point du balayage, nous enregistrons la position verticale (Z) de l'échantillon nécessaire à maintenir constante la distance pointe-échantillon (via la rétroaction), l'intensité de fluorescence et le temps de vie de fluorescence de la nano-source. La topographie de l'échantillon, la carte de l'intensité de fluorescence et la carte de la LDOS sont reconstituées à la fin du balayage.

La réalisation d'un tel dispositif expérimental reste assez ardue. Premièrement, la précision de déplacement latérale de la sonde fluorescente par rapport à l'échantillon doit être plus petite que l'échelle caractéristique de la variation de la LDOS. Deuxièmement, l'émetteur fluorescent doit répondre à certaines contraintes en termes de taille, intensité, temps de vie et stabilité. Ceci demande une large exploration des candidats en tant qu'émetteurs fluorescents et une technique d'accrochage facilement adaptable à différents émetteurs. Troisièmement, la mesure de temps de vie et de l'intensité de la fluorescence doit être effectuée dans un temps assez bref en chaque position du balayage pour limiter le temps d'acquisition, et donc une distorsion des mesures due aux instabilités mécaniques et aux dérives thermiques. La stabilité du positionnement est un point critique dans nos mesures puisque la durée des acquisitions des cartes est de l'ordre de 30 minutes.

Dans ce chapitre, nous décrivons la façon dont nous avons répondu à ces trois exigences. Dans un premier temps, nous présentons l'implémentation d'une nouvelle tête de balayage avec son électronique de contrôle pour améliorer les performances de l'AFM. Ensuite, nous présentons les critères utilisés pour choisir la source fluorescente adaptée à notre expérience et quelques types de sources fluorescentes que j'ai testées au cours de ma thèse. Enfin, nous présentons le montage expérimental que nous avons développé permettant d'acquérir simultanément l'intensité de fluorescence, le temps de vie de l'émetteur fluorescent, et la topographie de l'échantillon.

II.2 Microscope AFM en mode shear force

Pour les besoins de notre expérience, nous avons développé un microscope à force atomique (AFM) afin de contrôler la distance entre la pointe et l'échantillon. La pointe d'AFM, qui est constituée d'une fibre optique étirée, est posée avec une contrainte sur un bras d'un diapason en quartz (voir la figure II.2(a)) dont le mode fondamental de vibration résonne à $2^{15} = 32768$ Hz. Le diapason est collé de côté sur une pastille piézoélectrique pour que les deux bras soient parallèles à la surface de l'échantillon comme schématisé sur la figure II.2(b). Lorsque le diapason est excité mécaniquement par la vibration de la pastille piézo-électrique, les bras s'écartent et se rapprochent d'une certaine distance (de l'ordre de 10 nm dans notre cas) en fonction de l'amplitude d'excitation. La déformation des bras génère un courant très faible, de l'ordre du nA.



Figure II.2 – (a) Photographie du diapason utilisé dans l'expérience. (b) Vue de face de la disposition de la pointe par rapport au diapason.

Quand l'ensemble pointe/diapason/pastille piézoélectrique est monté sur le système, l'amplitude d'oscillation est mesurée à travers le courant aux bornes des deux pattes du diapason. Ce courant, qui dépend de l'amplitude de vibration du diapason, est utilisé comme signal de rétroaction pour la régulation de la distance entre la pointe et l'échantillon. Deux modes existant pour l'asservissement AFM sont présentés dans la suite [27].

Le mode contact (voir la figure II.3(a)) fonctionne avec un cantilever dont la raideur est plus petite que le diapason, du type de ceux que nous trouvons sur les AFM commerciaux. Il consiste à maintenir une déflexion du cantilever constante et donc aussi la force qui s'exerce sur la pointe. Dans le mode contact, la pointe est à seulement quelques angströms de la surface durant le balayage, et sa hauteur suit le relief de l'échantillon. Le signal de rétroaction provient des forces répulsives exercées sur la pointe à très courte distance de la surface de l'échantillon. Le principe d'asservissement consiste à maintenir ce signal à une valeur de référence. A l'approche d'un obstacle, la force répulsive va avoir tendance à augmenter puisque la distance entre la pointe et l'échantillon diminue, mais le système de rétroaction va réagir en montant la pointe pour maintenir la force mesurée à la valeur de référence. L'avantage de ce mode est que la vitesse de balayage peut être assez grande et que la pointe peut imager des échantillons avec une rugosité verticale assez élevée. L'inconvénient est que le "contact" peut endommager les échantillons, particulièrement les échantillons biologiques, comme les cellules dont la membrane est souvent très fragile.



Figure II.3 – Modes de fonctionnement AFM. (a) Contact mode. (b) Non-contact mode.

Si le mode contact présente des risques pour l'échantillon ou la sonde, un mode de balayage plus doux est le mode oscillant. Dans cette configuration, la pointe oscille (verticalement en mode *tapping* ou horizontalement en mode *shear force*, voir la figure II.3(b)). Lorsque la distance pointe/échantillon atteint quelques nanomètres, des forces apparaissent et modifient l'amplitude de vibration de la pointe. En réaction, le système va imposer à la pointe de monter pour conserver l'amplitude de consigne de vibration de la pointe. Dans la pratique, l'amplitude de consigne est fixée à environ 90% de l'amplitude d'oscillation libre, qui est mesurée quand l'échantillon est hors de portée de la pointe. Plus l'amplitute de consigne est faible, plus le contact entre la pointe et l'échantillon est franc. Dans un système qui utilise un diapason oscillant tel que le nôtre, l'amplitude de consigne est fixée très près de l'amplitude libre pour minimiser les risques d'endommager la surface de l'échantillon en produisant une force d'interaction pointe-échantillon trop importante.

Le mode que nous utilisons est le mode *shear force* qui utilise les forces de cisaillement et de friction. Dans cette configuration, la pointe oscille parallèlement à la surface de l'échantillon. L'émetteur accroché sur la pointe se situe donc toujours à la même distance de l'échantillon et sonde la LDOS à la même hauteur. Bien que plus doux que le mode contact, le mode *shear force* peut néanmoins déplacer des nanostructures. Un exemple sera montré dans le chapitre III.

II.3 Implémentation d'une nouvelle tête de balayage

Dans la section précédente, nous avons discuté du signal que nous détectons suivant la déformation des bras du diapason. Ce courant que le diapason génère est très petit, souvent de l'ordre du nA pour les expériences que nous réalisons dans l'équipe. La performance du système AFM dépend de deux facteurs : (1) le positionnement exact de la pointe AFM par rapport au diapason; (2) la mesure et l'amplification du signal électrique issu du diapason. Dans cette partie, nous présentons l'ancien système utilisé pour le positionnement de la pointe de la pointe de la pointe et détaillons les améliorations apportées dans la suite de cette partie.

Ce travail a été réalisé pendant le stage de Michele Calabrese dans le cadre d'un

échange entre l'ESPCI et l'Imperial College London. Le système électrique a été conçu en étroite collaboration avec Max Lesaffre alors post-doctorant à l'Institut Langevin.

II.3.1 Positionnement de la pointe AFM

Les diapasons en quartz sont réputés pour leurs facteur de qualité mécanique Q très élevé (de 10³ à 10⁵) ce qui les rend sensibles à des forces de friction et de cisaillement très faibles, lorsqu'ils sont excités à leur fréquence de résonance ω_0 . Le facteur de qualité peut varier selon le positionnement de la pointe sur le diapason. De plus, il régule le temps de réponse τ du système aux perturbations qui s'écrit $\tau = 2\sqrt{3}Q/\omega_0$ [20]. Plus le facteur de qualité est grand, plus le temps de réponse du système est long, ce qui limite la vitesse du balayage. Une bonne topographie demande un compromis entre les deux paramètres. Une fois le compromis trouvé, il est important d'avoir le même facteur de qualité pour différents diapasons et différentes pointes. Comme la pointe applique une contrainte au diapason, elle modifie brutalement son facteur de qualité qui passe de $10^3 - 10^5$ pour le diapason libre à quelques centaines pour le diapason avec pointe. Pouvoir reproduire précisement le positionnement de la pointe sur le diapason est donc crucial pour pouvoir travailler toujours avec le même facteur de qualité. Pour la tête de balayage que nous utilisions au début de ma thèse (voir la figure II.4), la mise en place de la pointe et la détection de la vibration des bras n'étaient pas optimales.

Sur cette tête de balayage, un tube métallique collé sur un aimant est utilisé comme support de la pointe. La pointe est insérée dans le tube et ensuite posée sur le bras haut du diapason de façon à ce que la pointe s'appuie légèrement sur le bras du diapason. Dans cette configuration, le positionnement de la pointe AFM n'est pas facilement reproductible.



Figure II.4 – (a) Ancienne tête de balayage. (b) Vue de coté du positionnement de la pointe par rapport à la seringue et au bras du diapason.

La figure II.4(b) montre une vue de coté du positionnement de la pointe par rapport au tube métallique et au bras du diapason. En plus de la force avec laquelle la pointe s'appuie sur le bras du diapason, il y a trois distances importantes à respecter pour le positionnement de la pointe. La distance entre l'extrémité de la pointe et le bras du diapason d_1 , la plus importante, doit être la plus petite possible pour une transmission de force efficace. Quand la pointe est en contact avec l'échantillon, des forces vont s'exercer sur le bout de la pointe en causant une variation de l'amplitude de vibration; la pointe doit alors être suffisamment rigide pour transmettre cette variation au bras du diapason. La distance d_2 et la force appliquée sur le diapason contrôlent le facteur de qualité de l'ensemble pointe/diapason. Le contrôle du facteur de qualité est important pour régler à la fois la sensibilité et le temps de réponse du système. Enfin, d_3 détermine en partie la sensibilité du système AFM. Plus la pointe est positionnée vers le bout du bras, plus le système est sensible.

Dans la première configuration, il était difficile de garder les trois distances constantes lorsque nous changions de pointe puisqu'il n'y avait pas de point de repère. Afin de réduire les degrés de liberté pour le positionnement de la pointe, nous avons conçu une nouvelle tête de balayage présentée sur la figure II.5. Les détails de cette nouvelle tête de balayage sont présentés dans la référence [28]. Ici nous rappelons uniquement les éléments essentiels.



Figure II.5 – Nouvelle tête de balayage.

Le tube métallique est fixé dans une rainure entre deux plaques métalliques à proximité du diapason. A la différence de l'ancienne tête de balayage, le tube métallique a besoin d'être positionné précisément seulement quand nous changeons de diapason. Les distances d_2 et d_3 sont ensuite fixées et ne changent pas même si nous changeons de pointe. Il suffit désormais de régler la longueur de la pointe qui dépasse de la seringue pour fixer d_1 . Le positionnement exact de la pointe est ainsi possible. Le changement de pointe est facilité par l'utilisation d'une translation mécanique (modèle Elliot Scientific MDE265). Les deux plaquettes métalliques qui tiennent la seringue sont montées sur la translation. Celle-ci permet un déplacement maximum de 1, 5mm dans les deux directions. Lorsqu'une pointe est cassée, il suffit de translater le tube dans une direction pour l'éloigner du diapason et revenir à la position initiale une fois la pointe changée.

Une autre grande amélioration sur ce nouveau système est l'implantation d'un amplificateur transimpédance embarqué sur la tête de balayage qui est directement relié aux bras du diapason. Dans cette configuration, le signal électrique provenant du diapason est récupéré directement par l'amplificateur transimpédance. Le signal est ensuite amplifié et envoyé au système d'électronique de contrôle. Le design et la fabrication de la transimpédance sont détaillés dans la section suivante.

II.3.2 Electronique de contrôle : Développement d'un amplificateur à bas bruit

La performance de notre système AFM, qui fonctionne en mode *shear force*, dépend directement de la mesure du signal électrique généré par le diapason pour la rétroaction. Il est donc nécessaire de connaître le fonctionnement du diapason en quartz que nous utilisons.

Un diapason oscillant engendre des charges électrique sur ses électrodes. Ainsi, il peut être considéré comme un générateur de courant dont l'intensité est proportionnelle à l'amplitude de la courbure mécanique des deux bras. Quand le diapason oscille, la mesure du mouvement d'oscillation correspond à une mesure de l'impédance $Z(\omega)$ ou de l'admittance $Y(\omega)$. L'impédance du diapason peut être modélisée par un circuit équivalent électronique de Butterworth-Van-Dyke [29] comme présenté sur la figure II.6.



Figure II.6 – Circuit équivalent du diapason.

Le résonateur LRC modélise la résonance mécanique du diapason : l'inductance L_{tf} est liée à la masse effective et correspond à la capacité de stockage de l'énergie cinétique, la capacité C_{tf} reflète la capacité de stockage de l'énergie potentielle, et est liée à la constante de raideur, et la résistance R_{tf} modélise les phénomènes dissipatifs. La capacité parallèle C_p modélise l'effet des contacts électriques. L'impédance du diapason s'exprime donc sous la forme :

$$Z(\omega) = \left[j\omega C_p + \frac{1}{R_{tf} + j\omega L_{tf} + \frac{1}{j\omega C_{tf}}}\right]^{-1}$$
(II.1)

Le faible courant délivré par le diapason quand il oscille nécessite une amplification et une conversion en tension pour être introduit dans le système de rétroaction. Pour réaliser cela, un amplificateur de transimpédance qui convertit le courant en tension est implémenté (Figure II.7).

Ici, la résistance R_{TI} convertit le courant i_{TF} du diapason en une tension selon la loi d'Ohm $V_{out} = -R_{TI}i_{TF}$. R_{TI} est donc le gain de la transimpédance. Le choix de l'amplificateur opérationnel et de R_{TI} doit minimiser le bruit généré par la transimpédance et correspondre à la bande passante de fonctionnement du système.

Choix de l'amplificateur opérationnel (AOP)

Un AOP idéal peut amplifier la différence de potentiel électrique présente à ses deux entrées sans introduire de bruit supplémentaire à la sortie. L'AOP parfait possède une



Figure II.7 – Circuit de transimpédance. Le diapason fonctionne comme un générateur de courant.

impédance d'entrée et une bande passante infinie alors que sa résistance de sortie et le bruit ajouté sont nuls. Quant à un AOP réel, il doit être modélisé avec des paramètres non-infinis ou non-nuls. La conception d'un circuit électrique doit prendre en compte ces effets pour la performance globale du circuit final. Certains paramètres représentent des limites réelles de la performance finale.

- Impédance d'entrée L'impédance d'entrée pour un AOP est définie comme l'impédance entre les deux entrées. Celle-ci doit être maximisée pour limiter le courant entre les deux entrées.
- Courant de fuite En raison des imperfections de fabrication, une petite quantité de courant circule dans les entrées. Quand comme dans notre cas des grandes résistances sont utilisées dans le circuit, ces petits courants peuvent produire de grandes chutes de tension en sortie du montage. Il faut donc prendre un AOP avec un courant de fuite le plus petit possible.
- Bruit de tension L'AOP génère une tension aléatoire à la sortie même s'il n'y a pas de signal appliqué. Cela peut être dû au bruit thermique et aux bruits de grenaille des composants. Ce bruit est à minimiser pour les applications avec un gain élevé comme dans notre cas.

Nous avons considéré deux types d'AOPs, bipolaire et FET (Field Effect Transistor). En prenant en compte les caractéristiques typiques de ces deux AOPs listées dans le tableau II.1, nous avons choisi le modèle OPA656 de type FET pour notre circuit de transimpédance. Le modèle OPA656 possède comme impédance d'entrée $10^{12}\Omega$, courant de fuite de 2 pA et bruit de tension de 7 nV/\sqrt{Hz} .

Type de AOP	Bipolaire	FET
Impédance d'entrée (Ω)	10^{7}	10^{9}
Courant de fuite	1 nA	1 pA
Bruit de tension (nV/\sqrt{Hz})	1	10

Table II.1 – Caractéristiques typiques des AOPs bipolaire et FET

Choix de la résistance R_{TI}

Le choix de la résistance R_{TI} doit répondre à trois critères :

1. La résistance choisie doit amplifier le courant d'entrée pour qu'il soit adapté à l'électronique de contrôle. Dans notre cas, le courant d'entrée est de l'ordre de 1 nA tandis que le signal adapté à l'électronique de contrôle est de 0.1 - 100 mV. La valeur de R_{TI} doit être entre $0.1 - 100M\Omega$.

2. Comme le diapason à quartz oscille aux alentours de 30 kHz, la bande passante du circuit est fixée à 100 kHz. La valeur de la résistance peut être calculée par [30]

$$R_{TI} = \frac{G_{BP}}{2\pi CB_P^2} \tag{II.2}$$

où G_{BP} désigne le produit gain bande-passante (gain-bandwidth product) et C est la somme de la capacité équivalente du diapason, de l'impédance différentielle et de mode commun de l'AOP. Les paramètres sont donnés par les fabricants de l'amplificateur et du diapason respectivement. B_P désigne la bande passante du circuit. En prenant $G_{BP} = 500$ MHz, C=8,2+0,7+2,8 pF=11,7 pF et $B_P = 100$ kHz, la valeur maximum de la résistance calculée est à $680M\Omega$.

- 3. Deux types de bruits doivent être considérés pour choisir la valeur de R_{TI} .
 - Bruit thermique Le bruit thermique, également nommé bruit de Johnson, est généré par l'agitation thermique des électrons dans une résistance électrique en équilibre thermique. Le bruit thermique aux bornes de la résistance R_{TI} est exprimée par la relation de Nyquist [31] :

$$\Delta v_{thermique} = \sqrt{4k_B T R_{TI} B_P} \tag{II.3}$$

où k_B est la constante de Boltzman et T la température de travail. Le rapport signal à bruit $V_{out}/\Delta v_{thermique}$ est proportionnel à la valeur de la racine de la résistance. Pour maximiser le rapport signal à bruit, il faut maximiser la valeur de R_{TI} .

• Bruit de grenaille Le bruit de grenaille, nommé *shot noise* en anglais, est causé par le fait que le courant électrique est constitué de charges discrètes (électrons). Ce bruit est proportionnel au courant moyen qui parcourt le composant :

$$\Delta v_{quantique} = R_{TI} \sqrt{2ei_{TF}B_P} \tag{II.4}$$

où i_{TF} est le courant généré par le diapason et e la charge élémentaire de l'électron. Le rapport signal à bruit $V_{out}/\Delta v_{quantique}$ est indépendant de la valeur de la résistance.

Le choix de la valeur de la résistance est donc fait en combinant tous les critères. Comme premier test, nous avons choisi $R_{TI} = 1M\Omega$.

En sortie de l'AOP nous avons mis une résistances de 50 Ω en série pour adapter l'impédance de sortie à celle des câbles coaxiaux. Les détails du circuit complet sont présentés dans le rapport de stage de Michele Calabrese [28].

Les composants sont soudés sur un circuit imprimé et montés directement sur la nouvelle tête de balayage pour minimiser la longueur des câbles (voir la figure II.5). Ceci permet de minimiser les bruits de l'environnement qui sont amplifiés de la même façon que le signal généré par le diapason. L'implémentation d'une carte d'amplification la plus proche possible du diapason permet de limiter les sources de bruit avant l'amplification.

II.3.3 Performances de l'AFM

La nouvelle tête de balayage avec son nouveau système d'amplification est testée sur une nano-antenne en or composée de trois disques de diamètre 130 nm, hauteur 30 nm et gap de 30 nm, en utilisant la sonde fluorescente composée d'une pointe AFM et une bille fluorescente de 100 nm. La topographie de l'antenne et les vues de sections sont présentées sur la figure II.8.



Figure II.8 – (a) Topographie d'une nano-antenne composée de 3 disques de diamètre 130 nm, hauteur 30 nm et gap de 30 nm. Barre d'échelle : 200 nm. (b) Profil axial de la ligne A sur la topographie. (c) Profil axial de la ligne B sur la topographie.

La topographie montre trois disques distincts. Le profil axial de la ligne A, qui correspond au balayage sur une surface lisse de silice, représente le bruit moyen que nous avons sur le système AFM, qui est de 6 nm au maximum. Or le bruit moyen que nous avions sur l'ancien système AFM est de l'ordre de 10-15 nm. Le profil axial de la ligne B est pris sur les antennes. Nous pouvons observer trois pics à la hauteur de 30 nm qui correspondent aux trois disques d'épaisseur de 30 nm. La largeur totale de l'antenne est d'environ 450 nm comme attendu. Par contre, même si nous pouvons observer deux gaps, ils n'ont pas une hauteur de 30 nm. Ceci est dû au fait que la sonde fluorescente composée de la pointe et de la bille fluorescente a une taille plus grande que le gap, et la sonde n'arrive pas à descendre dans le gap. Cette topographie montre que notre nouveau système AFM est capable de cartographier correctement des nano-antennes composées de disques de diamètre 130 nm et de distinguer les gaps de 30 nm avec un bruit maximum de 6 nm.

II.4 Sonde fluorescente

II.4.1 Fabrication des pointes

Dans notre expérience, la fonction majeure de la pointe est de positionner l'émetteur fluorescent accroché à son extrémité en champ proche de l'échantillon dans la zone focale de l'objectif de microscope. La pointe doit donc répondre à certains critères :

- Etant donné que le signal enregistré vient de l'émetteur fluorescent accroché au bout de la pointe, la pointe ne doit pas être responsable d'une émission parasite (diffusion du laser d'excitation, luminescence ou fluorescence).
- Le rayon de courbure de la pointe doit être petit pour que la sonde fluorescente reste petite. Ceci permet d'augmenter la résolution spatiale des images de topographie.
- La pointe doit avoir le moins d'effet possible sur le champs électromagnétique de l'échantillon et de l'émetteur.
- La pointe doit pouvoir être fabriquée et remplacée facilement.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser les pointes AFM en silice obtenues par étirage d'une fibre optique. Nous utilisons une étireuse (Sutter Instrument P2000) et des fibres optiques d'un diamètre de 125 μm . L'étirage consiste à chauffer localement, par absorption du rayonnement infrarouge d'un laser CO_2 , la fibre optique maintenue en tension. Au-delà d'un certain temps, l'amincissement de la fibre intervient à cause d'une charge constante appliquée sur celle-ci. La fibre se casse en deux avec une force instantanée lorsque la vitesse de la fibre mesurée dépasse un certain seuil. Nous obtenons ainsi une paire de pointes. Pendant la procédure d'étirage, quatre paramètres peuvent influencer la forme des pointes étirées :

- 1. *Heat* Ce paramètre spécifie la puissance de sortie du laser, et par conséquent la quantité d'énergie fournie à la fibre optique.
- Velocity La vitesse du système de maintient de la fibre optique est mesurée pendant que la fibre se ramollit et commence à se casser en deux sous une charge constante. Elle peut être définie comme point de déclenchement d'impulsion final pour casser la fibre.
- 3. **Pull** Ce paramètre contrôle la force instantanée de la traction finale. En général, plus la force est élevée, plus le diamètre de la pointe est petit, et plus la pointe est longue.
- 4. **Delay** Il contrôle le temps entre le moment où le laser est coupé et le moment où la traction commence. Plus le délai est long, plus la fibre est froide au moment de la traction. En conséquence, augmenter le délai entraîne une diminution en longueur et une augmentation du diamètre de la pointe.

Afin de caractériser la stabilité du processus de fabrication et de trouver les bons paramètres qui permettent d'étirer des pointes adaptées à nos applications, nous avons fabriqué des séries de pointes en changeant chaque fois un seul paramètre. Afin de caractériser les pointes étirées, nous les avons imagées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB, *Scanning Electron Microscopy* en anglais). Les images MEB sont traitées par le logiciel ImageJ pour obtenir les caractéristiques comme l'angle d'ouverture, la longueur et le rayon de courbure de la pointe. La figure II.9 montre trois images MEB d'une pointe à trois grossissements différents : $50, 5 \times 10^3$ et 3×10^4 et la méthode que nous utilisons pour extraire les caractéristiques. La pointe imagée est fabriquée avec les paramètres : *Heat* 255, *Velocity* 18, *Delay* 126, *Pull* 150.



Figure II.9 – Images MEB d'une pointe fabriquée avec les paramètres : Heat 255, Velocity 18, Delay 126, Pull 150 à trois grossissements différents : 50, 5×10³ et 3×10⁴. Les lignes jaunes dans (a), (b) et (c) indiquent respectivement la longueur, l'angle d'ouverture et le rayon de courbure de la pointe.

Pour chaque pointe que nous avons fabriquée pour cette étude, nous enregistrons les images MEB à ces trois grossissements. La longueur de la pointe est mesurée en utilisant le logiciel ImageJ sur l'image MEB avec un grossissement de 50 pour avoir une vue d'ensemble de la pointe (voir la figure II.9(a)), et l'angle d'ouverture est mesuré sur l'image MEB avec un grossissement de 5×10^3 (voir la figure II.9(b)). Les mesures sont répétées trois fois et l'erreur est donnée par la différence maximale entre les trois mesures. Quant au rayon de courbure de la pointe, les mesures sont réalisées sur les images MEB de grossissement 3×10^4 pour visualiser le bout de pointe. Ces mesures ne sont pas très précises à cause des limites des images MEB à très grand grossissement. Les charges électriques s'accumulent sur l'extrémité de la pointe pendant le réglage et l'enregistrement de l'image, il est donc difficile d'observer le bord et l'extrémité de la pointe nettes. Le rayon de courbure est estimé grossièrement en adaptant une ellipse d'axe long constant à l'extrémité de la pointe (voir la figure II.9(c)), le demi petit axe est considéré comme le rayon de courbure de la pointe. La plupart des pointes ont un rayon de courbure de l'ordre de 50-100 nm.

Afin de déterminer l'influence de différents paramètres d'étirage sur la forme de la pointe étirée, nous avons fabriqué plusieurs séries de pointes.

Les deux premières séries de pointe sont étirées en variant le paramètre *velocity* tout en gardant les paramètres *Heat* 245 (ou 255), *Delay* 126, *Pull* 150 constants. L'angle d'ouverture de la pointe ne présente pas de changement significatif pour la gamme de vitesse que nous avons exploitée, et la longueur de la pointe augmente linéairement avec la vitesse d'étirage comme présentée dans la figure II.10.

Nous constatons aussi sur la figure II.10 qu'une variation du paramètre Velocity a peu d'effet sur la longueur de la pointe tandis qu'une variation du paramètre *Heat* semble engendrer une variation importante de cette caractéristique. Nous avons fabriqué donc une autre série de pointes en variant seulement le *Heat*, tout en gardant tous les autres paramètres constants. La figure II.11 présente l'évolution de la longueur et de l'angle d'ouverture de la pointe en fonction de la puissance émise par le laser. Les autres paramètres sont fixés à *Velocity* 16, *Delay* 126, *Pull* 150.

La figure II.11(a) confirme que la longueur de la pointe augmente quand la puissance du laser est plus élevée, et la figure II.11(b) montre que l'angle d'ouverture devient en même temps plus petit. Lorsque la quantité d'énergie fournie à la fibre optique est plus



Figure II.10 – La longueur de la pointe en fonction de *velocity* à deux valeurs du paramètre *heat* différents.



Figure II.11 – (a) La longueur de la pointe en fonction de *heat.* (b) L'angle d'ouverture de la pointe en fonction de *heat.*

grande, la température de la fibre après le chauffage est plus élevée, et sa viscosité est plus faible. L'amincissement de la fibre se fait donc plus facilement ce qui conduit à une pointe plus longue avec un angle d'ouverture plus petit.

Cette étude nous a permis de déterminer l'influence des paramètre de l'étireuse sur la forme de la pointe, et de trouver un jeu de paramètres qui permet de fabriquer des pointes AFM qui nous conviennent. Après avoir testé la performance des ces pointes en faisant des balayages sur l'échantillon, nous avons fixé les paramètres d'étirage à : *Heat* 255, *Velocity* 16, *Delay* 126, *Pull* 150.

II.4.2 Choix de la source fluorescente

Dans notre expérience, nous accrochons un émetteur fluorescent à l'extrémité de la pointe en silice. Pour réaliser cela, nous dispersons des émetteurs fluorescents sur une lamelle de verre propre pour avoir des émetteurs individuels et espacés d'environ 5-10 μ m. Ensuite, un émetteur est accroché à l'extrémité de la pointe pour réaliser des balayages sur l'échantillon d'intérêt. Cet émetteur doit satisfaire certains critères. Les paramètres que nous prenons en compte pour choisir l'émetteur fluorescent sont listés ci-dessous :

- **Taille.** La taille de l'émetteur influence la résolution spatiale des cartes de la LDOS puisque la LDOS mesurée est une moyenne spatiale de la LDOS sur le volume de l'émetteur. Cela demande d'utiliser une source fluorescente la plus petite possible pour avoir une meilleure résolution spatiale.
- Luminosité. Dans notre configuration, le signal de fluorescence est collecté en transmission. Par conséquent, nous avons besoin d'un émetteur fluorescent relativement lumineux. De plus, la durée totale d'un balayage effectué pour réaliser des cartes d'intensité et de LDOS en 2D est conséquente puisque les mesures sont effectuées point par point. Pour limiter les dérives thermiques et le photoblanchiment pendant le balayage, le temps de mesure en chaque point est limité, ce qui demande un signal fort en nombre de photons émis par seconde par l'émetteur. La luminosité de l'émetteur est contrôlée par la section efficace d'absorption et le rendement quantique.
- Photostabilité. La photostabilité désigne la stabilité de l'émission de fluorescence dans le temps. Certains émetteurs possèdent un comportement de clignotement (*blinking* en anglais). Ils alternent entre un état où ils émettent de la fluorescence (état on) et un état dans lequel ils n'émettent plus (état off), ou encore un troisième état où ils émettent moins de fluorescence. C'est un phénomène à éviter pour maximiser le nombre de coups par seconde.
- Photoblanchiment (Photo-bleaching). Pratiquement tous les fluorophores photoblanchissent après un certain nombre de cycles d'excitation-émission. Souvent le photoblanchiment est expliqué par une modification chimique de l'émetteur due à l'énergie des photons d'excitation. Vue que le photoblachiment désactive à titre définitif une sonde fluorescente, nous désirons des sources fluorescentes qui photoblanchissent le plus tard possible.
- Temps de vie. Le temps de vie de référence de l'émetteur est mesuré lorsque l'émetteur est déposé sur une lamelle de verre. D'un côté, ce temps de vie doit être le plus petit possible pour réaliser un grand nombre de cycles d'émission-absorption en un intervalle de temps fixé. D'un autre côté, ce temps de vie doit se situer dans la gamme des temps de vie mesurables avec notre dispositif expérimental. Pour notre expérience, nous privilégions des émetteurs avec un temps de vie de 5 à 20 ns environ. Dans notre expérience, le temps de vie est calculé en faisant un ajustement de la courbe de taux de désexcitation tout en considérant une désexcitation mono-exponentielle. Un comportement mono-exponentiel est donc aussi à privilégier.
- Accrochage. L'objectif final est de combiner une pointe AFM avec un émetteur fluorescent, il faut donc que l'émetteur soit facile à accrocher sur la pointe.

Afin de trouver le bon candidat pour notre expérience, nous avons testé plusieurs sources fluorescentes. Il s'agit de quantum dots, centre NVs du diamant, billes de silice dopées de Ruthénium et billes de polystyrène dopées de molécules fluorescentes. Quantum Dots Les quantum dots sont des cristaux semi-conducteurs de dimensions nanométriques (2-10 nm) qui présentent des propriétés optiques ajustables par le contrôle de leur taille, leur forme ou leur composition. Il existe une large gamme de spectres d'émission accessible, qui s'étend de l'ultra-violet au rouge (voir figure II.12), ce qui laisse le choix pour les différentes applications. Le temps de vie de fluorescence des QDs est de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes. Ils possèdent un très bon rendement quantique et résistent au photoblanchiement. Par contre, la plupart des QDs présentent un clignotement notable [32] et des recherches avancés sont menées sur la suppression de ce phénomène [33].



Figure II.12 – (a) Structure schématisée d'un QD. (b) Large gamme de spectre d'émission des QDs.

Les QDs que nous avons testés sont des QDs commercialisés (Qdot 655 ITK, Invitrogen) qui ont un diamètre de 10-20 nm. Ils sont plus lumineux que les nanocristaux de diamant mais moins lumineux que les billes fluorescentes. Ils ont un temps de vie de 10-30 ns. Ils sont difficiles à accrocher à la pointe en raison de leur petite taille. En plus, le déclin de fluorescence de QDs est souvent non-monoexponentiel ce qui rend le temps de vie difficile à extraire.

Centres NVs du diamant

Les centres NVs du diamant (*Nitrogen-vacancy center*) sont des nanosondes photoluminescentes dans le rouge et proche infra-rouge reposant sur des impuretés dans des nanocristaux de diamant qui correspondent à l'association d'une impureté d'azote (N) et d'une lacune dans la maille cristalline (voir figure II.13). Les impuretés d'azote sont naturellement présentes dans du diamant synthétique et les lacunes sont créées par irradiation du diamant à l'aide de particules énergétiques. Le temps de vie de fluorescence des centres NVs est de l'ordre de la dizaine de nanosecondes. Par contre, leur section efficace d'absorption est beaucoup moins importante que celles des quantum dots ou des molécules organiques, ce qui fait qu'il faut beaucoup de puissance pour les exciter. La luminosité des nano-diamants dépend aussi du nombre de centres NVs contenus dans le cristal. Il est possible d'avoir un centre NV unique dans un nano-diamant, ou bien plusieurs centres dans le même cristal. Les centres NVs offrent un avantage essentiel : une émission fluorescente stable à court et à long terme, c'est à dire qu'ils ne se dégradent pas et continuent d'émettre de la lumière indéfiniment. Ceci les rend particulièrement appréciés pour les applications où la stabilité de l'émission est nécessaire.

Les nanocristaux de diamant que nous possédons sont fournis par Géraldine Dantelle, à l'époque au laboratoire PMC de l'Ecole Polytechnique. Ils ont différents diamètres de 20 nm à 100 nm. Ils ont un temps de vie de 10-15 ns, et ils ne photoblanchissent pas. Mais ils sont très peu lumineux. Les nanocristaux de diamant qui ont une taille plus



Figure II.13 – Structure cristallographique d'un centre NV du diamant.

petite que 100 nm sont difficiles à observer en champ large à la caméra CCD, il est donc difficile de les visualiser, caractériser et accrocher. Les nanocristaux de diamant de 100 nm sont visibles en champ large mais, une fois les accrochés à la pointe, ils sont difficiles à visualiser. En fait, à cause de la faible section efficace d'absorption, nous sommes obligés de les exciter avec une forte puissance, ce qui implique un fond important dans nos images. En particulier à ces puissances, la fluorescence de la pointe elle-même n'est pas négligeable et masque le signal provenant du centre NV. Nous avons donc décidé de ne pas utiliser les nanocristaux de diamant comme source flurescente.

Billes de silice dopées de Ruthénium Ces billes fluorescentes sont des sources constituées d'une matrice de silice, dans laquelle sont incorporés des ions de Ruthénium. Les billes de silice dopées que nous avons testées sont fournies par Philippe Boutinaud à l'Université de Clermont-Ferrand. Le diamètre de ces billes est de 20 nm. La figure II.14(a) est une image MEB des billes de silice dopées.



Figure II.14 – (a) Image MEB des billes de silice dopées de Ruthénium fournies par Philippe Boutinaut à Clermont-Ferrand. Le diamètre de ces billes est de 20 nm. (b) Image de microscope de fluorescence des billes de silice en champ large sur une caméra EMCCD.

Ces billes sont lumineuses et assez faciles à observer en champ large. Mais il est difficile d'avoir un échantillon de billes de silice où les billes sont individuelles. La figure II.14(b) montre une image de microscopie de fluorescence de ces billes de silice en champ large sur une caméra CCD. Nous observons les points lumineux isolés ainsi que les agrégats. Nous avons essayé différentes procédures pour la préparation des échantillons, mais nous ne sommes pas arrivés à fabriquer un échantillon sans agrégats.

Nous avons mesuré la stabilité et le temps de vie de ces billes en faisant des mesures sur les billes isolées (billes marquées "mesurées" sur la figure II.14(b)). Pour les choisir nous nous sommes basés sur le fait que ce sont les points les moins lumineux sur l'échantillon, mais nous ne sommes pas sûrs que ce soient des billes individuelles. Le temps de vie de ces billes est de l'ordre de 250 ns, accessible par notre montage expérimental. Certaines billes possèdent un déclin de fluorescence monoexponentiel et certaines non-monoexponentiel. Etant donné que nous n'arrivons pas à préparer un échantillon sans agrégats, il est difficile de savoir si les déclins non-monoexponentiels sont dûs au processus de fabrication ou viennent du fait que il y a plusieurs billes sur le point de mesure. C'est la raison principale qui nous a emmené à ne pas utiliser cette source fluorescente. De plus l'intensité de fluorescence fluctue d'environ 35 % au fil du temps.

Billes de polystyrène dopées

Les billes fluorescentes de polystyrène sont des sources constituées d'une matrice de polymère, dans laquelle sont incorporées des molécules organiques fluorescentes. La taille de la bille peut varier de 20 nm à plusieurs μ m avec un contrôle en taille nanométrique pendant la procédure de fabrication. Le temps de vie de cette source est du même ordre de grandeur que celui des molécules organiques. La photostabilité des billes est augmentée par rapport aux molécules organiques par la matrice de protection. Les billes fluorescentes sont devenues de très bons candidats pour sonder la LDOS par leur luminosité et leur taille dans la gamme de 10-100 nm.

Les billes de polystyrène dopées que nous avons testées sont fabriquées par Invitrogen, et possèdent un diamètre de 25 nm et 100 nm (Red FluoSpheres 580/605). Elles ont un temps de vie de 7 ns sur un substrat de verre et possèdent un déclin de fluorescence monoexponentiel. Elles sont plus lumineuses que toutes les autres sources fluorescentes que nous avons testées, ce qui est idéal pour acquérir le signal dans un intervalle de temps court et réduire le temps d'acquisition en chaque point. En plus, elles peuvent fluorescer d'une façon assez stable pendant longtemps (plus que 10 h) par rapport au temps d'acquisition des cartes de champ proche. Grâce au protocole d'accroche que nous avons développé et qui est décrit plus bas, il est très facile d'accrocher une bille de 100 nm. Nous arrivons avec un taux de réussite est d'environ 90 %. En revanche pour l'instant, nous ne sommes pas arrivé à accrocher une bille de 25 nm. Avec ces billes plus petites, quand la pointe se déplace en coïncidence de la bille pour l'accrocher, la pointe écrase la bille et nous pouvons observer à la caméra CCD que la fluorescence de la bille s'éteint.

En combinant tous les critères, nous avons décidé d'utiliser les billes de polystyrènes de diamètre de 100 nm (FluoSpheres Red 580/605, Invitrogen) dont les spectres d'excitation et d'émission sont présentés dans la figure II.15. Le maximum d'excitation et d'émission sont 580 nm et 605 nm respectivement. Ces billes de 100 nm sont composées de plusieurs centaines d'émetteurs aléatoirement distribués dans la matrice de polymère. La LDOS mesurée sera une moyenne sur les orientations des dipôles de transition des molécules, ceci permet d'assurer la mesure de la LDOS sommée sur tous les états de polarisations. D'autre part, le grand nombre de molécules incorporées permet d'obtenir un émetteur stable sur des durées compatibles avec l'acquisition des cartes de temps de vie, permettant d'acquérir plusieurs séries de cartes sur différentes nanoantennes.



Figure II.15 – Spectre d'excitation et d'émission pour les billes de polystyrène FluoSpheres Red (Invitrogene).

II.4.3 Protocole d'accroche

La manipulation d'objets de taille nanométrique est loin d'être une chose évidente. Nous allons maintenant décrire le protocole permettant d'accrocher une bille fluorescente (ou des QDs ou des nanocristaux de diamant) au bout de la pointe AFM.

(1) Les billes sont initialement déposées à la tournette sur une lamelle de verre propre. La solution a une concentration qui permet d'avoir une bille tous les 5-10 μm environ. La figure II.16(a) montre une image de fluorescence en champ large d'un échantillon de billes prise avec une caméra CCD. Les points lumineux sont les billes. Un échantillon réussi doit répondre à un critère important : chaque point lumineux ne doit représenter qu'une seule bille. Autrement dit, il ne faut pas avoir d'agrégats sur l'échantillon. Pour les mesures de l'intensité de fluorescence et du temps de vie, si plusieurs billes sont accrochées simultanément sur la pointe, il devient difficile de distinguer la provenance du signal. Surtout les cartes optiques seront moyennées sur la taille de l'ensemble des billes. Il est donc impératif de n'accrocher qu'une seule bille à la fois.

(2) La caractérisation des billes individuelles sur l'échantillon est réalisée de façon à trouver une bille lumineuse qui possède une décroissance de fluorescence monoexponentielle. Cette étape est utilisée pour caractériser l'influence de la pointe sur la bille fluorescente.Dans la figure II.16(a), la flèche indique la bille que nous allons accrocher.



Figure II.16 – Protocole d'accroche d'une bille de 100 nm. (a) Vue en champ large de l'échantillion avant l'accroche. (b) Champ large de la zone après l'accroche. La bille indiquée par la flèche n'est plus sur l'échantillon et elle est accrochée sur la pointe AFM. (3) Une pointe AFM en silice est ensuite amenée en champ proche de l'échantillon. La zone de contact de la pointe, indiquée par la croix, ne contient aucune bille pour éviter tout accrochage non voulu ou non contrôlé. Ensuite, un déplacement de l'échantillon de billes, qui se fait à l'aide d'actuateurs piézoélectriques commandés manuellement ou bien par l'électronique de contrôle de l'AFM, amène la bille choisie en coïncidence avec la pointe.

(4) Lorsque la pointe passe en coïncidence avec la bille, la bille s'accroche à la pointe grâce à des interactions électrostatiques, ou dipolaires (forces de Van der Waals). L'origine de la force qui permet cette accroche n'est pas entièrement connue mais l'intérêt de la technique est que le pourcentage d'accrochages réussis est d'environ 90 % pour les billes que nous utilisons. Après avoir décalé la pointe, nous pouvons observer dans la figure II.16(b) que la bille indiquée par la flèche disparaît de l'échantillon car elle est fixée à l'extrémité de la pointe, qui se trouve hors du champ de vision.

Une contrainte de cette procédure est que nous ne pouvons pas contrôler la position exacte de la bille sur la pointe au moment de l'accrochage. Selon la forme de la pointe et l'asservissement du système AFM, la bille peut être accrochée soit à l'extrémité de la pointe, soit sur le flanc de la pointe à différentes hauteurs par rapport à l'extrémité de la pointe. La position de la bille influence beaucoup la topographie et les mesures de l'intensité de fluorescence et du temps de vie. Par conséquent, nous pouvons déduire la position de la bille par rapport à la pointe en combinant les cartes de topographie, de l'intensité de fluorescence et du temps de vie comme nous le détaillerons dans le chapitre III.

Une fois le protocole d'accroche déterminé, nous avons caractérisé l'influence de la pointe sur la bille. Nous avons constaté une réduction en intensité de fluorescence et en temps de vie dans certains cas. La réduction en intensité de fluorescence varie selon la hauteur à laquelle la bille est accrochée sur la pointe. Pour la durée de vie, la figure II.17 représente deux exemples sur le changement du taux de désexcitation spontané d'une bille de 100 nm avant (courbe bleue claire) et après (courbe rouge) accrochage à une pointe en silice. Les courbes bleues sont des ajustements réalisés en considérant une désexcitation mono-exponentielle ainsi qu'un bruit de fond constant. Dans la figure II.17(a), le temps de vie de fluorescence est passé de 6.58 ns à 4.38 ns lorsque la bille est accrochée sur la pointe. Cette réduction du temps de vie vient du couplage entre la bille et la pointe qui change l'environnement photonique vu par la bille et conduit à une augmentation du nombre de canaux de désexcitation. Ce couplage n'est pas le même à chaque fois, mais cela doit dépendre de la position de la bille sur la pointe ainsi que la forme de la pointe. A titre d'exemple nous montrons dans la figure II.17(b), le temps de vie de fluorescence n'a presque pas changé. La caractérisation de la bille après accroche est donc nécessaire afin de prendre en compte l'effet de la pointe sur la bille.

II.5 Montage expérimental : Schémas de l'expérience

Nous avons développé un montage expérimental permettant de réaliser des mesures précises de l'intensité de fluorescence et de temps de vie des émetteurs fluorescents. Le



Figure II.17 – Taux de désexcitation spontané de la bille fluorescente avant (courbe bleue claire) et après (courbe rouge) accrochage à une pointe en silice. Les courbes bleues sont les fits. (a) Le cas où le temps de vie change beaucoup après accrochage. (b) Le cas où le temps de vie ne change pas après accrochage.

montage complet est présenté dans la figure II.18.



Figure II.18 – Montage expérimental pour l'expérience de mesure de temps de vie et de l'intensité de fluorescence.

L'échantillon est monté sur un microscope confocal inversé combiné au système AFM à sonde fluorescente que nous avons décrit en détail dans ce chapitre. La sonde fluorescente montrée en haut de la figure II.18 est amenée en champ proche de l'échantillon. Un laser super-continuum pulsé est spectralement filtré puis focalisé sur la bille fluorescente à travers un objectif à huile à grande ouverture numérique. La fluorescence est collectée par le même objectif à huile puis séparée de l'excitation par un miroir dichroïque suivi par un filtre de fluorescence. Enfin, un miroir amovible permet de choisir entre l'observation plein champ de l'échantillon sur la caméra CCD et la détection des photons de fluorescence à l'aide d'une photodiode à avalanche. Cette dernière nous permet d'acquérir simultanément les cartes d'intensité et de durée de vie. Dans la suite de cette section, nous détaillons d'abord les différentes parties du montage expérimental, et ensuite la méthode que nous avons utilisée pour effectuer des mesures d'intensité et de temps de vie. Le montage que nous détaillons ici est celui que nous avons utilisé pour les résultats que nous présenterons dans le chapitre III. Pour les résultats que nous allons montrer dans le chapitre IV et le chapitre VI, le montage a été modifié pour l'adapter aux différentes expériences. Les détails des modifications serons présentés dans chaque chapitre, mais le principe reste le même.

II.5.1 Excitation

Nous détaillons dans cette partie le chemin optique d'excitation et les composants utilisés afin d'exciter la bille fluorescente accrochée à la pointe. Le schéma de cette partie d'excitation optique est présenté dans la figure II.19.

La source laser utilisée est un laser super-continuum (Fianium SC450). Elle présente une puissance de 2 W sur un spectre qui s'étale de 450 nm à 1600 nm. Comme, pour notre expériences, nous n'avons besoin que de la partie visible du spectre, nous filtrons la partie infrarouge à l'aide de miroirs froids. Le mode fondamental du laser, à 1064 nm est injecté dans une fibre non-linéaire qui élargi le spectre du rayonnement incident : à partir de ce fondamental à 1064 nm, des processus non-linéaires au sein de la fibre permettent de générer toutes les composantes du spectre visible et proche infrarouge. Ceci nous donne la possibilité de choisir la longueur d'onde d'excitation en utilisant simplement des filtres d'excitation, et ainsi la possibilité de changer d'émetteurs fluorescents selon les applications.

La durée des impulsions est de l'ordre de 100 ps à la sortie de la fibre non-linéaire, bien en-dessous du temps de vie des émetteurs fluorescents que nous utilisons.

Le taux de répétition du laser peut varier de 1 MHz à 20 MHz. Le choix du taux de répétition doit être adapté au temps de vie des émetteurs fluorescents. La méthode utilisée pour mesurer les temps de vie est expliquée en détail dans la section II.5.3.



Figure II.19 – Schéma de la partie d'excitation optique du montage [3].

Dans ce qui suit, nous listons les composants utilisés pour la mise en forme du faisceau laser et pour la sélection de la longueur d'onde, suivant le schéma présenté sur la figure II.19.

• Miroirs froids : ils sont transparents dans l'infrarouge, et réfléchissants dans le visible (Thorlabs FM02). Ils permettent de supprimer les composantes infrarouges

présentes dans le rayonnement de la source laser.

- **Télescope** : il est composé de deux lentilles de focales différentes, et permet d'augmenter l'extension latérale du faisceau laser.
- **TDA 200** : un très petit pourcentage du faisceau laser est réfléchi par une lamelle de verre et envoyé sur la photodiode TDA 200 (PicoQuant). Cette photodiode délivre une impulsion électrique à chaque impulsion laser. L'impulsion électrique est envoyé à la carte de mesure de temps de vie HydraHarp 400 (PicoQuant) et déclenche la mesure du temps d'arrivée des photons de fluorescence (voir la section II.5.3).
- Filtre d'excitation : un filtre passe bande (SemRock FF01-560/14-25) est utilisé pour effectuer le filtrage spectral. La bande passante de ce filtre est d'environ 20 nm centrée sur 560 nm. Lorsque nous avons besoin de changer la longueur d'onde d'excitation du système, il suffit de changer ce filtre d'excitation.
- **Densité optique** : un jeu de densités optiques, densités variables et densités fixes, permet de modifier la puissance incidente sur l'échantillon à notre propre gré.
- Miroir amovible : la mesure de puissance après les densités optiques est effectuée avec ce miroir de renvoi sur un puissance-mètre.
- Lentille amovible : elle permet de défocaliser le faisceau incident en aval de l'échantillon afin d'observer une zone de 50 μm de diamètre sur l'échantillon, ce que nous appelons champ large. Elle est souvent mise en place pour visualiser en temps réel à la caméra l'accrochage de l'émetteur (comme l'image présentée dans la figure II.16). Quand elle n'est pas sur le trajet du faisceau, le faisceau est collimaté lorsqu'il entre dans le microscope inversé.

Dans le microscope inversé (Olympus IX-71), le faisceau collimaté est d'abord réfléchi par un miroir dichroïque (SemRock Di01-594R-25X36), qui est transparent pour $\lambda > 594$ nm et réfléchissant pour $\lambda < 594$ nm, vers l'objectif à huile à grande ouverture numérique (Olympus, NA 1.3). Il est ensuite focalisé sur l'émetteur fluorescent accroché sur la pointe AFM.

II.5.2 Détection

Dans cette partie, nous détaillons la partie optique utilisée pour la détection des photons fluorescents. Nous présentons les dispositifs que nous utilisons pour effectuer la mesure de temps de vie et de l'intensité de fluorescence. Le chemin optique de détection est présenté sur la figure II.20.

L'émetteur accroché sur la pointe AFM émet un signal de fluorescence suite à l'excitation focalisée sur celui-ci. La lumière de fluorescence repasse à travers l'objectif qui a servi pour l'excitation. Comme les trajectoires du faisceau d'excitation, réfléchi par l'échantillon, et de fluorescence coïncident, une série de miroirs et filtres est installée sur le trajet du faisceau pour séparer le signal de fluorescence provenant de l'émetteur fluorescent sur la pointe AFM du faisceau d'excitation. Les composants et leurs fonctionnements sont listés ici.

• Miroir dichroïque et filtre : le miroir dichroïque (SemRock Di01-594R-25X36) qui a servi à réfléchir le laser incident et un filtre de fluorescence (SemRock BLP01-594R-25) ne laisseront passer que les longueurs d'onde plus élevées que 594 nm.



Figure II.20 – Schéma de la partie optique de détection du montage [3].

La composante provenant de la réflexion du laser sur l'échantillon est presque totalement supprimée par le miroir dichroïque et le filtre.

- Lentille de tube : elle permet de focaliser le signal de fluorescence sur un trou de confocalité.
- Trou de confocalité : un trou de 150 μm de diamètre est placé sur le plan focal image de la lentille de tube du microscope. Il permet de filtrer spatialement les photons provenant de l'échantillon car le plan focal image de la lentille de tube est conjugué avec le plan focal objet de l'objectif. La position du trou le long de l'axe optique définit le plan de l'échantillon imagé tandis que la position latérale du trou (dans le plan perpendiculaire à l'axe optique) sélectionne la zone imagée dans un plan de l'échantillon.
- Filtre de fluorescence : un autre filtre de fluorescence (SemRock FF01-607/70-25), filtre passe bande de largeur 70 nm centré sur 607 nm, est utilisé pour supprimer les résidus du faisceau d'excitation.

Ainsi, avec ce jeu de filtres et lentilles, nous avons sélectionné la lumière de fluorescence émise par l'émetteur. Avec une dernière lentille, ce signal de fluorescence est focalisé sur un détecteur de photon unique de la série PDM (du fabricant Micro Photonic Device). La partie sensible du détecteur est constituée d'un SPAD (single-photon avalanche diode) de diamètre de 50 μm , avec un *jitter* (erreur sur la mesure temporelle de l'arrivée d'un photon) de l'ordre de 50 picosecondes. Il génère une impulsion de sortie TTL (*transistor-transistor logic*, deux niveaux logiques 0-5V) par photon détecté. Le taux moyen de conversion photon/impulsion de ce dispositif est de l'ordre de 40 % entre 500 nm et 650 nm. Le nombre de coups d'obscurité (*dark count*) est de 27 coups/s, ce qui permet de mesurer des flux extrêmement faibles de photons. Par contre, le SPAD est limité par un temps mort (*dead time*) d'environ 80 ns, ce qui signifie qu'il ne peut pas mesurer le temps d'arrivée du deuxième photon si le premier est arrivé moins de 80 ns avant. Le taux de comptage maximal est donc 10⁶ coups/s.

Une caméra EM-CCD refroidie (Andor iXon 897) est mise en place (présentée dans la figure II.18) pour observer en champ large une zone de 50 μm de diamètre sur l'échantillon grâce à l'utilisation de la lentille amovible.

II.5.3 Mesure d'intensité et de temps de vie

Pour effectuer une mesure de temps de vie de fluorescence, il faut mesurer l'intervalle de temps pendant lequel l'émetteur fluorescent reste dans l'état excité avant de retourner à son état fondamental en émettant un photon. Cette durée est calculée en mesurant le décalage en temps entre l'impulsion laser d'excitation et la détection d'un photon de fluorescence. Pour effectuer cette mesure, nous utilisons la carte d'acquisition HydraHarp 400 de PicoQuant, qui est basée sur un processus start-stop schématisé dans la figure II.21(a). Une photodiode (TDA200 PicoQuant) délivre une impulsion électrique à chaque impulsion laser et envoie un signal TTL à la carte d'acquisition HydraHarp 400 qui déclenche son horloge interne. Dès qu'un photon de fluorescence est reçu sur le SPAD (single-photon avalanche diode en anglais), un signal TTL est envoyé à la carte d'acquisition pour arrêter l'horloge. L'intervalle de temps $\Delta t1$ mesuré est rentré dans un histogramme comme celui présenté dans la figure II.21(b). Cette procédure est répétée pour chaque photons détecté. L'histogramme donne la décroissance de fluorescence. Nous pouvons donc extraire le temps de vie d'émetteurs par un ajustement mono-exponentiel (section I.1.3) et l'intensité de fluorescence en comptant le nombre total de photons dans l'histogramme. La carte d'acquisition que nous utilisons possède une résolution temporelle de 1 picoseconde.



Figure II.21 – (a) Illustration du processus *start-stop* de la mesure de temps de vie de fluorescence.
(b) Histogramme de temps de vie de fluorescence du processus *start-stop*.

Il est à noter que le délais entre deux impulsions laser doit être plus grand que le temps de vie de l'émetteur pour s'assurer que l'émission de photon aura lieu avant la deuxième impulsion. Dans notre cas, le délai entre deux impulsions est de 100 ns (taux de répétition de laser : 10 MHz) pour un temps de vie de 7 ns pour les billes de polystyrènes.

II.6 Conclusion

Nous avons présenté en détail dans ce chapitre les améliorations que nous avons apportées sur le montage expérimental développé pendant la thèse d'Etienne Castanié, qui permet de cartographier simultanément la topographie de l'échantillon, l'intensité de fluorescence et la LDOS de l'émetteur sur des nano-structures. Ces améliorations permettent d'augmenter la stabilité et la répétitivité du système AFM.

Dans un premier temps, nous avons présenté la mise en place d'une nouvelle tête de balayage permettant un positionnement précis de la pointe d'AFM par rapport au diapason afin de conserver le même facteur de qualité quand nous changeons de pointe ou de diapason. Un amplificateur transimpédance embarqué sur la tête de balayage est directement relié aux bras du diapason afin d'amplifier tout de suite le signal électrique provenant du diapason pour limiter les sources de bruit avant l'amplification.

Ensuite, a été présentée une étude sur la fabrication des pointes en silice et sur le choix de l'émetteur fluorescent qui permettent de former une sonde fluorescente de taille nanométrique. Nous avons discuté les critères auxquels l'émetteur fluorescent doit répondre pour notre expérience et les sources fluorescentes que nous avons testées. Les billes de polystyrène dopées de diamètre 100 nm sont de très bons candidats pour réaliser les cartes de LDOS et d'intensité. Nous avons décrit la procédure que nous avons mise en place pour accrocher ces billes de polystyrène à l'extrémité des pointes en silice avec un taux de succès de 90 %.

Enfin, nous avons présenté le montage expérimental complet : la méthode que nous utilisons pour effectuer des mesures d'intensité et de temps de vie, le chemin optique d'excitation et de détection.

Dans le chapitre suivant, nous allons présenter les divers résultats que nous avons obtenu en utilisant ce montage expérimental. En fonction de l'expérience réalisée, le montage a dû être révisé et adapté. Dans chaque chapitre nous listerons les différences notables.

Chapitre III

Caractérisation en champ proche d'une antenne plasmonique

Table des matières

III.1 Introduction	42
III.2 Résultats	46
III.2.1 Echantillons étudiés	46
III.2.2 Cartes expérimentales	48
III.3 Simulations numériques	51
III.3.1 Méthode de simulation	51
III.3.2 Résultats des simulations et comparaison avec l'expérience	54
III.3.3 Résolution de la sonde fluorescente	55
III.4 Conclusions et perspectives	57

III.1 Introduction

Les antennes plasmoniques ont attiré beaucoup d'attention ces dernières années pour la capacité qu'elles offrent d'optimiser l'interaction des nano-émetteurs comme les molécules fluorescentes ou les quantums dots avec l'environnement [34]. Les antennes optiques permettent de concentrer l'énergie électromagnétique à l'échelle du nanomètre, bien en dessous de la limite de diffraction, et offrent la possibilité de réaliser un couplage efficace entre le champ proche et le champ lointain. Ces propriétés ouvrent de nouvelles voies pour la manipulation de la lumière aux échelles nanométriques, et sont très prometteuses pour exalter l'efficacité d'émission optique comme la fluorescence. L'exaltation de fluorescence trouve son origine physique dans les modifications de l'environnement électromagnétique dues à la présence de l'antenne et qui sont : (1) l'amplification locale de l'intensité d'excitation. Cette amplification conduit à une augmentation de section efficace d'absorption effective. Cet effet est largement exploité dans les domaines de photodétection et du photovoltaïque [34, 35]. (2) la modification du taux de désexcitation spontanée due à l'effet Purcell. Par exemple, de grands facteurs de Purcell associés à des modes électromagnétiques fortement localisés dans des volumes sub-longueur d'onde ont été mesuré à la surface de films métalliques désordonnés [36]. Ceci ouvre de nouvelles perspectives telles que l'étude du couplage fort en plasmonique [6, 25]. (3) le changement du rendement quantique apparent par la compétition entre les canaux de désexcitation radiatifs et non-radiatifs [21].

Ces modifications dépendent fortement des géométries, tailles et natures des nanoantennes étudiées. Pour cette raison, la caractérisation expérimentale complète des interactions entre nano-antennes et émetteurs fluorescents est un sujet de grand intérêt. La densité locale d'états électromagnétiques (LDOS) est une grandeur fondamentale qui permet de quantifier tous les canaux de l'environnement pour le désexcitation d'un émetteur fluorescent, par exemple, la désexcitation radiative couplée avec le champ lointain, la désexcitation dans les plasmons ou le *quenching* dû aux pertes dans l'environnement. Les nano-structures, dans lesquelles la LDOS varie à une échelle plus petite que la longueur d'onde de la lumière, produisent un environnement qui peut modifier tous les aspects de l'émission spontanée, comme l'émission de fluorescence [37, 38], le taux de désexcitation spontané [39, 40, 41], la direction d'émission [42, 43] et aussi la polarisation [44].

Il existe deux méthodes dans la littérature pour sonder expérimentalement la LDOS aux longueurs d'onde du visible avec une résolution spatiale nano-métrique : une méthode statistique et une méthode déterministe. Les principes de ces deux méthodes sont schématisés sur la figure III.1.

Méthode statistique



Figure III.1 – Les deux méthode existantes pour sonder expérimentalement la LDOS. (a) Méthode statistique. (b) Méthode déterministe.

La méthode statistique (III.1(a)) consiste à disperser les émetteurs fluorescents sur la surface de l'échantillon ou à l'intérieur de l'échantillon et ensuite mesurer la LDOS de chaque émetteur un par un. Une distribution de la LDOS de l'échantillon peut être reconstituée en combinant les mesures de LDOS de tous les émetteurs.

1. Mesures de LDOS en surface

Comme les émetteurs peuvent facilement être dispersés à la surface d'un échantillon à l'aide d'une tournette, cette méthode est très utilisée pour effectuer des mesures de LDOS sur la surface de différents types d'échantillons.

- films métalliques semi-continus. Plusieurs types d'émetteurs fluorescents ont été utilisés pour sonder la LDOS à la surface des films métalliques semi-continus. La distribution statistique de la LDOS sur les films d'or semi-continus de différentes épaisseurs a été étudiée en utilisant les billes fluorescentes de polystyrènes [6]. Une autre étude qui utilise les mêmes billes est focalisée sur la dépendance de la distribution de la LDOS en fonction de l'épaisseur de l'espaceur (*spacer*) entre les films d'or semi-continus et les billes fluorescentes [25]. Les quantum-dots ont été aussi utilisés pour les études statistiques de LDOS à la surface des films métalliques semi-continus. En dispersant les quantum-dots aléatoirement sur les films d'or semi-continus, de grandes variations de taux de désexcitation ont été observées [36, 45].
- nano-fils. Pour étudier le couplage entre un émetteur fluorescent et des nanofils, des expériences ont été réalisées en dispersant des nano-fils et des émetteurs fluorescents sur un substrat de verre. La mesure de LDOS est ensuite menée en choisissant les émetteurs proches des nano-fils [46, 47].
- cristaux photoniques. En 2005, Badolato et al. ont mis au point une technique permettant de coupler un quantum-dot unique avec une nano-cavité dans un cristal photonique [48]. Ensuite, Hennessy et al. ont démontré le couplage fort entre un quantum-dot unique et une nano-cavité dans un cristal photonique et ont observé une diminution de 145 fois de temps de vie du quantum-dot [49]. L'étude de la localisation d'Anderson dans les cristaux photoniques a aussi été réalisée en utilisant des quantum-dots épitaxiés [50].

• milieux diélectriques. Des mesures de LDOS ont aussi été effectuées dans les milieux diélectriques fortement diffusants. En mesurant le temps de vie de nanocristaux de diamant à l'interface verre-air et dans un milieu diffusant à base de particules de TiO₂, une diminution de LDOS a été observée dans le milieux diffusant [51].

2. Mesures de LDOS dans le volume

Pour mesurer la LDOS dans le volume, des émetteurs fluorescents sont dispersés dans l'échantillon au moment de la fabrication de l'échantillon. Sapienza et al. ont réalisé des mesures de temps de vie de billes de polystyrènes dans un milieu 3D désordonné à base de poudre de ZnO [52]. Birowosuto et al. ont aussi mesuré la variation de la LDOS dans le volume des plaques à base de polystyrène (PS) et de l'oxyde de zinc (ZnO) en utilisant des billes de polystyrène [41].

Méthode déterministe

Dans la méthode statistique, la position des émetteurs est fixée au moment du dépôt à la tournette ou de la fabrication de l'échantillon. Il n'est donc pas possible de réaliser une carte de LDOS de l'échantillon et d'amener précisément l'émetteur sur une zone particulière. L'utilisation d'une pointe à balayage (III.1(b)) a été proposée pour surmonter la difficulté du positionnement exact de l'émetteur fluorescent par rapport à l'échantillon. Trois méthodes ont été reportées dans la littérature : soit pousser l'émetteur (ou l'échantillon) qui est déjà sur l'échantillon à un endroit choisi à l'aide de la pointe AFM (nano-positionnement), soit accrocher directement l'émetteur fluorescent à la pointe AFM et balayer l'ensemble en champ proche de l'échantillon (balayage de l'émetteur), ou accrocher l'échantillon sur la pointe AFM et balayer l'échantillon sur les émetteurs fluorescents pré-dispersés (balayage de l'échantillon).

1. nano-positionnement.

Dans cette configuration, nous pouvons soit pousser l'émetteur fluorescent à l'endroit précis de l'échantillon étudié, soit déplacer l'échantillon sur l'émetteur fluorescent choisi.

- Déplacer l'émetteur fluorescent. En 2009, van de Sar et al. ont démontré la possibilité de déplacer des nano-cristaux de diamant avec une précision nanométrique sur un substrat de verre tout en conservant les propriétés optiques des centres NVs [53]. Ensuite, cette méthode a été utilisée pour coupler un nanocristal de diamant avec des nano-fils d'argent [54, 55] et sonder l'environnement électromagnétique d'une antenne en forme de papillon (*bowtie antenna*) tout en déplaçant l'émetteur en différentes positions sur l'antenne [55]. Une autre expérience qui étudie le couplage de deux nano-fils d'argent repose aussi sur cette méthode pour coupler le nano-cristal de diamant avec un des fils [56].
- Déplacer l'échantillon. En 2009, Schietinger et al. ont étudié l'augmentation du taux d'excitation et du taux de désexcitation radiatif du nano-cristal de diamant en l'approchant de deux nanoparticules d'or [57]. L'assemblage est effectué en poussant les nano-sphères d'or une par une à côté du nano-cristal de diamant. Englund et al. ont couplé une nano-cavité à cristal photonique avec un nano-cristal de diamant en déplaçant la cavité sur l'échantillon de nanodiamants à l'aide d'une pointe de tungstène avec une résolution nanométrique [58].
- 2. balayage de l'émetteur.

Etant donné que la méthode de nano-positionnement est longue et fastidieuse et qu'elle n'est pas adaptée à des échantillons avec des reliefs complexes, nous pouvons envisager l'accrochage de l'émetteur fluorescent à la pointe AFM.

Des cartes de l'intensité de fluorescence obtenues en balayant la sonde fluorescente composée d'une pointe et d'un émetteur ont été réalisées sur des triangles d'aluminium [59] ou des nano-trous dans un film de chrome [60]. Une diminution de durée de vie de l'émetteur fluorescent a été mesurée en balayant une bille fluorescente sur un nano-fil de 250 nm de diamètre [24]. Depuis, des systèmes à sonde fluorescente à balayage ont été développés par plusieurs équipes pour réaliser des cartes de LDOS sur des nano-structures [26, 61, 62].

Récemment, Berthelot et al. ont mis au point une technique de manipulation en 3D des nano-objets à l'aide de pièges optiques [63]. L'expérience consiste à fabriquer une ouverture papillon plasmonique à l'extrémité d'une fibre optique étirée revêtue de métal. Le piégeage est effectué à travers la fibre optique en utilisant les forces optiques créées par l'ouverture.

3. balayage de l'échantillon.

- pointes métallisées. Ambrose et al. ont imagé la variation du temps de vie de molécules de Rhodamine 6G uniques sur une surface de silice en approchant ou éloignant une pointe à balayage métallisée [64]. Dans cette expérience, les molécules de Rhodamine 6G uniques sont utilisées comme sondes locales fluorescentes, et la pointe à balayage métallisée fournit un moyen de modifier l'environnement de ces molécules uniques d'une manière reproductible et contrôlée. Une expérience similaire est proposée par Buchler et al. en fabriquant une sphère métallisée en argent au bout de la pointe [2]. En balayant la pointe, la distance entre la sphère en argent et l'émetteur change ainsi que le temps de vie de l'émetteur. Les pointes métallisées sont aussi utilisées pour contrôler la directivité de l'émission d'une molécule unique [65, 66].
- pointes avec bille d'or ou antenne. Des cartes de taux de désexcitation ont été obtenues en balayant une bille en or au voisinage de molécules fluorescentes isolées fixées sur un substrat [40, 67]. Les nano-antennes optiques sont aussi attachées à une sonde à balayage pour réaliser des mesures de LDOS [39]. Récemment, Singh et al. ont réussi à fabriquer une nano-antenne rectangulaire sur la pointe d'AFM, et à balayer l'ensemble à proximité des molécules fluorescentes [68]. En sélection-nant les molécules ayant des orientations spécifiques, les auteurs ont obtenu une carte vectorielle complète (composantes x, y et z du champ) de l'antenne.

Indépendamment de la méthode utilisée pour sonder la LDOS, le choix de l'émetteur est aussi important. Pour sonder expérimentalement la LDOS au voisinage d'une nanoantenne optique, il faut s'assurer que le dispositif de détection ait la même réponse pour tous les modes. Un émetteur constitué d'un grand nombre de dipôles aléatoirement orientés peut sonder la LDOS dans les trois directions de l'espace simultanément. Comme nous l'avons détaillé dans la section II.4.2, nous avons choisi d'utiliser pour nos expériences des billes de polystyrène de 100 nm de diamètre accrochées à une pointe d'AFM (fibre optique étirée).

Dans ce chapitre, nous utilisons ce dispositif pour sonder la LDOS d'une antenne optique. Les cartes de l'intensité de fluorescence et du taux de désexcitation de la bille fluorescente sont enregistrées avec une résolution sub-longueur d'onde ainsi que la topographie de l'antenne. Des simulations numériques sont réalisées pour effectuer une comparaison avec les résultats expérimentaux. Une analyse de la résolution de la sonde fluorescente utilisée est aussi menée.

III.2 Résultats

III.2.1 Echantillons étudiés

Les premiers échantillons que nous avons étudiés sont des nano-antennes en or. Ces antennes sont fabriquées par lithographie électronique sur une lamelle de verre au Laboratoire de Photonique et Nanostructures (LPN-CNRS) à Marcoussis, par Nathalie Bardou et Stéphane Collin.



Figure III.2 – La procédure de lithographie électronique.

La lithographie électronique consiste à réaliser une empreinte du motif souhaité dans un film de matière sensible au faisceau d'électrons. La procédure est schématisée sur la figure III.2.

- 1. Dans un premier temps, une couche homogène de résine photosensible, polymethyl methacrylate (PMMA) dans notre cas, est déposée sur une lamelle de verre.
- 2. L'échantillon est ensuite exposé au rayonnement. Sous l'action du faisceau d'électrons, les propriétés physico-chimique de la résine, comme sa solubilité par exemple, sont modifiées. C'est lors de cette étape d'exposition que le motif à transférer est défini. En éclairant sélectivement le PMMA, deux régions aux propriétés bien différentes sont définies. Sur la figure III.2(2), la zone rouge est soumise à l'exposition.
- 3. L'échantillon est révélé dans un solvant spécifique. Pour le PMMA, le solvant révélateur élimine les zones soumises au rayonnement.
- 4. 2 nm de Chrome et 30 nm d'or sont déposés sur l'échantillon par évaporation par faisceau d'électrons (electron beam vapor deposition, EBVD). Le Chrome n'influence pas les propriétés optique, mais constitue une couche d'accroche pour le film d'or. Les 30 nm d'or déposés forment un film continu supporté par la résine, sauf pour les zones exposées au rayonnement où la couche repose directement sur le verre.

5. En plongeant l'échantillon dans un solvant, la résine est éliminée ainsi que le film d'or qu'elle supporte. Seules les parties de film déposées directement sur le substrat subsistent.

Avec cette méthode, trois types de nano-antennes ont été fabriquées pour nos expériences : des chaînes de disques, deux rectangles couplés et deux triangles couplés comme indiqués sur la figure III.3.



Figure III.3 – Vue de dessus des trois types de nano-antennes. (a) une chaîne de disque, (b) deux rectangles, (c) deux triangles.

- chaines de disques. Pour les chaînes de disques, nous faisons varier le nombre de disques (de 1 à 20), la taille des disques (100 nm ou 150 nm en diamètre) et le gap entre les disques (de 0 nm à 100 nm) afin d'avoir une grande variété d'antennes. Les disques uniques nous permettent d'étudier la modification du champ électromagnétique induite par un seul disque tandis que les antennes composées de plusieurs disques nous permet d'analyser les effets collectifs sur le champ.
- deux rectangles. Nous faisons varier le gap entre les deux rectangles et la longueur du rectangle (de 50 nm à 350 nm).
- deux triangles. Les deux triangles symétriques sont séparés d'un gap qui varie de 0 nm à 100 nm et ont un angle d'ouverture très petit de l'ordre de 0.1°. Pour une petite zone, nous pouvons la considérer comme deux rectangles couplés.

Ces antennes présentent de fortes variations de LDOS et d'intensité de fluorescence à l'échelle de la dizaine de nanomètres que nous pouvons observer à l'aide de notre sonde fluorescente. L'existence de ces fortes variations de LDOS a été démontrée par les simulations que nous avons réalisées au sein de l'équipe, qui ont été comparées aux données expérimentales. Les détails des simulations seront présentés dans la suite du chapitre.

La figure III.4(a) montre une image MEB (microscope électrique à balayage) typique des antennes fabriquées par lithographie électronique. Ces antennes sont très fragiles puisque ce sont des nano-disques d'or isolés et déposés par évaporation sur une lamelle de verre. Dans certains cas, lors d'un balayage AFM, nous déplaçons les antennes. La figure III.4(b) est l'image MEB d'une antenne à trois disques après le balayage. Dans cette expérience, le disque qui se trouve à gauche de l'image MEB a été déplacé. La position initiale de ce disque est en dessous des deux disques alignés. Ces effets indésirables



Figure III.4 – (a) Image MEB d'une antenne de 3 disques typique avant le balayage. (b) Image MEB d'une autre antenne de 3 disques après le balayage. Barre noire : 200 nm.

illustrent l'extrême difficulté de nos expériences qui nécessitent de maintenir le nano-objet fluorescent greffé à l'extrémité de la pointe et de ne pas modifier l'échantillon d'un bout à l'autre des mesures.

III.2.2 Cartes expérimentales

L'obtention de bonnes cartes de l'intensité de fluorescence et de LDOS dépend non seulement des échantillons réussis, mais aussi de la position où l'émetteur est accroché à la pointe. Dans la section II.4.3, nous avons présenté le protocole permettant d'accrocher un émetteur au bout de la pointe. Le problème principal de cette méthode est que nous ne pouvons pas contrôler la position où l'émetteur est fixé sur la pointe. Ceci a des conséquences directes sur les cartes de l'intensité de fluorescence et de la LDOS. Par exemple, la hauteur à laquelle l'émetteur se situe joue un rôle prépondérant puisqu'elle fonctionne comme un filtre passe bas et élimine les hautes fréquences spatiales du champ électromagnétique [20]. La figure III.5 montre un exemple où l'émetteur est accroché trop haut par rapport à l'extrémité de la pointe AFM.

La figure III.5 présente deux cartes optiques : la carte de l'intensité de fluorescence et la carte de LDOS, qui sont réalisées en même temps lors d'un balayage sur une nanoantennes d'or composée de trois disques de diamètre de 150 nm, hauteur de 30 nm et espacés de 75 nm. Les cartes sont obtenues en utilisant une bille de polystyrène de 100 nm de diamètre. Sur les deux cartes, nous ne pouvons pas distinguer les disques. Lorsque la bille est accrochée trop haut, la résolution optique est nettement dégradée puisque les détails sub-longueur d'onde sont associés à des ondes évanescentes qui décroissent très rapidement en fonction de la hauteur. Ceci est détaillé dans la suite de ce chapitre. Pour obtenir des cartes bien résolues, il faut donc impérativement accrocher la bille le plus proche possible de l'extrémité de la pointe AFM.

Des résultats satisfaisants sont montrés sur la figure III.7 et ont été obtenus sur une chaine linéaire composée de 3 disques en or de diamètre de 150 nm, hauteur de 30 nm et séparés de 50 nm. Trois signaux sont enregistrés simultanément pendant le même balayage : la topographie, l'intensité de fluorescence et la durée de vie. Ces trois cartes sont montrées sur les figures III.7(a) ,(b), et (c) respectivement. La figure III.6 est une vue artistique de la sonde fluorescente et l'antenne étudiée. Avec notre protocole d'accroche, la bille fluorescente de 100 nm est très probablement accrochée sur le côté de la pointe d'AFM. Ceci est important en vue de la compréhension de la carte de topographie comme nous le verrons dans ce qui suit.



Figure III.5 – Carte de l'intensité de fluorescence (a) et carte de taux de désexcitation (LDOS) (b) réalisées sur une nano-antennes d'or composée de trois disques de diamètre de 150 nm, hauteur de 30 nm et espacés de 75 nm.



Figure III.6 – Sonde fluorescente à balayage en champ proche de nano-antenne en or.

Le signal de topographie (figure III.7(a)) montre trois objets avec une hauteur de 30 nm, ce qui correspond bien au nombre de disques et à la hauteur des disques attendues. Toutefois les disques ne sont pas circulaires comme prévu, mais plutôt elliptiques. Ceci est dû à la forme de la sonde fluorescente que nous utilisons. En effet, la topographie est une convolution de la sonde fluorescente et l'échantillon étudié. Dans notre cas, la sonde fluorescente à balayage est composée d'une pointe AFM et d'une bille de 100 nm de diamètre, et l'extrémité de la pointe est de 100 nm environ selon les images MEB que nous avons montrées dans la section II.4.1. Avec notre protocole d'accroche, la bille est très probablement accrochée à côté de la pointe AFM et non à son extrémité, comme montré sur la figure III.6. Pendant le balayage, les disques sont donc balayés deux fois, une fois par la pointe et une fois par la bille, ce qui produit la forme elliptique dans la topographie. Le petit axes de l'ellipse est déterminé par la taille de la pointe ou de la bille.



Par contre, le grand axes est donné par la taille totale des deux objets. La topographie confirme donc l'hypothèse que la bille est accrochée à côté de la pointe AFM.

Figure III.7 – Résultats expérimentaux : (a) Topographie de l'échantillon. (b) Carte de l'intensité de fluorescence. (c) Carte de taux de désexcitation (LDOS). Les cercles en pointillé, tirées de la carte de topographie et de la carte d'intensité, représentent la position des disques.

En plus de la topographie, deux cartes optiques sont acquises en même temps que la topographie : la carte de l'intensité de fluorescence et la carte de taux de désexcitation, qui est l'inverse de la durée de vie. A la différence de ce qu'il se passe pour la carte de topographie, la résolution des cartes optiques est donnée par la bille fluorescente de 100 nm. Sur la carte de l'intensité de fluorescence (III.7b), nous pouvons observer trois zones noires circulaires où l'intensité de fluorescence diminue par rapport à sa valeur sur le verre. Ceci est dû à l'absorption par l'antenne. Ces trois régions sont entourées par trois

cercles en pointillé qui représentent la position exacte des disques. Ils sont reportés sur la topographie et la carte de LDOS. Les cercles en pointillé coïncident avec la partie en haut de l'ellipse, ce qui montre que l'antenne est d'abord balayée par la bille fluorescente et ensuite par la pointe d'AFM. A noter que la combinaison de la carte de topographie et de la carte de l'intensité de fluorescence nous renseigne sur la position de la bille par rapport à la pointe d'AFM.

Concernant la carte du taux de désexcitation (III.7c), elle est proportionnelle à la LDOS. Dans cette carte, nous pouvons observer trois régions où le taux de désexcitation est d'environ 30% plus grand qu'ailleurs. Ces trois régions ont une extension latérale d'environ 60 nm, séparées de 100 nm. Deux régions se trouvent dans les gaps entre les disques, et la troisième région se trouve à l'extêmité de l'antenne. L'emplacement de ces régions sera expliqué dans la suite du chapitre par les simulations.

Il est important de distinguer la carte de l'intensité de fluorescence et la carte de LDOS car elles apportent des informations différentes. Comme nous le verrons dans le chapitre IV, l'intensité de fluorescence que nous pouvons détecter en champ lointain est proportionnelle au nombre de photons émis en champ lointain, autrement dit au nombre de canaux radiatifs. Quant à la LDOS, elle est proportionnelle au nombre de canaux totaux disponibles pour la désexcitation qui est la somme des canaux radiatifs et non-radiatifs. Il est possible d'avoir dans une région précise une très petite intensité de fluorescence et une très grande LDOS, mais l'inverse dans une autre région. Les deux cartes sont donc complémentaires. Dans des conditions très particulières d'excitation et de détection, nous pouvons même décomposer les modes radiatifs et non-radiatifs en combinant la cartes d'intensité et la carte de LDOS. Cette décomposition peut être très intéressante pour différentes applications. Par exemple, pour réaliser une source de photon unique efficace [69], il faut maximiser le taux de désexcitation radiatif pour avoir le plus d'émission de photons en champ lointain. Par contre, si nous voulons concevoir une cellule solaire à haute absorption [70], il vaut mieux maximiser le taux de désexcitation non-radiatif afin de maximiser l'absorption dans la matière. Les détails de cette méthode sont présentés dans le chapitre IV.

III.3 Simulations numériques

Avec notre montage expérimental, nous avons réussi à acquérir simultanément la topographie, la carte de l'intensité de fluorescence et la carte de taux de désexcitation. Ceci nous permet de relier la carte de topographie et les cartes optiques afin de déterminer la distribution des points chauds (*hot spots*) sur l'antenne où une forte augmentation de LDOS peut être observée. La combinaison de ces trois cartes permet aussi de déterminer la position de l'antenne et la position de la bille fluorescente par rapport à la pointe. Des simulations numériques ont été effectuées dans l'équipe pour avoir une meilleure compréhension des phénomènes observés.

III.3.1 Méthode de simulation

Des simulations ont été effectuées au sein de l'équipe par Alexandre Cazé et Romain Pierrat. Tous les détails relatifs aux simulations sont présentés dans la thèse d'Alexandre
Cazé [71] et les références [26, 72].

La méthode intégrale de volume est utilisée pour les simulations, elle est basée sur l'équation de Lippmann-Schwinger

$$\mathbf{E}(\mathbf{r},\omega) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r},\omega) + k^2 \int_V [\epsilon(\omega) - 1] \mathbf{G}_0(\mathbf{r},\mathbf{r}',\omega) \mathbf{E}(\mathbf{r}',\omega) d\mathbf{r}'$$
(III.1)

où V est le volume occupé par l'or, \mathbf{E}_0 est le champ incident, \mathbf{G}_0 est la fonction de Green du milieu hôte (le vide dans nos simulations) et $\epsilon(\omega)$ est la constante diélectrique de l'or dont la valeur a été extraite de la référence [73]. Les simulations sont réalisées en discrétisant le volume d'intégration V en petites cellules cubiques (la taille latérale est 5 nm) et nous considérons que le champ est constant dans chaque cellule. La fonction de Green est intégrée analytiquement sur la cellule pour améliorer la convergence de la méthode [74]. Cette équation décompose le champ électromagnétique en deux parties : le champ incident et le champ diffusé. Avec cette équation, nous pouvons calculer le champ à tout point de l'espace en respectant les conditions d'éclairement et de détection de l'expérience. Une fois que le champ électromagnétique est calculé, la fonction de Green totale du milieu peut être déduite à partir de l'équation $\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mu_0 \omega^2 \mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, \omega) \mathbf{p}$. La LDOS est calculée à partir de la partie imaginaire de la fonction de Green tout en respectant les conditions imposées dans l'expérience.

Carte de LDOS

Le taux de désexcitation d'un dipôle moyenné sur toutes les orientations est donné par

$$\Gamma = \frac{\pi\omega}{3\epsilon_0\hbar} \left| \mathbf{p} \right|^2 \rho(\mathbf{r}, \omega) \tag{III.2}$$

où $\rho(\mathbf{r}, \omega)$ est la LDOS. La LDOS au point \mathbf{r} et à la fréquence ω peut être écrite en utilisant la fonction de Green :

$$\rho(\mathbf{r},\omega) = \frac{2\omega}{\pi c^2} \operatorname{Im}\left[\operatorname{Tr}\mathbf{G}(\mathbf{r},\mathbf{r},\omega)\right]$$
(III.3)

où Tr désigne la trace d'un tenseur. Le calcul de la fonction de Green par l'équation de Lippmann-Schwinger nous donne accès à la LDOS.

Carte d'intensité de fluorescence

Dans l'expérience, l'émetteur fluorescent se trouve au dessus de l'échantillon et nous excitons et collectons par le bas. Pour rester dans la même configuration que l'expérience pour le calcul de l'intensité de fluorescence, les simulations sont décomposées en deux parties comme schématisé sur la Figure III.8. Dans un premier temps, une onde plane illumine l'émetteur fluorescent et la nanoantenne. La bille de polystyrène remplie de molécules fluorescentes est remplacée par une sphère avec 100 dipôles rangés aléatoirement à l'intérieur, la direction d'orientation des dipôles est aléatoire aussi. L'intensité du champ à la position de l'émetteur est calculée. Ensuite, les dipôles qui se trouvent dans la sphère sont utilisés comme source d'illumination pour simuler la fluorescence de la bille et la fluorescence de la bille après interaction avec la nano-structure est calculée.



Figure III.8 – Schéma simplifié pour les simulations. (a) Chemin d'excitation. (b) Chemin d'émission.

Le signal de fluorescence dépend entre autre de l'intensité d'excitation et de la compétition entre la désexcitation dans les canaux radiatifs et non-radiatifs. Pour calculer l'intensité de la fluorescence, il faut donc calculer précisément l'influence de la présence de la structure sur l'excitation et l'émission de l'émetteur.

Si l'émetteur fluorescent est loin de la saturation, l'intensité de fluorescence détectée est

$$I = A\sigma(\omega_{exc}) \left[\int_{\Omega} \eta(\omega_{fluo}, \mathbf{u}_{\Omega}) \right] K^2(\omega_{exc}) I_{inc}$$
(III.4)

Dans cette équation, A est le paramètre de calibration de la détection qui prend en compte la transmission des filtres, l'efficacité de détection, etc. $\sigma(\omega_{exc})$ est la section efficace d'absorption de la bille fluorescente. $K^2(\mathbf{r}, \omega_{exc})$ et $\eta(\mathbf{r}, \omega_{fluo}, \mathbf{u}_{\Omega})$ sont l'exaltation d'intensité locale à la longueur d'onde d'excitation et le rendement quantique apparent. Le calcul de ces deux quantités est détaillé dans ce qui suit.

(1) L'augmentation d'intensité d'excitation locale. Quand la nano-structure est illuminée par une onde plane \mathbf{E}_{inc} , le champ incident est modifié par la présence de la structure. En calculant le champ \mathbf{E}_{exc} en présence de la structure avec l'équation de Lippmann-Schwinger, nous pouvons en déduire l'augmentation d'intensité locale :

$$K^{2}(\mathbf{r}, \omega_{exc}) = \frac{|\mathbf{E}_{exc}(\mathbf{r}, \omega_{exc})|^{2}}{|\mathbf{E}_{inc}(\mathbf{r}, \omega_{exc})|^{2}}$$
(III.5)

Dans cette étape, pour simuler le laser non-polarisé utilisé dans les expériences, nous moyennons sur les deux directions orthogonales de polarisations contenues dans le plan de l'échantillon.

(2) Le rendement quantique apparent. Une fois l'émetteur fluorescent excité, il émet de la fluorescence et devient la source d'illumination du système. Une sphère de diamètre 100 nm avec 100 dipôles rangés aléatoirement à l'intérieur est utilisée pour simuler la bille fluorescente dans l'expérience. La radiation émise peut soit irradier en champ lointain, soit transférer son énergie non-radiativement à l'environnement et être absorbée. Le rendement quantique apparent dans la direction de détection \mathbf{u} est défini comme

$$\eta(\mathbf{r}, \omega_{fluo}, \mathbf{u}_{\Omega}) = \frac{\Gamma^R(\mathbf{u}_{\Omega})}{\Gamma^R + \Gamma^{NR}}$$
(III.6)

où Γ^{NR} est la puissance absorbée par l'environnement et Γ^R est la différence entre Γ et Γ^{NR} . Les détails du calculs de Γ^{NR} et $\Gamma^R(\mathbf{u}_{\Omega})$ sont présentés dans la thèse d'Alexandre Cazé [71].

La procédure de simulation pour calculer la carte d'intensité est résumée ici.

(1) Pour un point sur la carte de l'intensité de fluorescence, nous choisissons 100 positions aléatoirement distribuées dans une sphère de diamètre 100 nm pour modéliser la bille fluorescente.

(2) Nous illuminons la nano-structure par une onde plane. L'équation de Lippmann-Schwinger est résolue pour calculer l'augmentation de l'intensité d'excitation locale $K^2(\mathbf{r}, \omega_{exc})$ à travers la structure pour chaque position et deux polarisations orthogonales d'excitation.

(3) Nous illuminons la structure par une source dipolaire. Cette fois, grâce à l'équation de Lippmann-Schwinger nous calculons le rendement quantique apparent $\eta(\mathbf{r}, \omega_{fluo}, \mathbf{u})$, autrement dit la modification de la fluorescence due à la présence de la structure, pour chaque position et trois directions orthogonales du dipôle source.

(4) Ayant obtenu les valeurs de l'intensité de fluorescence pour 100 positions dans la sphère et pour deux polarisations et trois directions du dipôle source, la moyenne de ces valeurs nous donne l'intensité de fluorescence.

(5) Nous répétons la procédure pour chaque point de la carte de l'intensité de fluorescence.

III.3.2 Résultats des simulations et comparaison avec l'expérience

Les résultats des simulations sont présentés sur la figure III.9. La distance entre le bas de la bille et le haut de l'antenne est fixée à d = 20 nm. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement définies à $\lambda_{exc} = 560$ nm et $\lambda_{fluo} = 605$ nm. La structure simulée est la même que celle que nous avons étudiée dans l'expérience.

La figure III.9(a) est la vue de dessus de la topographie de l'antenne utilisée pour les simulations. Elle est différente de la carte de topographie obtenue dans l'expérience qui est la convolution de la géométrie de la sonde fluorescente et de l'antenne.

La carte de l'intensité de fluorescence et la carte de LDOS sont calculées en balayant la bille fluorescente au-dessus de l'antenne. Dans la carte d'intensité (III.9(b)), trois régions où l'intensité de fluorescence diminue sont observées en correspondance des trois disques, ce qui confirme ce que nous avons observé sur la carte d'intensité expérimentale sur la figure III.7. De plus, l'expérience et les simulations présentent presque un accord quantitatif.

Dans la carte de LDOS simulée (III.9(c)), deux régions où il y a 30% d'augmentation en LDOS sont présentes entre les disques. Ces deux régions ont une extension latérale d'environ 60 nm et sont distantes de 100 nm comme dans le cas de l'expérience. Deux autres régions d'augmentation de la LDOS sont visibles aux extrémités de l'antenne. Dans ces deux régions, l'augmentation de LDOS est plus faible. Par contre, dans l'expérience



Figure III.9 – (a) Vue de dessus de la topographie du trimère discrétisé. A noter que le trimer est de 30 nm d'épaisseur comme celui que nous utilisons dans l'expérience. (b) Carte de l'intensité de fluorescence simulée (unité arbitraire). (c) Carte de LDOS simulée, normalisée par son valeur dans le vide.

nous n'observons une augmentation de LDOS que sur la partie située à droite de l'antenne. Une explication possible est l'asymétrie de la structure pendant la fabrication. Les défauts de fabrication de l'antenne influencent beaucoup la distribution du champ électromagnétique à la surface de l'antenne [75], ainsi que la localisation des points chauds. Nous avons effectué des simulations sur les structures asymétriques, et nous avons observé des asymétries dans les cartes de LDOS. Cependant, comme la forme exacte de l'antenne est inaccessible au niveau de résolution requis, il est très difficile d'avoir un accord exact entre ce que nous simulons et ce que nous étudions. Les discussions menées dans ce chapitre sont limitées à une comparaison entre les expériences et les simulations réalisées sur une antenne constituée de trois disques parfaitement circulaires et régulièrement espacés. La diminution de l'intensité de fluorescence en correspondance des disques et l'apparition de deux zones d'augmentation de LDOS entre les disques, dans l'expérience et les simulations, nous montrent la pertinence de notre méthode et valident l'étude menée.

III.3.3 Résolution de la sonde fluorescente

Une caractéristique intéressante dans les cartes de LDOS est que, que ce soit dans les cartes expérimentales ou simulées, la variation de LDOS se manifeste à des échelles plus petites que 100 nm, qui est la taille de la bille fluorescente. Pour expliquer ce phénomène, nous comparons, à l'aide des simulations, la contribution des émetteurs qui se trouvent en haut de la sphère et en bas de la sphère sur la LDOS. Les figures III.10(a,b) montrent les cartes de LDOS moyennées sur les 100 émetteurs dans la sphère à deux distances

différentes entre le bas de la sphère et le haut de l'antenne. Les figures III.10(c,d) et III.10(e,f) montrent, respectivement, les cartes de LDOS simulées en prenant en compte seulement les émetteurs qui se trouvent dans la partie basse ou la partie haute de la sphère.



Figure III.10 – Cartes de LDOS simulées pour deux distances *d* entre le bas de la bille et le haut de l'antenne : (a,b) Cartes moyennées sur les 100 émetteurs répartis aléatoirement dans la bille normalisées par la LDOS du vide ρ_0 . (c,d) Cartes moyennées sur les 48 émetteurs localisés dans la partie basse de la bille. (e,f) Cartes moyennées sur les 52 émetteurs localisés dans la partie haute de la bille. (g,h) Profil axial des cartes (a,c,e) et (b,d,f) respectivement suivant les lignes indiquées dans les cartes. Dans les deux cartes, la LDOS est normalisée par sa valeur maximale ρ_{max} pour quantifier le contraste de l'image. Diamètre de la bille : 100 nm.

La comparaison entre les figures III.10(a) et (b) montre que les petits détails présents dans les cartes de LDOS (par exemple les deux points chauds qui se trouvent aux deux extrémités de l'antenne) ont disparu quand la distance entre la bille et l'antenne augmente. En effet, les détails sub-longueur d'onde sont associés à des ondes évanescentes et peuvent seulement être sondés par les émetteurs qui se trouvent en champ proche du système [25]. Cette étude nous confirme aussi que dans l'expérience, la distance entre la bille et l'antenne est de l'ordre de 20 nm puisque nous pouvons observer les points chauds qui se trouvent aux deux extrémités de l'antenne.

Une étude approfondie des figures III.10(a, c et e) nous permet d'affirmer que la résolution de la carte de LDOS n'est pas limitée par la taille de la bille fluorescente. La ressemblance entre les figures III.10(a) et (c) montre que la carte de LDOS est donnée par les émetteurs qui se trouvent dans le bas de la sphère. Les détails, comme les points chauds qui se trouvent à gauche et à droite de l'antenne, ont disparu quand nous ne prenons en compte que les émetteurs situés dans le haut de la sphère. Ceci est encore plus

visible si nous regardons les coupes des cartes de LDOS dans les trois cas. Les vues de coupes des cartes sont présentées dans les figures III.10(g,h) pour d = 20 nm et d = 50 nm. Pour comparer le contraste correctement, nous normalisons la LDOS par sa valeur maximale ρ_{max} . L'augmentation de LDOS à gauche de l'antenne est plus prononcée quand la moyenne est effectué sur les émetteurs localisés en bas de la sphère, et nous ne pouvons pas distinguer une augmentation locale de LDOS dans la partie gauche de la courbe en moyennant sur les émetteurs situés dans le haut de la sphère. La résolution est clairement donnée par les émetteur situés en bas de la sphère. Dans notre expérience, nous avons une résolution d'environ 50 nm en utilisant une bille de 100 nm. Dans le cas d = 50 nm, même si la courbe est différente dans les trois cas, les petits détails ne sont pas observables puisque même les émetteurs en bas de la sphère sont trop loins de l'antenne.

III.4 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats expérimentaux que nous avons obtenus en mesurant simultanément la topographie, la carte de l'intensité de fluorescence et la carte de taux de désexcitation fluorescente avec une résolution latérale d'environ 50 nm. L'utilisation de la sonde fluorescente à balayage donne accès au positionnement précis de l'émetteur fluorescent par rapport à l'échantillon d'intérêt et à la mesure de la LDOS en champ proche de l'échantillon. Même si l'échantillon étudié dans notre cas est une antenne métallique, le système est adapté à d'autres structures plasmoniques ou diélectriques. Ceci ouvre la voie vers la caractérisation des modes électromagnétiques de nano-structures photoniques, le couplage des émetteurs avec les échantillons plasmoniques ou diélectrique.

La principale contrainte de cette technique consiste à trouver un émetteur fluorescent de petite taille mais qui présente une grande intensité de fluorescence stable pendant un jour typiquement. L'utilisation d'une bille de polystyrène de 100 nm est un compromis entre la taille et l'intensité de fluorescence. Il pourrait être intéressant d'utiliser un dipôle unique pour caractériser le champ électromagnétique par la technique présentée dans ce chapitre. Toutefois, même si l'accrochage d'un tel émetteur à la pointe d'AFM ne constitue pas un problème, nous ne somme pas capables actuellement de contrôler l'orientation du dipôle au moment de l'accroche. Comme les signaux mesurés dépendent de l'orientation, il faudrait répéter les mesures au moins trois fois pour obtenir les cartes avec trois orientations différentes du moment dipolaire. Une autre approche consiste à déposer des molécules uniques sur un substrat et à balayer au dessus une antenne gravée sur une pointe d'AFM [68]. Comme ceci peut prendre beaucoup de temps, les billes fluorescentes contenant de nombreuse molécules fluorescentes sont de bons candidats pour réaliser une caractérisation moyennée sur les trois directions de l'espace.

Chapitre IV

Cartographie de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif

Table des matières

IV.1 Motivation et état de l'art 6	0
IV.2 Modèle théorique 6	5 1
IV.2.1 Théorème de réciprocité	51
IV.2.2 Application au cas expérimental	53
Géométrie d'excitation et de détection identiques 6	53
Longueur d'onde d'excitation et d'émission identiques $\ldots \ldots $	64
IV.3 Mesures statistiques	6
IV.3.1 Description des échantillons étudiés	6
IV.3.2 Problèmes rencontrés	59
IV.4 Mesures AFM	$\mathbf{'1}$
IV.4.1 Echantillons étudiés et source fluorescente	'1
IV.4.2 Résultats \ldots	'1
IV.5 Comparaison avec les simulations	5
IV.5.1 Comparaison avec les cartes effectives	$\mathbf{'5}$
IV.5.2 Comparaison avec les cartes réelles	'5
IV.6 Conclusions et perspectives	7

IV.1 Motivation et état de l'art

Depuis le travail pionner de Drexhage [18], il est connu que le taux de désexcitation spontané des émetteurs fluorescents est modifié au voisinage de structures métalliques. Or, le changement du taux de désexcitation spontané provient d'une part du nombre de canaux de désexcitation radiatifs (correspondant à l'émission de photons en champ lointain) et d'autre part du nombre de canaux non-radiatifs (absorption par le métal)[21]. En fonction de l'application visée (ex : une source de photon unique efficace ou un inhibiteur efficace de fluorescence), il sera intéressant d'augmenter soit le taux de désexcitation radiatif soit le taux de désexcitation non-radiatif. La décomposition du taux de désexcitation radiatif et non-radiatif est donc devenue un sujet crucial pour la caractérisation de nano-structures dédiées au contrôle de l'interaction lumière-matière.

Malgré l'intérêt de ce sujet, les mesures de taux de désexcitation radiatif et nonradiatif restent très difficiles. Dans les références [2, 76], les expériences sont réalisées dans la situation où l'environnement dans lequel se situe exactement l'émetteur fluorescent ne change pas de façon à pouvoir considérer que le taux de désexcitation non-radiatif reste constant. Ceci constitue une hypothèse assez forte et contraignante pour l'applicabilité générale de la méthode. Un autre article utilisant la mesure de durée de vie et de l'intensité de fluorescence [39] sépare le taux de désexcitation radiatif et non-radiatif tout en considérant la détection totale des photons irradiés en champ lointain. D'autres méthodes, telles que la spectroscopie à corrélation de fluorescence en milieu liquide [77] ou la mesure de rendement quantique [78, 79], sont aussi utilisées pour aborder la décomposition du taux de désexcition radiatif et non-radiatif. Cependant une méthode pertinente et applicable dans le cas général reste à développer.

Dans cet esprit, nous avons développé une expérience de cartographie des taux de désexcitation radiatif et non-radiatif en utilisant une sonde fluorescente balayée en champ proche d'une nano-antenne métallique. La sonde fluorescente à balayage nous permet d'acquérir simultanément la carte d'intensité et la carte du taux de désexcitation de fluorescence, qui est proportionnel à la LDOS. Le coeur de cette expérience consiste à acquérir les deux cartes simultanément dans une géométrie rigoureusement confocale où le chemin d'excitation coïncide exactement avec le chemin de détection. Ceci permet d'appliquer le théorème de réciprocité qui sépare les contributions radiatives et non-radiatives par un calcul analytique, comme nous allons le détailler dans ce chapitre. L'acquisition simultanée de deux cartes et l'application du théorème de réciprocité, permet de compter proprement le nombre de modes radiatifs pour l'antenne étudiée. Les résultats expérimentaux sont ensuite validés par des simulations numériques.

Ce chapitre est construit de la manière suivante : dans un premier temps nous détaillons le théorème de réciprocité et l'application au cas expérimental. Ensuite une étude statistique sur la décomposition des contributions radiatives et non-radiatives a été menée et nous présentons les difficultés que nous avons rencontrées dans cette étude statistique. Enfin, nous présentons la réalisation finale de l'expérience avec le système AFM et les résultats de cartographie de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif sur des échantillons de nano-antennes. Les résultats obtenus sont comparés avec des simulations numériques pour vérifier la validité de la méthode.

IV.2 Modèle théorique

Le modèle théorique que nous allons utiliser consiste à extraire le taux de désexcitation radiatif à partir de la mesure de l'intensité de fluorescence et de la durée de vie de l'émetteur, qui est l'inverse du taux de désexcitation. L'intensité de la fluorescence émise par un dipôle qui se situe en champ proche d'une nano-structure métallique dépend de deux processus. (1) le changement de l'excitation locale à la position de l'émetteur à cause de la nano-structure, (2) la compétition entre émission radiative et non radiative, qui dépend aussi de l'environnement. Explicitement, l'intensité de fluorescence dépend de l'excitation locale à la position de l'émetteur, de son rendement quantique et de sa section efficace d'absorption.

Pour un émetteur qui se situe à la position \mathbf{r}_0 , l'intensité de fluorescence I_{fluo} reçue sur le détecteur situé à \mathbf{r}_D s'écrit :

$$I_{fluo}(\mathbf{u}, \mathbf{r}_D, \omega) = A \frac{\Gamma_{\mathbf{u}}^R(\omega_{fluo})}{\Gamma(\omega_{fluo})} \sigma_{abs}(\omega_{exc}) I_{exc}(\mathbf{r}_0, \omega_{exc})$$
(IV.1)

où $\Gamma_{\mathbf{u}}^{R} = \int_{\Omega} \Gamma^{R}(\mathbf{u}) d\Omega$ est le taux de désexcitation radiatif intégré sur l'angle solide de détection Ω (\mathbf{u} est le vecteur unitaire qui définit la direction de détection), et Γ le taux de désexcitation total. A est le coefficient d'efficacité de détection qui prend en compte la transmission du système optique, σ_{abs} est la section efficace d'absorption de l'émetteur et $I_{exc}(\mathbf{r}_{0})$ l'excitation locale sur l'émetteur.

Dans cette équation, l'intensité de fluorescence et le taux de désexcitation total peuvent être mesurés par la méthode que nous avons décrite dans le chapitre précédent. Le coefficient de détection et la section efficace d'absorption de l'émetteur peuvent être déterminés par une mesure de référence. Pour extraire le taux de désexcitation radiatif, il reste le terme $I_{exc}(\mathbf{r}_0)$ à la position de l'émetteur que nous ne pouvons pas mesurer. Une contrainte supplémentaire doit être appliquée pour résoudre l'équation. Celle-ci est fournie par le théorème de réciprocité, qui nous permet de relier l'excitation locale avec le taux de désexcitation radiatif.

IV.2.1 Théorème de réciprocité

Considérons un dipôle rayonnant de moment dipolaire $\mathbf{p}_a = p_a \mathbf{u}_a$ placé au point \mathbf{r}_D et mesurons le champ électrique reçu au point \mathbf{r}_0 . Le vecteur \mathbf{u}_a est le vecteur unitaire de même orientation que le moment dipolaire \mathbf{p}_a (voir figure IV.1 (a)).



Figure IV.1 – (a) Un dipôle \mathbf{u}_a au point \mathbf{r}_D émet un champ dans un environnement diffusant et absorbant, mesuré au point \mathbf{r}_0 . (b) Un dipôle \mathbf{u}_1 au point \mathbf{r}_0 émet un champ dans un environnement diffusant et absorbant, mesuré au point \mathbf{r}_D .

Dans la situation inverse, nous pouvons considérer qu'un dipôle de moment dipolaire $\mathbf{p}_1 = p_1 \mathbf{u}_1$ orienté selon le vecteur unitaire \mathbf{u}_1 , placé en \mathbf{r}_0 émet un rayonnement et nous mesurons le champ électrique reçu au point \mathbf{r}_D (voir Figure IV.1 (b)).

Si la longueur d'onde d'émission des deux dipôles est la même et le milieu est réciproque (les tenseurs ϵ et μ , la permittivité diélectrique et la perméabilité magnétique respectivement, sont symétriques), le théorème de réciprocité pour les ondes électromagnétiques [80, 81] s'applique et nous pouvons écrire :

$$\mathbf{u}_1 \cdot \mathbf{E}_a = \mathbf{u}_a \cdot \mathbf{E}_1 \tag{IV.2}$$

Nous avons considéré deux dipôles de même amplitude $p_1 = p_a = 1$. Le taux d'émission radiatif est proportionnel à la puissance rayonnée au point \mathbf{r}_D , polarisée selon la direction \mathbf{u}_a , par le dipôle classique \mathbf{u}_1 . Ceci permet d'écrire :

$$\int_{\Omega} \Gamma^{R}(\mathbf{u}_{1}, \mathbf{u}_{a}, \mathbf{r}_{D}, \omega_{fluo}) d\Omega = B |\mathbf{u}_{a} \cdot \mathbf{E}_{1}|^{2}$$
(IV.3)

où B est une constante qui prend en compte entre autre l'efficacité de détection.

En appliquant le théorème de réciprocité, l'équation précédente s'écrit :

$$\int_{\Omega} \Gamma^{R}(\mathbf{u}_{1}, \mathbf{u}_{a}, \mathbf{r}_{D}, \omega_{fluo}) d\Omega = B |\mathbf{u}_{1} \cdot \mathbf{E}_{a}|^{2}$$

$$= BI_{exc}(\mathbf{u}_{1}, \mathbf{u}_{a}, \mathbf{r}_{0}, \omega_{exc})$$
(IV.4)

Nous avons donc relié l'intensité d'excitation locale reçue par un dipôle situé au point \mathbf{r}_0 au taux de désexcitation radiatif pour une direction d'excitation et une polarisation données. En combinant les équations IV.1 et IV.4, l'intensité de fluorescence s'écrit :

$$I_{fluo}(\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_a, \mathbf{r}_D, \omega_{fluo}) = \frac{A}{B} \sigma_{abs}(\omega_{exc}) \frac{(\int_{\Omega} \Gamma^R(\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_a, \mathbf{r}_D, \omega_{fluo}) d\Omega)^2}{\Gamma(\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_a, \mathbf{r}_D, \omega_{fluo})}$$
(IV.5)

L'application de ce théorème dans le cas expérimental nécessite de prendre en compte les conditions réelles.

IV.2.2 Application au cas expérimental

Pour appliquer le théorème de réciprocité, il faut remplir deux conditions : (1) les géométries d'excitation et de détection doivent coïncider. (2) la longueur d'onde d'excitation doit être identique à la longueur d'onde d'émission.

Géométrie d'excitation et de détection identiques

Cette condition est vérifiée si l'expérience est effectuée à l'aide d'un microscope confocal utilisant le même trou de confocalité pour l'excitation et l'émission. Le montage que nous avons décrit précédemment (section II.5) doit pour cette raison être modifié. Nous présentons sur la figure IV.2 le montage expérimental complet pour l'expérience et les schémas simplifiés. Un trou de confocalité est introduit dans le chemin optique à la sortie du microscope (Fig IV.2(a)) de telle façon que l'excitation et l'émission passent toutes deux par ce trou de confocalité.



Figure IV.2 – (a) Montage expérimental complet pour l'expérience. L'échantillon est monté sur un microscope confocal inversé combiné à un système AFM fait maison. Une pointe AFM en silice, au bout de laquelle une bille fluorescente de 100 nm est accrochée, est amenée en champ proche de l'échantillon. Une source laser super-continuum pulsée est spectralement filtrée à $\lambda_{exc} = 560$ nm (filtre passe bande, SemRock FF01-560/14-25), passe à travers le trou de confocalité de 150 μm et puis est focalisé sur la bille fluorescente à travers un objectif à l'huile de grande ouverture numérique (NA=1.4). La fluorescence est collectée par le même objectif à huile, passe par le même trou de confocalité et puis est séparée de l'excitation par un miroir dichroïque (SemRock Di01-594R-25X36) ainsi qu'un filtre de fluorescence (filtre passe haut, SemRock BLP01-594R-25). Enfin, un miroir amovible permet de choisir entre l'observation plein champ de l'échantillon sur la caméra CCD ou les mesures de l'intensité de fluorescence et de temps de vie à l'aide d'une photodiode à avalanche, qui nous permet d'acquérir simultanément les cartes d'intensité et de durée de vie. (b,c) Schémas simplifiés du montage optique de l'expérience : (b) Chemin d'excitation. (c) Chemin de détection.

Un émetteur fluorescent accroché sur une pointe AFM est balayé en champ proche d'un échantillon métallique (Fig IV.2(b)). Le laser d'excitation passe par un trou de confocalité et est focalisé par un objectif à huile sur l'émetteur. L'émission de fluorescence de l'émetteur est ensuite collectée par le même objectif et repasse par le même trou de confocalité (Fig IV.2(b)). Avec ce trou de confocalité qui se trouve dans le chemin d'excitation et le chemin d'émission, nous excitons et détectons par le même mode optique. La première condition du théorème de réciprocité est donc remplie.

Longueur d'onde d'excitation et d'émission identiques

Une différence entre le cas expérimental et le cas idéal est que la bille fluorescente a une taille finie, et contient des centaines de molécules fluorescentes qui peuvent être considérées comme des dipôles orientés aléatoirement. Il faudra donc moyenner sur les trois directions pour prendre en compte la nature de la bille.

De plus, pour relier $|\mathbf{u}_1 \cdot \mathbf{E}_a|^2 = |\mathbf{u}_a \cdot \mathbf{E}_1|^2$ par le théorème de réciprocité dans l'équation IV.4, la direction \mathbf{u}_a doit correspondre à la direction d'un analyseur placé devant le détecteur. Comme dans l'expérience, nous n'avons pas de sélection en polarisation à la détection, il faut moyenner sur les deux directions de polarisation également.

Finalement, la réponse de l'environnement aux longueurs d'onde d'excitation λ_{exc} et d'émission λ_{fluo} doit être identique pour garantir l'applicabilité du théorème de réciprocité. Pour l'émetteur fluorescent que nous avons choisi, $\lambda_{exc} = 560$ nm et $\lambda_{fluo} = 590$ nm. Au cours de cette thèse nous avons testé l'application du théorème de réciprocité sur des films d'or semi-continus et des nano-antennes plasmoniques. Le cas des films d'or semicontinus sera traité en détail dans la section IV.3. Le cas simple disque d'or est ci-dessous traité. Le théorème peut être appliqué en bon approximation en supposant $\lambda_{exc} = \lambda_{fluo}$ puisque la résonance de l'antenne est plus large que le décalage de Stokes de la bille fluorescente. La figure IV.3, tirée de la thèse [82], montre le spectre de réflexion simulé d'un disque d'or de diamètre 150 nm. L'intensité réfléchie à $\lambda_{exc} = 560$ nm et $\lambda_{fluo} = 590$ nm ne varie pas beaucoup. Nous pouvons donc considérer que la réponse de l'environnement à λ_{exc} et λ_{fluo} sont identiques.



Figure IV.3 – Spectre de réflexion simulé d'un disque d'or de diamètre 150 nm (Extrait de la thèse de Sarah Suck [4]).

Une fois validé l'applicabilité du théorème de réciprocité dans le cas expérimental, il faut calculer l'intensité de fluorescence en prenant en compte les deux directions de polarisation et les trois directions d'excitation. En moyennant sur les deux directions de polarisation, l'équation IV.5 devient :

$$I_{fluo}(\mathbf{u}_{1}, \mathbf{r}_{D}, \omega) = I_{fluo}(\mathbf{u}_{1}, \mathbf{u}_{a}, \mathbf{r}_{D}, \omega) + I_{fluo}(\mathbf{u}_{1}, \mathbf{u}_{b}, \mathbf{r}_{D}, \omega)$$
$$= \frac{A}{B} \sigma_{abs} \frac{(\Gamma_{1,\Omega}^{R})^{2}}{\Gamma_{1}}$$
(IV.6)

où $\Gamma_{1,\Omega}^R$ est une écriture simplifiée de $\int_{\Omega} \Gamma^R(\mathbf{u}_1, \mathbf{r}_D, \omega) d\Omega$, qui signifie le taux de désexcitation radiatif du dipôle \mathbf{u}_1 , intégré sur l'angle solide de détection Ω . La factorisation des deux termes de I_{fluo} est réalisable puisque $\Gamma(\mathbf{u}_1, \mathbf{r}_D, \omega) = \Gamma_1$ ne dépend pas de polarisation.

Si nous moyennons encore sur les trois directions d'excitation, l'intensité de fluorescence totale pour une bille fluorescente de 100 nm et une détection non polarisée sous l'angle solide de détection Ω s'écrit :

$$I_{tot} = \frac{A\sigma_{abs}}{B} \left[\frac{\left(\Gamma_{1,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma_{1}} + \frac{\left(\Gamma_{2,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma_{2}} + \frac{\left(\Gamma_{3,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma_{3}} \right]$$
(IV.7)

Pour simplifier et factoriser les termes entre crochets, nous les ré-écrivons de la façon suivante :

$$\frac{\left(\Gamma_{i,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma_{i}} = \frac{\left(\Gamma_{i,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma} \frac{\Gamma}{\Gamma_{i}}$$
(IV.8)

Nous faisons alors apparaître le facteur $\frac{\Gamma}{\Gamma_i} = C$ que nous appelons le facteur d'anisotropie de la LDOS. Si nous supposons que ce facteur est constant quelle que soit la polarisation et la position de détection (ce qui est une approximation), l'équation IV.7 devient :

$$I_{total} = \frac{A\sigma_{abs}}{B} \left[\frac{\left(\Gamma_{1,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma} \frac{\Gamma}{\Gamma_{1}} + \frac{\left(\Gamma_{2,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma} \frac{\Gamma}{\Gamma_{2}} + \frac{\left(\Gamma_{3,\Omega}^{R}\right)^{2}}{\Gamma} \frac{\Gamma}{\Gamma_{3}} \right]$$

$$= \frac{A\sigma_{abs}}{B} C \frac{\left[\left(\Gamma_{1,\Omega}^{R}\right)^{2} + \left(\Gamma_{2,\Omega}^{R}\right)^{2} + \left(\Gamma_{3,\Omega}^{R}\right)^{2}\right]}{\Gamma}$$
(IV.9)

Nous faisons donc apparaître la moyenne quadratique des taux de désexcitation radiatifs des trois directions, sous l'angle solide de détection. Nous définissons donc le taux de désexcitation radiatif effectif :

$$\Gamma_{rms,\Omega}^{R} = \sqrt{\frac{\left(\Gamma_{1,\Omega}^{R}\right)^{2} + \left(\Gamma_{2,\Omega}^{R}\right)^{2} + \left(\Gamma_{3,\Omega}^{R}\right)^{2}}{3}}$$
(IV.10)

et le taux de désexcitation non-radiatif apparent

$$\Gamma^{NR}_{rms,\Omega} = \Gamma - \Gamma^{R}_{rms,\Omega} = \Gamma^{NR} + \Gamma^{R}_{rms,4\pi-\Omega}$$
(IV.11)

Il est important de noter que $\Gamma_{rms,\Omega}^R$ représente la proportion de photons rayonnés en champ lointain dans l'angle solide de détection. Il s'agit de la grandeur physique qui nous intéresse le plus si nous voulons maximiser l'émission de fluorescence en champ lointain dans la direction de détection, qui est la direction "utile" pour l'expérimentateur. Le $\Gamma_{rms,\Omega}^{NR}$ prend en compte non seulement les pertes dans l'environnement dues à l'absorption caractérisées par un taux de désexcitation non-radiatif Γ^{NR} , mais aussi les photons qui sont émis en champ lointain en dehors de l'angle solide de détection, qui sont caractérisées par le taux de désexcitation radiatif $\Gamma_{rms,4\pi-\Omega}^R$. Cette contribution des photons émis hors de l'angle solide de détection pourrait être totalement supprimée en moyennant l'emploi d'un dispositif de mesure qui détecte les photons sur 4π stéradians. Si tel est le cas, le taux de désexcitation non-radiatif apparent est rigoureusement égal au taux de désexcitation non-radiatif réel Γ^{NR} .

Il reste encore une dernière étape à franchir, qui consiste à déterminer le préfacteur $A\sigma_{abs}C/B$. Pour cela nous effectuons une mesure de référence.

Cas de référence : bille loin de l'antenne.

Si nous supposons que $\Gamma_{NR} = 0$ sur le verre et que $\Gamma_{1,\Omega}^R = \Gamma_{2,\Omega}^R = \Gamma_{3,\Omega}^R = \Omega/4\pi\Gamma_{ref}$, nous pouvons écrire la formule d'intensité de fluorescence (équation IV.9) sous la forme :

$$I_{total}^{ref} = \frac{A\sigma_{abs}}{B}C3\left(\frac{\Omega}{4\pi}\right)^2\Gamma^{ref}$$
(IV.12)

Le préfacteur est déterminé en mesurant l'intensité et le taux de desexcitation. En prenant l'indice de réfraction de la silice dans le visible 1.46 et l'ouverture numérique 1.4, l'angle solide calculé est 1.43π .

Cas normal : bille proche de l'antenne.

Dans ce cas, nous ne pouvons pas négliger les modes non-radiatifs et l'intensité de fluorescence est donnée par l'équation IV.9. En injectant l'équation IV.12 dans l'équation IV.9, nous obtenons donc :

$$I_{total} = \frac{\left[\left(\Gamma_{1,\Omega}^{R} \right)^{2} + \left(\Gamma_{2,\Omega}^{R} \right)^{2} + \left(\Gamma_{3,\Omega}^{R} \right)^{2} \right]}{\Gamma} \frac{I_{total}^{ref}}{3\Gamma^{ref}} (\frac{4\pi}{\Omega})^{2}$$
(IV.13)

En mesurant l'intensité de fluorescence et la durée de vie dans les deux cas, nous pouvons en déduire $\Gamma^R_{rms,\Omega}$.

Pour extraire les cartes de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif, nous prenons le premier point de la carte d'intensité de fluorescence et du taux de désexcitation pour calculer le préfacteur. Dans ce cas, les signaux du point de référence sont pris exactement dans les mêmes conditions que les signaux sur l'antenne, y compris en ce qui concerne la manière dont la bille est accrochée sur la pointe.

IV.3 Mesures statistiques

IV.3.1 Description des échantillons étudiés

Nous avons commencé notre étude par des films d'or semi-continus. Ces échantillons possèdent des caractéristiques particulières. Les plasmons de surface de ces films peuvent être localisés sur des dimensions transverses plus petites que la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} . Ces propriétés de localisation du champ électromagnétique apparaissent uniquement lorsque le film semi-continu est proche du seuil de percolation électrique.

En 2001, Stockman et al [5] ont réalisé des calculs numériques sur des films métalliques désordonnés. Les résultats numériques montrent que sur ces films, les modes du champ



Figure IV.4 – L'intensité du champ calculée sur un films semi-continus au seuil de percolation. Les modes du champ électrique sur les films métalliques semi-continus peuvent être localisés ou délocalisés, radiatifs (*luminous*) ou non-radiatifs (*dark*) [5].

électrique peuvent être localisés ou délocalisés, radiatifs (*luminous modes*) ou non-radiatifs (*dark modes*). La figure IV.4 est tirée de la référence [5]. Elle montre l'existence des modes radiatifs localisés et délocalisés, et des modes non-radiatifs localisés et délocalisés. Le caractère radiatif ou non-radiatif des modes est indépendant du caractère localisé ou délocalisé. Un mode localisé est constitué d'un petit nombre de point chaud et est insensible aux frontières du système. Un mode délocalisé est en revanche constitué d'un grand nombre de point chaud et est sensible à la taille du système. Quant aux modes radiatifs et non-radiatifs, la distinction se fait en caractérisant le couplage des modes de surface au champ lointain. Les modes non-radiatifs ne couplent pas avec le champ lointain, ils sont donc difficiles à exciter et à observer en champ lointain. Par contre, ils peuvent être excités et observés en utilisant des pointes de microscope à balayage en champ proche. En revanche, les modes radiatifs se couplent efficacement avec le champ lointain et ils peuvent être excités par l'illumination en champ lointain, et réciproquement être observés directement en champ lointain.

Des mesures de LDOS sur des films d'or semi-continus ont été réalisées au sein de l'équipe en 2010 [6]. L'expérience a consisté à déposer à la tournette des émetteurs fluorescents de 25 nm de diamètre sur les films d'or semi-continus de différentes épaisseurs et ensuite à effectuer des mesures de durée de vie d'un grand nombre d'émetteurs dont la statistique est étudiée, ce qui permet d'accéder aux fluctuations statistiques de la LDOS. Ces études ont permis d'extraire de l'information sur le niveau de localisation des modes électromagnétiques à la surface des films d'or semi-continus en fonction de la fraction surfacique d'or (contrôlée par l'épaisseur massique d'or déposée, voir figure IV.5). Les films métalliques semi-continus sont connus pour présenter un caractère fractal au voisinage du seuil de percolation. Dans l'expérience, la surface totale des amas fractales et la surface totale des amas euclidiennes sont calculées à l'aide des images TEM des films d'or. La



Figure IV.5 – (a) Variance normalisée de la distribution des taux de désexcitation en fonction de la fraction surfacique. (b) Rapport des surfaces fractales et des surfaces euclidiennes en fonction de la fraction surfacique d'or [6].

figure IV.5(b) montre le rapport des surfaces fractales et des surfaces euclidiennes en fonction de la fraction surfacique d'or. Quand la fraction surfacique d'or atteint environ 80%, le rapport des surfaces fractales et des surfaces euclidiennes est le plus élevé. La figure IV.5(a) montre que les fluctuations spatiales de LDOS présentent alors un maximum, ce qui est interprété comme la signature de la présence des modes plamoniques localisés sur les films dans ce régime.

Avec le montage expérimental existant avant ma thèse, nous pouvions donc déterminer uniquement la distribution statistique de la LDOS sur les films d'or semi-continus. A l'aide du système de mesure rigoureusement confocal que nous avons mis en place, nous avons tenté de compléter l'étude par des mesures statistiques de l'intensité de fluorescence et du taux d'émission spontanée afin de différencier expérimentalement les modes radiatifs et les modes non-radiatifs en utilisant la théorie présentée précédemment (section IV.2).

IV.3.2 Problèmes rencontrés

Les expériences visant à la mesure des distributions statistiques des taux de désexcitation radiatif et non-radiatif consistaient à déposer à la tournette les émetteurs fluorescents sur les films d'or semi-continus et à réaliser des mesures de l'intensité de fluorescence et de durée de vie dans une géométrie rigoureusement confocale. Pour avoir une meilleur résolution latérale, nous avons utilisé des émetteurs de diamètre 20 nm. Cependant, lorsque nous avons mené l'étude statistique, nous avons rencontré plusieurs difficultés.

Pour que l'étude statistique soit pertinente, il est indispensable que la variance de la distribution de l'intensité de fluorescence des billes sur une lamelle de verre homogène soit aussi faible que possible. Cette distribution de référence définit en effet la barre d'erreur des résultats finaux obtenus sur les films métalliques semi-continus. Pour les trois types d'émetteurs fluorescents que nous avons testés, des billes de Polystyrène de chez Invitrogene (Dark Red Fluorescent (660/680) et Red Fluosphere (580/605)) ou de chez Duke, nous avons malheureusement mesuré que l'intensité de fluorescence pouvait varier d'un facteur deux d'une bille à l'autre. La figure IV.6(a) présente la distribution de l'intensité de fluorescence pour les billes Dark Red. Pour établir cet histogramme, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence d'environ 100 billes différentes déposées sur un substrat de verre. Nous pouvons observer des fluctuations de l'ordre de 40%. Par ailleurs, nous avons constaté que l'intensité de ces billes fluctue au fil du temps. La figure IV.6(b) illustre ce phénomène de fluctuation d'intensité d'une bille Dark Red sur verre en fonction du temps. Dans les deux premières minutes, la fluctation est relativement faible, mais à partir de deux minutes, les fluctuations augmentenet, alors que l'intensité moyenne de la bille diminue progressivement, suggérant qu'elle commence à photoblanchir. Un tel comportement est naturellement incompatible avec l'objectif visé.

Au delà des difficultés expérimentales rencontrées pour choisir un émetteur approprié, les simulations réalisées au sein de l'équipe nous ont montré également que l'étude statistique sur les films d'or ne peut pas fonctionner. Dans la section IV.2.2, nous avons en effet discuté des conditions d'applicabilité du théorème de réciprocité sur les expériences. Un des critères important est que la réponse spectrale de l'échantillon soit plus large que le décalage de Stokes de l'émetteur. Ceci signifie que le facteur d'exaltation, qui est défini comme la modification du champ incident produite par l'échantillon, doit être la même à la longueur d'excitation λ_{exc} et à la longueur d'émission λ_{fluo} de l'émetteur. Pour vérifier si c'est le cas sur les films d'or semi-continus, nous avons calculé les cartes d'exaltations sur un film d'or semi-continu à deux longueurs d'ondes qui correspondent à λ_{exc} et λ_{fluo} de l'émetteur dans l'expérience.

La figure IV.7 montre les résultats numériques sur un film d'or semi-continu au voisinage du seuil de percolation. Dans les figures IV.7(a,b), nous avons la carte d'exaltation d'intensité pour l'émission (670 nm) et l'excitation (650 nm) sur le film d'or présenté sur la figure IV.7(c). Le facteur d'exaltation K est défini comme $K^2 = |\mathbf{E}(r)|^2 / |\mathbf{E}(0)|^2$ où $\mathbf{E}(r)$ désigne le champ modifié en présence de la structure et $\mathbf{E}(0)$ le champ incident. Les zones brillantes dans les cartes présentent une forte exaltation du champ. Nous observons que les zones fortement exaltées ne coïncident pas dans les deux cartes. En d'autres termes, la modification d'intensité induite par le film d'or semi-continu est différente à $\lambda_{fluo} = 670$ nm et $\lambda_{exc} = 650$ nm. Cette différence influence directement l'applicabilité du théorème de réciprocité qui n'est valable que quand $K_{fluo}^2 = K_{exc}^2$. La différence entre les deux



Figure IV.6 – (a) La distribution de l'intensité de fluorescence pour les billes Dark Red spin-coatées sur un substrat de silice. (b) La fluctuation d'intensité d'une bille Dark Red sur un substrat de verre en fonction du temps.



Figure IV.7 – (a,b) Cartes d'exaltations d'intensité pour l'émission (670 nm) et l'excitation (650 nm). (c) Topographie de l'échantillon simulé. (d)Différence relative entre les deux cartes exprimée en pourcents.

cartes d'exaltation induit des erreurs dans l'équation IV.4 quand nous relions l'intensité d'excitation avec l'intensité de fluorescence. La différence relative entre les deux cartes d'exaltation d'intensité $\left|\frac{K_{exc}^2 - K_{fluo}^2}{K_{exc}^2}\right|$ a été calculée et est présentée (Fig IV.7(d)). L'erreur maximale dans les images calculées dans cette configuration est de 60%, et l'erreur moyenne de 10.5%. Par conséquent, si nous appliquions le théorème de réciprocité sur des mesures prises sur les films d'or semi-continus tout en considérant que $K_{fluo}^2 = K_{exc}^2$, l'erreur maximale commise serait de l'ordre de 60%. En résumé, l'erreur liée aux fluctuations d'intensités des billes mesurées sur un substrat homogène (Fig IV.6), combinée avec celle qui résulte des différences d'exaltations locales du champ entre la longueur d'excitation et de fluorescence s'est avérée trop importante pour envisager la réalisation d'une étude statistique suffisamment fiable visant à determiner les fluctuations des parties radiatives et non-radiatives de la LDOS.

IV.4 Mesures AFM

IV.4.1 Echantillons étudiés et source fluorescente

Compte tenu des limites empêchant la réalisation d'une étude statistique évoquée ci-dessus, nous avons décidé de réaliser plutôt l'expérience avec notre système AFM en accrochant un émetteur fluorescent unique au bout de la pointe. Ceci présente l'avantage de permettre d'utiliser le même nano-émetteur au cours de la mesure et évite ainsi tout problème lié à la mauvaise statistique de leurs propriétés de fluorescence. Nous avons décidé aussi d'étudier des échantillons de nano-antennes métalliques et ceci pour plusieurs raisons. Premièrement, les échantillons d'antennes présentent une réponse assez large bande comparée au décalage de Stokes de molécules. La différence entre le facteur d'exaltation à la longueur d'onde d'excitation et d'émission est très petite comme nous l'avons vu dans la section IV.2.2, ce qui autorise l'utilisation du théorème de réciprocité. Deuxièmement, ce sont des systèmes déterministes. Les zones présentant une augmentation de LDOS sont très bien définies et calculables numériquement. Ceci constitue un avantage pour la réalisation d'une première expérience visant à trouver les zones où il y a une augmentation de LDOS, comparativement aux films d'or semi-continus où la position des points chauds est difficile à prédire.

Pour le choix de la source fluorescente, nous sommes exactement dans la même situation que dans le chapitre III. Nous utilisons les billes de polystyrène remplies de molécules fluorescentes de diamètre 100 nm.

IV.4.2 Résultats

Nous présentons dans cette partie les résultats que nous avons obtenus sur deux nano-structures différentes, qui ont été fabriquées au LPN par lithographie électronique sur une lamelle de verre : un disque unique en or de diamètre 130 nm et d'épaisseur 30 nm, et une chaîne linéaire de trois disques d'or séparés de 20 nm.

Les figures IV.8(a,b) présentent la carte d'intensité et la carte de taux de désexcitation mesurées sur un disque en or. La carte de l'intensité de fluorescence est corrigée pour une



Figure IV.8 – (a) Carte de l'intensité de fluorescence sur un disque en or. (b) Carte de taux de désexcitation pour le même disque d'or. Encarts : cartes calculées numériquement. La carte de taux de désexcitation est normalisée par sa valeur dans le vide. (c) Trajet suivi par la sonde fluorescente pendant le scan (pas à l'échelle). (d) Coupe transversale de la carte de taux de désexcitation indiquée par la ligne blanche pointillée dans (b).

dérive latérale lente et progressive de la sonde fluorescente par rapport au faisceau laser d'excitation (de l'ordre de 3 nm par minute), ce qui engendre une diminution progressive de l'intensité de fluorescence dans la carte d'intensité. Nous avons donc commencé l'analyse des données par une soustraction d'un fond dégradé qui correspond à la dérive de la sonde fluorescente. Ensuite, un offset qui correspond à la valeur moyenne du fond est ajouté sur le résultat de la soustraction.

Les simulations sur un disque d'or sont effectuées avec la méthode que nous avons détaillée dans la section III.3.1. Sur la figure IV.8, les cartes de simulation présentées dans les encarts confirment la validité des résultats expérimentaux. Nous pouvons observer une diminution du nombre de coups détectés, et donc de l'intensité, en correspondance du disque due à l'absorption dans la matière à la fois dans la carte simulée et la carte mesurée. Dans les cartes de LDOS, une diminution en correspondance de la structure métallique est aussi présente dans les cartes simulées et mesurées. Le contraste dans les cartes simulées est plus élevé que dans les cartes mesurées en raison de l'absence de substrat dans les simulations puisque la LDOS est plus petite dans le vide qu'à la surface du verre.

Dans la carte de LDOS expérimentale, nous pouvons observer qu'il y a une zone à droite où le taux de désexcitation est plus petit que sur le verre, et une zone à gauche où il y a une augmentation du taux de désexcitation. Ceci est lié à la position de la bille fluorescente sur la pointe AFM. Nous pouvons imaginer que la bille fluorescente est collée à droite de la pointe AFM, un peu plus haut que l'apex comme schématisé sur la figure IV.8(c). La figure IV.8(d) montre le profil du taux de désexcitation le long de

la ligne blanche pointillée. Tout au début du balayage (zone A dans Fig IV.8(c,d)), la pointe AFM et la bille fluorescente sont à une hauteur donnée du substrat. En déplaçant la pointe AFM, la bille fluorescente approche la structure métallique (zone B), et la LDOS augmente lentement. Ensuite, l'ensemble se déplace au dessus du disque (zone C) et la bille sonde une augmentation de LDOS. Arrivée au bord de la structure (zone D), la pointe AFM reste sur le disque mais la bille est à une distance plus élevée de la surface du substrat de verre, la LDOS ressentie par la bille est plus petite que celle dans la zone A. A la fin du balayage, la pointe et la bille descendent toutes les deux sur le substrat de verre (zone E), la bille sonde la LDOS comme dans le cas initial.



Figure IV.9 – (a,b) Cartes de taux de désexcitation radiatif effectif $\Gamma^R_{rms,\Omega}$ et non-radiatif apparent $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}$ mesurées sur une disque d'or. (c,d) cartes de taux de désexcitation radiatif effectif et non-radiatif effectif normalisées par le taux de désexcitation total.

Pour extraire les cartes de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif, nous avons appliqué le traitement que nous avons présenté dans la section IV.2.2. La carte de taux de désexcitation radiatif effectif est montrée sur la figure IV.9 (a). La carte de taux de désexcitation non-radiatif apparent, définit comme $\Gamma_{rms,\Omega}^{NR} = \Gamma - \Gamma_{rms,\Omega}^{R}$, est présentée sur la Figure IV.9 (b). Il est important de rappeler que dans la carte de taux de désexcitation non-radiatif apparent, nous comptons les pertes dans l'environnement dues à l'absorption, et aussi les pertes dues au rayonnement en dehors de l'angle solide de détection. Une mesure réalisée sur tout l'angle solide 4π pallierait cette limite et donnerait accès au taux de désexcitation non-radiatif réel.

Pour avoir une vision directe de la proportion de photons détectés en champ lointain et de la proportion de photons non détectés, nous avons normalisé les cartes de taux de désexcitation radiatif effectif et non-radiatif apparent par la carte de taux de désexcitation total mesurée. Les cartes normalisées sont présentées sur la Figure IV.9(c,d). Tout l'intérêt de notre approche réside dans le fait que pour caractériser une nano-stucture en utilisant un émetteur fluorescent, la grandeur physique qui nous intéresse le plus est la proportion de photons rayonnés dans l'angle solide de détection, ce qui correspond à la carte de taux de désexcitation radiatif effectif normalisée.

Il s'agit de la quantité à optimiser lorsqu'une nano-antenne optique est conçue en vue d'être combinée avec un dispositif expérimental de mesure optique de fluorescence donné. Les cartes de taux de désexcitation radiatif effectif et non-radiatif apparent sur une chaîne linéaire de trois disques sont présentées sur la figure IV.10(c,d). Cette antenne optique est formée de trois disques d'or de diamètre 130 nm, séparés de 20 nm.



Figure IV.10 – (a) Carte de l'intensité de fluorescence, (b) carte de taux de désexcitation, (c) carte de taux de désexcitation radiatif effectif normalisée $\Gamma^R_{rms,\Omega}/\Gamma$ et (d) carte de taux de désexcitation non-radiatif apparent normalisée $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}/\Gamma$ sur une chaîne linéaire de trois nano-disques en or. Encart : Image MEB de l'échantillon, barre d'échelle : 200 nm.

Cette expérience est réalisée avec la même bille fluorescente que sur le disque unique. Comme prévu, l'intensité de fluorescence diminue quand la bille fluorescente se trouve au dessus de la nano-structure. Dans la carte de LDOS, nous observons la même asymétrie que dans la carte de LDOS du disque unique puisque nous utilisons la même sonde fluorescente. Dans la zone à droite de la nano-antenne, la LDOS est plus petite. Ceci peut être expliqué par le même argument que dans le cas d'un disque unique. Comme dans le cas d'un disque unique, le taux de désexcitation non-radiatif est plus grand que le taux de désexcitation radiatif d'un facteur 2 environ. Ces résultats illustrent le caractère très général de notre méthode et démontrent qu'elle peut être appliquée sur des systèmes plus complexes.

IV.5 Comparaison avec les simulations

Dans la section IV.2.2, pour appliquer le théorème de réciprocité à l'analyse des données, nous avons fait des hypothèses et des approximations. Des simulations numériques ont été réalisées au sein de l'équipe par Alexandre Cazé et Romain Pierrat en utilisant la méthode décrite dans la section III.3.1 afin de valider ces hypothèses et approximations et de confronter nos résultats expérimentaux avec les simulations.

Pour pouvoir comparer directement les simulations et les expériences, nous présentons sur la figure IV.11 les cartes de taux de désexcitation radiatif effectif et non-radiatif apparent mesurées et simulées sur le disque unique. Les cartes sont normalisées par les cartes de taux de désexcitation total mesurées ou simulées, respectivement.

IV.5.1 Comparaison avec les cartes effectives

Dans un premier temps, nous avons calculé les taux de désexcitation radiatif effectif $\Gamma^R_{rms,\Omega}$ et non-radiatif apparent $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}$ en utilisant la formule IV.10. Les cartes simulées, normalisées par la carte de taux de désexcitation total simulée, sont présentées dans les figures IV.11(c,d). Dans les cartes de taux de désexcitation radiatif effectif mesurée et simulée, nous observons une diminution de taux de désexcitation radiatif en correspondance de la structure métallique en raison de l'absorption dans la matière. Les simulations et les expériences sont en très bon accord quantitatif. Ceci démontre que les hypothèses que nous avons faites pour extraire la carte de taux de désexcitation radiatif effectif sont pertinentes.

IV.5.2 Comparaison avec les cartes réelles

Etant donné que le taux de désexcitation radiatif effectif est une moyenne quadratique sur les trois directions, nous avons voulu vérifier sa pertinence en comparant cette quantité avec les simulations du taux de désexcitation radiatif moyenné sur les trois directions et intégré sur l'angle solide de détection :

$$\Gamma^{R}_{moyen,\Omega} = \frac{\Gamma^{R}_{1,\Omega} + \Gamma^{R}_{2,\Omega} + \Gamma^{R}_{3,\Omega}}{3}$$
(IV.14)

La carte de taux de désexcitation non-radiatif est définie comme la différence entre le taux de désexcitation total et le taux de désexcitation radiatif moyen. Les figures IV.11(e,f) montrent les cartes de taux de désexcitation radiatif moyen et non-radiatif apparent moyen en simulation. Les cartes sont normalisées par la carte de taux de désexcitation total calculée.



Figure IV.11 – (a,b) Cartes de taux de désexcitation radiatif effectif $\Gamma^R_{rms,\Omega}$ et non-radiatif apparent $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}$ mesurées sur un disque d'or, normalisées par la carte de taux de désexcitation total mesurée. Encart : Image MEB de l'échantillon, barre d'échelle : 200 nm. (c,d) Cartes de taux de désexcitation radiatif effectif $\Gamma^R_{rms,\Omega}$ et non-radiatif apparent $\Gamma^{NR}_{rms,\Omega}$ numériques normalisées par la carte de taux de désexcitation total calculée. (e,f) Cartes de taux de désexcitation radiatif moyen $\Gamma^R_{moy,\Omega}$ et non-radiatif moyen $\Gamma^{NR}_{moy,\Omega}$ calculées numériquement normalisées par la carte de taux de désexcitation total calculée.

Les cartes expérimentales et les cartes simulées restent en très bon accord, ce qui montre que les cartes effectives que nous déduisons de l'expérience constituent une très bonne estimation des vraies cartes de taux de désexctation radiatif et non-radiatif.

IV.6 Conclusions et perspectives

En conclusion, dans ce chapitre, nous avons présenté la méthode expérimentale qui nous permet de mesurer les cartes de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif apparent, en appliquant le théorème de réciprocité. Ceci est très important pour caractériser les échantillons nano-structurés. Le point crucial dans cette expérience est la mesure simultanée de la carte d'intensité de fluorescence et de la carte de taux de désexcitation dans une géométrie rigoureusement confocale, qui nous permet d'appliquer le théorème réciprocité. Dans le cas d'un disque d'or unique, les expériences et les simulations numériques sont en accord quantitatif, ce qui montre la pertinence de notre méthode qui a le mérite d'être basée sur un modèle analytique. La méthode peut être appliquée à des systèmes plus complexes. Nous avons montré les cartes de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif effectifs réalisées sur une chaîne de disques. La méthode est très générale et peut être appliqué sur d'autres systèmes métalliques ou diélectriques.

Chapitre V

Introduction au transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

Table des matières

V.1 Intro	oduction	80
V.1.1	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes	80
V.1.2	Conditions du transfert d'énergie	81
	Distance entre donneur et accepteur très courte	81
	Recouvrement spectral	83
	Orientation relative des deux dipôles	84
V.1.3	Signatures du FRET	85
	Signature en intensité	85
	Signature en temps de vie	86
V.2 Effet	de l'environnement sur le FRET	87
V.2.1	Etat de l'art	87
V.2.2	Plasmon de surface	89
	Relation de dispersion	90
	Longueur de propagation et de pénétration	91
V.2.3	FRET à longue portée engendré par le plasmon de surface	93
V.3 Conclusion		

V.1 Introduction

Dans les chapitres précédents nous avons étudié l'émission de fluorescence d'un émetteur dans son environnement. Il est connu que les propriétés de fluorescence de cet émetteur sont influencées par la LDOS de l'environnement. Nous en avons donné une démonstration expérimentale dans le chapitre III. Ensuite, nous avons monté que le taux de désexcitation de l'émetteur, combiné à l'intensité de fluorescence, permet de peaufiner la caractérisation l'interaction entre un émetteur fluorescent avec son environnement par la mesure séparée de la LDOS radiative et non-radiative.

Dans les deux chapitres suivants, nous nous intéresserons à l'influence de l'environnement sur l'interaction entre deux émetteurs fluorescents qui échangent de l'énergie nonradiativement. Pour ce faire, nous allons d'abord décrire le mécanisme de transfert d'énergie non-radiatif entre deux émetteurs et les paramètres qui le pilotent (chapitre V), puis le montage expérimental que nous avons développé pour étudier l'influence de l'environnement sur cette interaction et les résultats que nous avons obtenus (chapitre VI).

L'objectif de ce chapitre est d'introduire les concepts utiles à la description du transfert d'énergie non-radiatif à courte portée entre molécules fluorescentes (FRET, *Förster resonance energy transfer*) et les motivations de l'expérience que nous avons réalisée.

Dans un premier temps, nous introduirons les paramètres qui pilotent le FRET ainsi que ses principales applications. L'efficacité du FRET, le rayon de Förster, le taux de FRET et le facteur d'orientation seront présentés pour permettre une meilleur compréhension du FRET. En suite, nous présenterons quelques techniques utilisées pour mettre en évidence le FRET.

Enfin, nous étudierons l'influence de l'environnement sur le transfert FRET. Les articles sur ce sujet sont contradictoires. Certains articles démontrent que le taux du FRET dépend linéairement ou quadratiquement de la LDOS, ou en est indépendant. Nous proposons donc une nouvelle expérience afin d'apporter notre point de vue sur la façon dont le taux de transfert FRET dépend de la LDOS.

V.1.1 Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

Le transfert d'énergie résonant de type FRET, a été décrit pour la première fois par Förster en 1946 [83]. Il s'agit d'un processus de transfert d'énergie par interaction dipôle-dipôle entre deux molécules fluorescentes appelées donneur (D) et accepteur (A). Le donneur est excité par un laser, la longueur d'onde du laser est choisie de telle sorte qu'elle soit résonnante avec le spectre d'absorption du donner mais pas avec celui de l'accepteur. De par ce fait, la probabilité d'excitation directe de l'accepteur par le laser est fortement réduite. Le donneur peut ensuite se désexciter par fluorescence vers le champ lointain ou transférer son énergie non-radiativement à l'accepteur. Ce dernier passe dans l'état excité et se désexcite ensuite par fluorescence. Nous allons donc observer de la fluorescence émise par l'accepteur suite à l'excitation du donneur. C'est le mécanisme dominant de transfert d'énergie entre des émetteurs à distance nanométrique. Il joue un rôle essentiel dans le processus de photosynthèse des plantes et des bactéries [84]. En raison de la sensibilité à la distance entre le donneur et l'accepteur, le FRET a été utilisé pour étudier les interactions moléculaires et il est utilisé de plus en plus dans la recherche biomédicale et pharmaceutique. Il existe de nombreuses revues sur le FRET, qui portent sur ses applications dans différents domaines [85, 86, 87, 88], ou sur les méthodes expérimentales liées au FRET [89, 90], et le choix du couple donneur et accepteur [91, 92]. De nombreuses applications peuvent utiliser le FRET, allant du photovoltaïque [84, 93, 94] et l'éclairage [95, 96], à la détection dans le domaine de la bio-physique où les distances moléculaires et les interactions sont sondées [97, 98].

Pour une meilleure compréhension de ce transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, nous allons présenter les conditions nécessaires pour que ce transfert ait lieu et les méthodes pour mettre en évidence le FRET.

V.1.2 Conditions du transfert d'énergie

Dans cette partie, nous allons discuter des conditions nécessaires au transfert d'énergie entre molécules fluorescentes : une distance entre donneur et accepteur très courte, un recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur et également une orientation relative des deux dipôles favorable.

Distance entre donneur et accepteur très courte

Formalisons les deux molécules fluorescentes, D et A, comme deux dipôles de moments dipolaires $\boldsymbol{\mu}_D = \boldsymbol{\mu}_D \mathbf{u}_D$ et $\boldsymbol{\mu}_A = \boldsymbol{\mu}_A \mathbf{u}_A$ avec \mathbf{u}_D et \mathbf{u}_A vecteurs unitaires qui se trouvent dans un environnement quelconque (voir la figure V.1). Si le donneur est dans l'état excité, par exemple après avoir interagi avec un laser, la probabilité que celui-ci transfère son énergie à l'accepteur par un processus non-radiatif dépend de la distance r entre les deux fluorophores comme $1/r^6$. Dans la suite de cette section nous allons expliquer l'origine de cette dépendance en distance.

Notons Γ_D le taux de désexcitation du donneur dans l'environnement en absence de l'accepteur. La présence de l'accepteur ouvre des nouveaux canaux pour la désexcitation du donneur qui sont incohérents avec tous les autres canaux existants. Le taux de désexcitation du donneur est donc modifié en présence de l'accepteur et s'écrit :

$$\Gamma_{DA} = \Gamma_D + \Gamma_{FRET} \tag{V.1}$$

où Γ_{FRET} est le taux de transfert FRET. Le transfert FRET est en compétition avec d'autres processus de désexcitation du donneur qui sont décrits par Γ_D . L'efficacité du transfert FRET, notée η_{FRET} , est définie comme le rapport entre la probabilité que le



Figure V.1 – Quand la distance entre le donneur et l'accepteur est très courte, la désexcitation du donneur est composée de Γ_D et Γ_{FRET} .

donneur se désexcite par FRET et la probabilité totale de désexcitation du donneur en présence de l'accepteur Γ_{DA} :

$$\eta_{FRET} = \frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_D + \Gamma_{FRET}} \tag{V.2}$$

 Γ_{FRET} peut être calculé en utilisant le lien avec la puissance émise que nous avons vu dans le chapitre I (équation I.16) :

$$\frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_D} = \frac{P_{DA}}{P_D} \tag{V.3}$$

où P_{DA} est la puissance émise par le donneur et absorbée par l'accepteur et P_D la puissance émise par le donneur en absence de l'accepteur.

Les détails du calcul sont explicités dans la référence [20]. Ici nous rappelons les résultats plus importants. Le taux de transfert FRET normalisé par Γ_D s'écrit :

$$\frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_D} = \frac{9c^4}{8\pi r^6} \int_0^\infty \frac{f_D(\omega)\sigma_A(\omega)}{n^4(\omega)\omega^4} T(\omega)d\omega \tag{V.4}$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide et $\sigma_A(\omega)$ la section efficace d'absorption de l'accepteur. $f_D(\omega)$ est le spectre d'émission du donneur normalisé dans un milieu avec indice de réfraction $n(\omega)$ et vérifie $\int_0^\infty f_D(\omega)d\omega = 1$. $T(\omega)$ contient la dépendance à l'environnement et est défini comme suit :

$$T(\omega) = 16\pi^2 k^4 r^6 \left| \mathbf{u}_A \cdot \mathbf{G}(\mathbf{r}_D, \mathbf{r}_A) \mathbf{u}_D \right|^2 \tag{V.5}$$

où $k = \omega n/c$ et $\mathbf{G}(\mathbf{r}_D, \mathbf{r}_A)$ est la fonction de Green qui décrit la réponse électromagnétique de l'environnement. En utilisant la fonction de Green du vide et en se limitant au terme quasi statique en r^{-3} , le rapport Γ_{FRET}/Γ_D s'écrit :

$$\frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_D} = \left[\frac{R_0}{r}\right]^6 \tag{V.6}$$

où

$$R_0^6 = \frac{9c^4\kappa^2}{8\pi} \int_0^\infty \frac{f_D(\omega)\sigma_A(\omega)}{n^4(\omega)\omega^4} d\omega$$
(V.7)

est appelé rayon de Förster. κ^2 prend en compte l'orientation relative des deux dipôles et joue un rôle important sur l'efficacité du FRET comme on le verra en détail dans la suite.

Le rayon de Förster est généralement compris entre 1 et 10 nm et dépend des fluorophores utilisés. Il est à noter que le rayon de Förster ne dépend pas que de la nature des fluorophores et des orientations des dipôles, mais aussi de l'environnement.

L'efficacité du FRET peut aussi être écrite en fonction de la distance r:

$$\eta_{FRET} = \frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_D + \Gamma_{FRET}} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \tag{V.8}$$

La figure V.2 montre l'évolution de l'efficacité du FRET en fonction de la distance r. η_{FRET} est très sensible pour r compris dans la zone $0, 5R_0 - 2R_0$. Pour une distance plus grande que $2R_0$ entre le donneur et l'accepteur, la probabilité que le donneur se désexcite par transfert d'énergie non radiatif vers l'accepteur est presque nulle.



Figure V.2 – Efficacité du FRET en fonction de la distance r [7].

Recouvrement spectral

Pour que le transfert d'énergie de type FRET ait lieu, l'énergie de fluorescence de D doit correspondre à l'énergie d'absorption de A. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (Fig. V.3). L'influence du recouvrement spectral sur le transfert FRET est présente dans les équations V.4 et V.7 dans le terme $\int_0^\infty \frac{f_D(\omega)\sigma_A(\omega)}{n^4(\omega)\omega^4}d\omega$.



Figure V.3 – Recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur. Ce recouvrement est défini par une intégrale de recouvrement qui est directement proportionnelle à l'efficacité du FRET.

Orientation relative des deux dipôles

Comme nous l'avons vu dans la section précédente (équation V.7), l'orientation relative entre les moments dipolaires de D et A joue un rôle important dans l'expérience du taux de Γ_{FRET} . Le facteur d'orientation κ , mentionné dans l'équation V.7, entre deux dipôles $\boldsymbol{\mu}_D = \mu_D \mathbf{u}_D$ et $\boldsymbol{\mu}_A = \mu_A \mathbf{u}_A$ s'écrit :

$$\kappa = \boldsymbol{u}_D \cdot \boldsymbol{u}_A - 3(\boldsymbol{u}_D \cdot \mathbf{u})(\boldsymbol{u}_A \cdot \mathbf{u}) \tag{V.9}$$

où **u** est le vecteur unitaire qui pointe du donneur vers l'accepteur. C'est une variable très importante pour le calcul du taux du FRET puisqu'il peut varier entre 0 et 4 selon les directions des deux dipôles et selon la nature des molécules fluorescentes utilisées dans les expériences de FRET (le nombre de dipôles dans les molécules et leurs orientations).

Nous pouvons discuter de la valeur de κ dans trois situations significatives [7]. Quand il s'agit de deux émetteurs avec des orientations fixes, κ^2 peut varier entre 0 et 4. Quand les deux dipôles sont orientés suivant l'axe défini par le donneur et l'accepteur, κ^2 est égale à 4. Si les deux directions sont orthogonales, le transfert d'énergie est nul puisque κ^2 est nul.

Quand il n'y a pas d'orientation fixe pour le donneur et l'accepteur pendant le temps où a lieu le transfert d'énergie FRET (de l'ordre de $\tau_{FRET} = 1/\Gamma_{FRET}$), nous moyennons les moments dipolaires sur les trois directions de l'espace et κ^2 est égale à 2/3.

Si l'un des deux émetteurs (donneur ou accepteur) possède une orientation moyennée (comme dans la situation précédente), et l'autre présente une direction fixée, κ^2 peut prendre des valeurs comprises entre 1/3 et 4/3.

Il est donc très important de tenir compte de l'orientation des moments dipolaires du donneur et de l'accepteur pour chaque expérience afin de maximiser le taux du transfert FRET.

V.1.3 Signatures du FRET

Pour mettre en évidence que le FRET a eu lieu, nous avons utilisé deux méthodes différentes pendant ma thèse : des mesures d'intensité utilisant un spectromètre et des mesures de temps de vie du donneur et de l'accepteur avec un photo-détecteur à avalanche.

Signature en intensité

Les mesures d'intensité consistent à quantifier les variations de l'intensité de fluorescence en mesurant la diminution de l'intensité de fluorescence du donneur, l'augmentation de celle de l'accepteur ou en calculant le rapport des intensités de fluorescence de l'accepteur et du donneur. Pour cela il est pratique d'utiliser un spectromètre. Premièrement, l'expérience effectuée est la suivante : le donneur est excité par un laser. A cause du décalage spectral entre le donneur et l'accepteur, la probabilité que l'accepteur soit excité directement par le laser est très réduite. Le donneur peut ensuite se désexciter par fluorescence et transférer non-radiativement son énergie à l'accepteur. Dans ce dernier cas, l'accepteur passe dans l'état excité et se désexcite ensuite par émission fluorescente. La figure V.4 montre la mise en évidence du transfert FRET en utilisant un spectromètre.



Figure V.4 – Principe des mesures du FRET par mesure d'intensité en utilisant un spectromètre. (a) En l'absence de FRET. (b) En présence de FRET.

En l'absence de FRET (figure V.4(a)), le spectre d'émission que nous obtenons est la somme du spectre d'émission du donneur et du spectre d'émission de l'accepteur obtenus par excitation directe du laser. L'émission de l'accepteur est souvent plus faible que celle du donneur dans cette situation puisque la longueur d'onde du laser d'excitation est choisie pour que la probabilité d'exciter le donneur soit grande, tandis que celle d'exciter l'accepteur soit petite.

En présence du FRET (figure V.4(b)), le spectre d'émission est modifié. Le FRET fait augmenter le nombre d'accepteurs qui sont dans l'état excité et donc par conséquence augmente le signal de fluorescence des accepteurs au détriment du signal de fluorescence du donneur. Nous pouvons donc observer une diminution de l'intensité d'émission du donneur et une augmentation de l'émission de l'accepteur.

L'avantage de cette mesure spectroscopique est que nous pouvons accéder simultanément aux signaux du donneur et de l'accepteur présents sur le même échantillon. L'intensité de fluorescence du donneur sans l'accepteur I_D , l'intensité de fluorescence de l'accepteur sans donneur I_A et l'intensité de fluorescence de l'accepteur en présence du donneur I_{AD} (qui est l'intensité du signal FRET) peuvent être déduites à partir des spectres enregistrés.

Définition de l'efficacité du FRET en intensité Une mesure de l'efficacité du FRET peut être donnée par le rapport entre l'intensité de fluorescence de l'accepteur en présence du donneur (I_{AD}) et sans donneur (I_A) . A noter que cette méthode demande de prendre en compte l'émission fluorescente des accepteurs à cause de l'excitation directe de l'accepteur par la lumière laser qui excite le donneur. Cette correction peut être effectuée en soustrayant la fluorescence directe I_A de I_{AD} et en prenant en compte l'absorptivité du donneur et de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation. En multipliant le rapport d'intensité de fluorescence corrigé par le rapport des coefficients d'extinction (ou absorptivité) de l'accepteur et du donneur (ϵ_A et ϵ_D) à la longueur d'excitation de l'expérience FRET, l'efficacité du FRET s'écrit donc [7]

$$\eta_{FRET,I} = \left(\frac{I_{AD}}{I_A} - 1\right) \left(\frac{\epsilon_A}{\epsilon_D}\right) = \frac{I_{AD} - I_A}{I_D} \tag{V.10}$$

Pour écrire la deuxième partie de l'équation V.10, nous avons utilisé le fait que $I_{A,D} = \epsilon_{A,D}I_{laser}$ avec I_{laser} l'intensité de l'excitation. L'équation V.10 indique donc la probabilité que le donneur transfère son énergie à l'accepteur.

Cette technique exige la connaissance de ϵ_A et ϵ_D , et une mesure de I_A en l'absence du donneur. En plus, cette définition $\eta_{FRET,I}$ en fonction de l'intensité de fluorescence n'est pas aussi robuste que la définition en fonction du taux de désexcitation (équation V.2). Dans le cas où les accepteurs se désexcitent majoritairement dans des canaux de désexcitation non-radiatifs, I_{AD} peut être très petit, mais cela n'implique pas directement une faible efficacité du FRET. Calculer l'efficacité du FRET en fonction de l'intensité de fluorescence n'est donc pas adapté à tous les circonstances. La définition de l'efficacité du FRET en fonction du taux de désexcitation est plus appropriée.

Signature en temps de vie

La signature en temps de vie consiste à mesurer le changement du taux de décroissance du donneur et de l'accepteur à cause du FRET. Dans la plupart des cas, le taux de décroissance du donneur est utilisé pour analyser l'efficacité du FRET.

En présence de l'accepteur, des nouveaux canaux pour la désexcitation du donneur s'ouvrent, la probabilité que le donneur se désexcite dans un intervalle de temps Δt est plus grande et donc le temps de vie du donneur est plus petit. Sur les courbes de déclin de fluorescence en échelle logarithmique, nous pouvons donc observer une différence de pente (figure V.5). La mesure du déclin de fluorescence du donneur en absence et en présence de l'accepteur permet de révéler l'existence du FRET.

L'efficacité du FRET peut être calculée en utilisant les temps de vie du donneur en absence (τ_D) et en présence (τ_{DA}) de l'accepteur, puisque le temps de vie est l'inverse du taux de désexcitation.

$$\eta_{FRET} = \frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_D + \Gamma_{FRET}} = \frac{\Gamma_{DA} - \Gamma_D}{\Gamma_{DA}} = \frac{\tau_{DA}^{-1} - \tau_D^{-1}}{\tau_{DA}^{-1}}$$
(V.11)



Figure V.5 – Principe des mesures du FRET basée sur la mesure du temps de vie.

Le taux de désexcitation de l'accepteur Γ_{AD} , c'est à dire le taux de désexcitation de l'accepteur en présence du donneur, porte aussi une signature du FRET. En effet, si le FRET a eu lieu, l'excitation de l'accepteur se fait par l'intermédiaire du donneur. La mesure correcte du déclin de fluorescence de l'accepteur serait donc donnée par la mesure de l'intervalle de temps entre la désexcitation du donneur et la détection du signal de fluorescence de l'accepteur. Cette mesure n'est pas accessible et la carte d'acquisition mesure l'intervalle de temps entre l'impulsion laser qui excite le donneur et le signal de fluorescence de l'accepteur (voir section II.5.3). Le temps de vie de l'accepteur mesuré en présence du donneur sera donc systématiquement plus long que le temps de vie de l'accepteur seul.

Les mesures d'intensité du donneur et de l'accepteur résolues spectralement et les mesures de temps de vie du donneur et de l'accepteur sont toutes réalisables avec notre montage expérimental (détaillé dans le chapitre VI).

V.2 Effet de l'environnement sur le FRET

V.2.1 Etat de l'art

L'environnement peut jouer un rôle clé sur le FRET car il peut modifier le rayon de Förster, le taux du transfert FRET ou son efficacité. Des études ont été menées dans ce sens [99, 100, 101, 102, 103]. Cependant, le rôle de l'environnement n'est pas encore bien maîtrisé et les résultats présents dans la littérature sont souvent contradictoires. Dans cette section nous présentons une revue bibliographique du sujet.

Andrew et Barnes [104] ont réalisé une expérience montrant que le taux de transfert FRET Γ_{FRET} dépend linéairement de la LDOS. Les donneurs et les accepteurs, séparés d'une distance fixée entre 0 et 25 nm, sont placés dans trois micro-cavités optiques différentes. Le temps de vie du donneur seul et en présence de l'accepteur est mesuré pour chaque distance d entre le donneur et l'accepteur et dans chaque cavité. Les mesures de temps de vie du donneur montrent que le taux de transfert FRET Γ_{FRET} dépend linéairement du taux d'émission du donneur seul, qui est proportionnel à la LDOS ressentie par le donneur.
Dood et al. [105] ont effectué une autre expérience en utilisant des ions d'erbium (Er^{3+}) et des *quenchers* (des impuretés) dans les verres sodo-calcique. Le temps de vie des ions Er^{3+} est mesuré en fonction de la LDOS, qui est modifiée en variant l'indice de réfraction à l'extérieur du verre, et de la concentration des ions Er^{3+} dans le verre. Les résultats ont montré que le taux du FRET est indépendant de la LDOS, ce qui contredit la conclusion d'Andrew et Barnes [104].

Durant la même période, **Nakamura et al.** [106] ont montré que le taux de transfert FRET Γ_{FRET} est proportionnel au taux de désexcitation radiatif de l'environnement. Les donneurs (nanocristaux de silicium) et les accepteurs (Er^{3+}) sont mélangés ensemble et contenus dans une couche de silice de 150 nm d'épaisseur, sur laquelle un espaceur de silice d'épaisseur variable de 100 nm à 600 nm et un film d'or de 100 nm sont déposés. L'idée est de mesurer Γ_{FRET} à différentes distances de ce film d'or (différentes épaisseurs de l'espaceur). Les résultats montrent que l'oscillation de Γ_{FRET} en fonction de la distance au film d'or correspond à celle du taux de désexcitation radiatif du donneur seul dans le même contexte, ce qui conduit à la conclusion que Γ_{FRET} est proportionnel à Γ_{D}^{R} .

Un an après, dans la même équipe, et avec la même expérience, il a été montré que le taux de transfert FRET dépend non seulement de l'épaisseur de l'espaceur, mais aussi de la longueur d'onde d'excitation [107]. Un modèle théorique en accord avec les données suggère que le taux de transfert FRET est proportionnel au carré de la LDOS.

On peut se demander pourquoi les résultats sont contradictoires. Une réponse peut être trouvée en réfléchissant aux paramètres qui pilotent le FRET. Le taux du FRET dépend de la distance donneur-accepteur en $1/r^6$ et le facteur d'orientation peut varier de 0 à 4 selon les directions des dipôles, il est donc probable d'observer un taux du FRET différent dans le même environnement en changeant légèrement la distance ou les orientations des dipôles. Les raisons possibles de la disparité de ces observations peuvent être le manque de contrôle de la distance entre le donneur et l'accepteur et le couplage exact d'un donneur à un accepteur, ou le *cross talk* entre les couples FRET voisins. Dans la suite, nous présentons plusieurs études menées sur la relation entre le transfert FRET et la LDOS en utilisant des couples FRET précisément définis, isolés et efficaces afin de répondre à cette question.

Blum et al. [108] ont proposé une expérience sur la mesure de l'influence de la LDOS sur le FRET en contrôlant la distance entre le donneur et l'accepteur, le couplage exact et la distance avec les autres couples FRET. Le donneur (Atto488) et l'accepteur (Atto565) sont assemblés avec un brin d'ADN qui a une longueur précise de 6,8 nm. Les couples FRET ainsi assemblés sont ensuite déposés sur un miroir d'argent avec un espaceur de silice qui varie de 60 à 270 nm. Les mesures de temps de vie du donneur sont effectuées pour des différentes épaisseurs de silice en présence et en absence de l'accepteur. Les résultats montrent que l'efficacité du FRET varie quadratiquement avec la LDOS tandis que le taux du FRET est indépendant de la LDOS.

Rabouw et al. [109] ont montré que le taux du FRET est indépendant de la LDOS. Les donneurs (Ce^{3+}) et les accepteurs (Tb^{3+}) sont incorporés dans des nano-cristaux de LaPO₄. L'avantage des nano-cristaux est que la distance donneur-accepteur et leurs positions sont fixées après fabrication. L'inconvénient est que, d'un nano-cristal à l'autre, le nombre de donneurs et d'accepteurs, et leurs dispositions peuvent être différentes. Le changement de la LDOS ressentie par le couple FRET est effectué en changeant le solvant de la solution des nano-cristaux. Des mesures de temps de vie du donneur dans différents solvant montrent que le taux du FRET est indépendant de la LDOS. Par conséquent, l'efficacité du FRET est plus élevée quand la LDOS est plus petite.

Les conclusions semblent converger, mais une expérience mesurant le FRET entre deux molécules uniques réalisée par **Ghenuche et al.** [110] a démontré que le taux du FRET dépend linéairement de la LDOS pour différentes séparations entre le donneur et l'accepteur. La LDOS est contrôlée en utilisant des nano-ouvertures plasmoniques et les paires donneur-accepteur à base de molécules uniques sont connectés par un brain d'ADN pour avoir un très bon contrôle de la distance. L'expérience consiste à étudier le temps de vie du donneur et l'intensité de l'accepteur en fonction de la LDOS du donneur et de la distance donneur-accepteur. Les données en temps de vie et en intensité montrent que le taux du FRET dépend linéairement de la LDOS, tandis que l'efficacité du FRET en est indépendante.

Dans tous les articles présentés ci-dessus, l'étude de l'influence de la LDOS sur l'éfficacité du FRET est menée dans la situation où à la fois l'environnement du donneur et de l'accepteur changent, à cause de la petite distance qui sépare les deux molécules. L'excitation et l'émission du donneur et de l'accepteur, ainsi que le couplage entre le donneur et l'accepteur peuvent être modifiés en même temps.

L'augmentation du signal FRET (c'est à dire de l'intensité de fluorescence de l'accepteur en présence du donneur) peut être liée à trois facteurs : (1) une augmentation de la probabilité de désexcitation du donneur dans un canal non-radiatif; (2) un changement de la probabilité que le transfert ait lieu; (3) un changement de la probabilité d'émission de fluorescence de l'accepteur. Pour connaitre l'origine ce cette augmentation, une des possibilités est d'agir indépendamment sur la LDOS du donneur et de l'accepteur. Pour ce faire, une possibilité est de séparer le donneur et l'accepteur davantage, mais pour cela il faut augmenter la portée du transfert non-radiatif. Le plasmon de surface est un bon candidat pour atteindre cet objectif.

Des expériences qui consistent à augmenter le transfert FRET en utilisant un métal ont été réalisées en exploitant le plasmon localisé sur des nanoparticules métalliques d'or [99, 102, 111, 112], ou d'argent [100, 101, 103, 113], ou en utilisant le plasmon de surface délocalisé sur des films métallique continus [9]. La portée du FRET a été étendue à des distances d'environ 120 nm.

Notre objectif va être d'utiliser un plasmon de surface pour augmenter la portée du FRET à des distances de plusieurs μ m. Dans la suite de ce chapitre, nous allons d'abord introduire quelques concepts de base concernant les plasmons de surface et ensuite les motivations de cette expérience.

V.2.2 Plasmon de surface

Par définition, le plasmon de surface délocalisé (*surface plasmon polariton*, SPP) est un mode électromagnétique à l'interface entre un métal et un diélectrique résultant du couplage entre une onde électromagnétique polarisée et une oscillation collective des électrons de conduction à la surface d'un métal. Il se propage à l'interface entre un métal et un diélectrique, et il est évanescent suivant la direction normale à l'interface, de part et d'autre de celle-ci, c'est à dire à la fois du côté du métal et du diélectrique.

Relation de dispersion





Considérons une interface plane entre un diélectrique de permittivité ϵ_d réelle et un métal non magnétique de permittivité ϵ_m complexe comme présenté sur la figure V.6. L'espace est divisé en deux milieux semi-infinis.

Pour la géométrie considérée, nous cherchons des ondes, solutions des équations de Maxwell, qui se propagent parallèlement à l'interface et dont l'amplitude décroît exponentiellement avec la distance z à l'interface. Le champ électrique à la position \mathbf{r} pour une onde de pulsation ω dans chacun des deux milieux s'écrit (si x est la direction de propagation) :

$$\mathbf{E}_{d}(\mathbf{r},t) = \mathbf{E}_{d}e^{i(k_{spp}x-\omega t)}e^{-k_{d}z}$$
(V.12)

dans le diélectrique (z > 0) et

$$\mathbf{E}_m(\mathbf{r},t) = \mathbf{E}_m e^{i(k_{spp}x - \omega t)} e^{k_m z} \tag{V.13}$$

dans le métal (z < 0). k_m et k_d sont les vecteurs dans le métal et dans le diélectrique, respectivement. k_{spp} est le vecteur d'onde du plasmon de surface à l'interface du métal et du diélectrique.

En prenant en compte les conditions des milieux (milieux homogènes et non chargés) et les conditions au limites à l'interface, puis résolvant l'équation d'onde du champ électrique, nous pouvons obtenir la relation de dispersion [114] :

$$k_{spp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \tag{V.14}$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide. Nous utilisons le modèle de Drude pour exprimer la permittivité du métal, ce qui donne :

$$\epsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\gamma} \tag{V.15}$$



où ω_p est la pulsation plasma et γ le temps de relaxation des électrons du métal.

Figure V.7 – Relation de dispersion des SPP (en continu) et ligne de lumière (en pointillé). [8].

On représente sur la figure V.7 la relation de dispersion des SPP pour une interface métal (équation V.14, en continu), et de la lumière dans le vide (en pointillé). Sur la figure, nous pouvons observer que nous avons toujours $k_{spp} \ge k_0$. Par conséquent, il n'y a pas de croisement entre la ligne de la lumière et la relation de dispersion des SPP. Le plasmon de surface ne peut pas être alors excité par des ondes propagatives, mais seulement par des ondes avec un vecteur d'onde plus grand que ω/c .

Différentes méthodes ont été mises en oeuvre pour réaliser le couplage de la lumière aux modes SPP. Une première solution possible pour coupler une onde incidente aux modes de surface consiste à injecter l'onde incidente via un prisme. Deux configurations expérimentales ont été proposées par Kretschmann [115] et par Otto [116] en utilisant la réflexion totale interne de l'onde incidente. Une deuxième technique est l'utilisation d'un réseau de diffraction [117]. Le réseau permet de fournir le vecteur d'onde manquant pour passer de la ligne de lumière à la courbe de dispersion des SPP. Une troisième méthode consiste à utiliser des ouvertures de largeur inférieure à la longueur d'onde [118]. Une onde incidente illumine une ouverture sub-longueur d'onde et génère par diffraction des ondes évanescentes qui sont susceptibles de se coupler aux modes de surface. Une dernière technique consiste à utiliser des sources d'excitation de taille inférieure à la longueur d'onde en champ proche de l'échantillon [46, 119]. C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée pour exciter le plasmon de surface sur un film d'or continu. La source d'excitation sub-longueur d'onde utilisée dans notre expérience est une bille fluorescente de diamètre égal à 100 nm.

Longueur de propagation et de pénétration

Une fois que le plasmon de surface est généré à l'interface entre un métal et un diélectrique, il se propage le long de l'interface et va progressivement s'atténuer. La partie imaginaire de la permittivité du métal induit en effet des pertes lors de la propagation du plasmon de surface. La longueur de propagation L_{spp} du plasmon de surface le long de l'interface est définie comme la longueur d'atténuation de l'intensité du champ plamonique le long de l'interface sur laquelle la densité d'énergie décroit d'un facteur 1/e. Elle s'écrit donc :

$$L_{spp} = \frac{1}{2\mathrm{Im}(k_{spp})} \tag{V.16}$$

Nous pouvons alors déterminer la distance de propagation d'un plasmon de surface en fonction de la longueur d'onde. Dans l'or, à une longueurs d'onde de 600 nm, la longueur de propagation des SPP est d'environ 2 μ m à l'interface or/verre. Pour un métal moins absorbant à ces longueurs d'onde comme l'argent, qui a une partie imaginaire de k_{SPP} plus faible, la longueur de propagation est plus importante, atteignant une dizaine de microns à 600 nm. Notons que dans la pratique, la distance de propagation observée est plus petite à cause des pertes radiatives dues à la diffusion par des défauts et par la rugosité de la surface métallique.

Un autre paramètre très important est le confinement des SPP dans le métal et le diélectrique. Le caractère évanescent des modes SPP se traduit par la faible pénétration en z, liée aux termes $e^{\kappa_m z}$ ou $e^{-\kappa_d z}$, dans le métal et dans le diélectrique. Il convient donc de définir une longueur de pénétration z_m dans le métal (ou z_d dans le diélectrique) comme la distance sur laquelle la densité d'énergie décroît d'un facteur 1/e:

$$z_{m(d)} = \frac{1}{2\text{Re}(k_{m(d)})}$$
 (V.17)

avec

$$k_{m(d)}^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \frac{-\epsilon_{m(d)}^2}{\epsilon_m + \epsilon_d} \tag{V.18}$$

La longueur de pénétration est aussi appelée épaisseur de peau. Pour une longueur d'onde de 600 nm, l'épaisseur de peau dans l'or est d'environ 15 nm et dans le verre environ 90 nm.

$\lambda_0(nm)$	532	605	642	684
n_{Au}	0,467+2,41i	0,241+3.01i	0,183+3.118i	0,161+3.714i
$L_{spp}(\mu m)$ Au/Air	1,07	$4,\!65$	7,254	15,54
$z_{Au}(\mu m)$	0,016	0,015	0,015	0,014
$z_{air}(\mu m)$	0,098	0,14	$0,\!152$	0,195
$L_{spp}(\mu m)$ Au/Verre	0,51	2,303	3,62	7,97
$z_{Au}(\mu m)$	0,015	0,015	0,015	0,014
$z_{verre}(\mu m)$	0,063	0,089	0,098	0,128

Table V.1 – Quelques paramètres caractéristiques de plasmon de surface aux interfaces or/air et
or/verre pour différentes longueurs d'onde. Les constantes diélectriques ont été prises
dans [73]. $n_{air}=1$ et $n_{verre}=1,5$.

Le tableau V.1 recense quelques valeurs des paramètres précédemment définis et évalués à partir des données prises dans la littérature [73], en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour deux interfaces : or/air et or/verre. Une remarque ressort de ce tableau : plus la longueur d'onde est grande, moins le plasmon de surface est confiné dans le diélectrique et plus sa longueur de propagation est élevée.

V.2.3 FRET à longue portée engendré par le plasmon de surface

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, la longueur de propagation des SPP est beaucoup plus grande que le rayon de Förster. La portée du FRET peut être donc étendue si le vecteur qui transfère non-radiativement l'énergie est le plasmon de surface. Une première étude qui montre l'existence du FRET à longue portée en utilisant le plasmon de surface a été reportée par Andrew et Barnes [9]. Dans cette expérience, une couche de 60 nm d'épaisseur contenant des donneurs (une solution de Alq_3) et une couche identique d'accepteurs (une solution de Rhodamine6G) sont positionnées sur les deux faces d'un film d'argent d'épaisseur variable de 30 à 120 nm. En excitant les donneurs, les auteurs ont observé le spectre d'émission des accepteurs, mettant en évidence un transfert d'énergie engendré par les plasmons de surface couplés de part et d'autre du film d'argent. Les profils des champs correspondant aux modes symétriques et antisymétriques sont montrés en rouge sur la V.8(a). Sur la figure V.8(b), nous reportons les spectres d'émission observés quand la couche contenant les donneurs et la couche contenant les accepteurs sont séparées par un film d'argent de 90 nm d'épaisseur. Nous pouvons observer en bleu le spectre du donneur seul, en rouge le spectre de l'accepteur seul et en noir le spectre obtenu suite à l'excitation du donneur. Le pic prononcé qui apparait sur la courbe noire est une claire évidence du FRET engendré par les plasmons du films d'argent. Cette expérience a montré que la portée du FRET peut atteindre 120 nm dans cette configuration en utilisant un film d'argent et des SPP couplés de part et d'autre du film.



Figure V.8 – (a) Superposition de la vue de section de l'échantillon et le profil des champs liés aux plasmons de surface symétriques (haut) ou antisymétriques (bas) couplés. (b) Spectres obtenus sur l'échantillon d'argent d'épaisseur 90 nm : spectres du donneur seul (bleu), de l'accepteur seul (rouge) et du donneur+accepteur (noir). Figures tirées de [9].

Quelques études ont été menées sur l'influence de nanostructures plasmoniques sur le transfert FRET. Leitner et Reinisch [113] ont étudié l'efficacité du transfert entre donneurs et accepteurs en présence d'un film d'argent très mince (constitué d'amas d'argent). Ils ont observé une diminution de l'efficacité du transfert FRET quand la distance argent-molécules est de l'ordre de 15 nm à cause de l'augmentation de la probabilité de désexcitation radiative du donneur. Reil et al. [112] ont démontré expérimentalement et numériquement que le transfert FRET dépend fortement de l'interaction entre les molécules et les résonances plamoniques des nanoparticules. Les auteurs ont fabriqué des réseaux de nano-disques de différents diamètres (donc des résonances plasmoniques différentes), et ont étudié le FRET classique en fonction de la longueur d'onde de résonance du nanodisque. Ils ont mis en évidence que le nanodisque peut augmenter soit l'intensité de fluorescence du donneur soit augmenter l'intensité de fluorescence de l'accepteur à détriment du transfert FRET.

Lunz et al. [99] ont étudié l'augmentation du FRET due au plasmon de surface sur des échantillons en multi-couches donneurs-nanoparticules d'or-accepteurs. Comparé à une structure sans nanoparticules d'or, les multi-couches avec des nanoparticules d'or augmentent d'un facteur 80 le taux de FRET et de 103% le rayon de Förster.

Pour des structures similaires, **Komarala et al.** [102] ont démontré que le plasmon de surface sur les nanoparticules d'or peut être utilisé pour surmonter le faible couplage entre le donneur et l'accepteur. Pour ce faire, des échantillons composés de plusieurs couches formés par une couche fine de nanoparticules, des couches d'espaceur et une couche de donneurs et d'accepteurs ont été réalisés pour étudier le temps de vie du donneur et de l'accepteur. La diminution du temps de vie du donneur et l'augmentation du temps de vie de l'accepteur en présence des nanoparticules d'or ont démontré que le FRET peut être augmenté par l'utilisation du plasmon de surface.

Dans le cas des nanoparticules isolés, **Zhang et al.** [100] ont greffé les donneurs et les accepteurs sur une nanoparticule d'argent de diamètre de l'ordre de 20 nm. Les mesures de temps de vie et d'intensité de fluorescence ont montré une augmentation de l'efficacité du FRET due à la présence de la nanoparticule et une augmentation du rayon de Förster de 8,3 à 13 nm.

Une autre étude utilisant des nanoparticules d'or isolées a été réalisée par **Faessler** et al. [111]. Les auteurs ont attaché des couples FRET au centre d'un dimère formé par deux billes d'or. Le temps de vie du donneur en présence de l'accepteur a été mesuré en présence et en absence du résonateur. Une diminution évidente du temps de vie du donneur a été observée attestant d'une accélération du transfert FRET.

Une structure plus complexe, en forme de multi-couches noyau-coquilles, a été proposée par **Lessard-Viger et al.** [101]. Les nanoparticules à multi-couches ont été fabriquées en utilisant une nanoparticule d'argent comme noyau, recouvert d'une couche mince de silice comme espaceur et ensuite une couche d'accepteurs et une couche de donneurs. Dans un premier temps, les auteurs ont démontré que l'efficacité du FRET est augmentée d'un facteur quatre en présence du noyau métallique. En améliorant la procédure de fabrication, **Lessard-Viger et al.** [103] ont démontré une augmentation de l'efficacité du FRET de 4% à 50%.

Afin d'exploiter les caractéristiques intéressantes du plamon de surface, dans la dernière partie de ma thèse, nous avons réalisé une expérience de FRET engendré par plasmon de surface. Par rapport à ce qui a été fait par Andrews et Barnes [9] qui ont utilisé des plasmons couplés à travers un film métallique, nous avons utilisé le plasmon de surface qui se propage à l'interface d'un film d'or continu et d'une couche de PVA. La figure V.9 schématise le principe de cette expérience. Le donneur et l'accepteur sont positionnés à quelques micromètres de distance sur un film d'or. Le donneur est excité par le faisceau laser, et la désexcitation du donneur génère le plasmon de surface sur le film d'or. Ensuite, le plasmon transfère son énergie à l'accepteur qui se trouve à la surface du film d'or et excite l'accepteur. La fluorescence de l'accepteur peut être ensuite détectée. Les résultats obtenus au cours de ma thèse dans le cadre de cette expérience seront présentés dans le chapitre VI.



Figure V.9 – Principe du FRET à longue portée en utilisant le plasmon de surface.

Après avoir validé le principe du FRET à longue portée en utilisant le plasmon de surface, nous pourrons nous intéresser au rôle que la LDOS du donneur joue sur le transfert FRET. Pour effectuer cette étude, nous utiliserons l'AFM à sonde fluorescente que nous avons décrit dans le chapitre II. En accrochant le donneur sur la pointe d'AFM, il sera possible de changer son environnement par une simple modification de sa distance à l'échantillon. Des expériences préparatoires à cela seront présentées dans le chapitre VI. Dans le même chapitre, le montage expérimental que nous avons développé pour cette étude sera décrit en détail également.

V.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'environnement sur l'interaction entre deux émetteurs fluorescents qui échangent de l'énergie par des canaux non-radiatifs. Nous avons commencé par introduire le mécanisme du transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) et les paramètres qui le pilotent. En espace libre, l'efficacité du FRET décroit en $1/r^6$ où r est la distance entre le donneur et l'accepteur. La distance sur laquelle a lieu le FRET classique est de l'ordre de 10-20 nm. Plusieurs travaux ont été effectués sur l'étude de l'influence de l'environnement sur le FRET, mais les résultats sont contradictoires. Ceci est dû au fait que les études sont menées dans la situation où à la fois l'environnement du donneur et de l'accepteur changent, à cause de la petite distance entre les deux émetteurs fluorescents. Nous avons donc proposé d'utiliser le plasmon de surface pour augmenter la portée du FRET et pouvoir ainsi étudier séparément l'influence de la LDOS expérimentée par le donneur et par l'accepteur sur le transfert FRET. Dans la suite du chapitre, nous avons introduit le plasmon de surface à l'interface métal et diélectrique et calculé la longueur de propagation et de pénétration du SPP. La longue distance de propagation du SPP à l'interface or-verre permet en principe d'étendre la portée du FRET à des distances micrométriques. Enfin, nous avons décrit l'expérience que nous pouvons réaliser pour étendre la portée du FRET en utilisant un film d'or continu. La préparation d'un tel échantillon, le montage utilisé pour cette expérience et les résultats sont présentés dans le chapitre VI.

Chapitre VI

Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes : résultats

Table des matières

VI.1 Choi	x du couple donneur-accepteur 98
VI.1.1	Candidats potentiels
VI.1.2	Choix du polymère
	PVA (polyvinyl alcohol)
	PMMA (polymethyl methacrylate)
VI.1.3	Donneur, accepteur et polymère choisi
VI.2 Prép	paration des échantillons
VI.2.1	Dépôt des donneur et des accepteurs
	Concentration des donneur et des accepteurs 101
	Épaisseur de la couche d'accepteurs
VI.2.2	Film d'or continu
VI.3 Mon	tage expérimental
VI.3.1	Montage avec excitation en champ large
VI.3.2	Montage avec fibre micro-lentillée
VI.4 Mes	ures spectrales
VI.4.1	Signature spectrale du FRET à courte portée 107
VI.4.2	Signature spectrale du FRET à longue distance 109
	Résultats obtenus avec le montage sans fibre micro-lentillée 109
	Résultats avec fibre micro-lentillée
VI.5 Mes	ures de temps de vie
VI.6 Conf	firmation des résultats préliminaires par photoblanchie-
ment	t
VI.7 Pers	pectives : influence de la LDOS sur le FRET 117
VI.7.1	Simulation des comportements attendus
VI.7.2	Vers l'observation expérimentale 119
VI.8 Cond	clusion

Dans le chapitre précédent, nous avons introduit l'idée du FRET à longue portée ainsi que les concepts théoriques qui permettent de comprendre le FRET. Nous avons aussi introduit la notion de plasmon de surface dont la longueur de propagation est de l'ordre de quelques micromètres aux longueurs d'onde du visible. L'étude du FRET engendré par plasmon de surface doit permettre d'étendre la portée du FRET à des distances comparables aux longueurs de propagation du plasmon de surface.

Dans ce chapitre nous nous intéressons à la réalisation expérimentale de ce projet, à partir du choix du couple donneur-accepteur jusqu'à la mise en évidence des signatures du transfert d'énergie. Ensuite, nous présentons les résultats que nous avons obtenus sur l'expérience de FRET à longue portée engendré par le plasmon de surface. La longue portée du FRET donne la possibilité d'étudier l'influence de la LDOS sur le FRET en changeant seulement la LDOS du donneur (ou des accepteurs) comme nous le détaillerons à la fin de ce chapitre.

VI.1 Choix du couple donneur-accepteur

VI.1.1 Candidats potentiels

Une expérience de FRET commence toujours par le choix du couple FRET. Dans la littérature, plusieurs études complètes ont été menées sur le bon choix du couple FRET à effectuer en fonction des objectifs fixés [89, 91, 92]. Le choix du couple donneur-accepteur, dans notre cas, doit répondre d'abord aux critères pour le FRET classique et de plus être résonant avec le plasmon de surface.

Nous commençons par le choix du donneur. Les critères pour le donneur concernent le niveau de luminosité de la molécule, la probabilité de lancer le plasmon de surface sur l'or (donc la longueur d'onde d'émission du donneur doit être grande pour une longueur de propagation grande), et aussi la possibilité d'être accroché à l'extrémité d'une pointe AFM.

Nous avons décidé d'utiliser une bille fluorescente de polystyrène de diamètre 100 nm (FluoSpheres Red 580/605, Invitrogen) comme donneur. Premièrement, c'est une source fluorescente que nous avons utilisée pendant plusieurs années et dont nous connaissons bien les propriétés. Deuxièmement, elle est la source la plus lumineuse parmi tous les émetteurs que nous avons testés. Il y a donc une chance accrue pour que nous observions un signal de FRET. Troisièmement, nous pouvons l'accrocher sans problèmes à l'extrémité d'une pointe AFM, ce qui est nécessaire pour étudier l'influence de la LDOS sur l'efficacité du FRET en changeant la distance entre le donneur et l'échantillon.

En ce qui concerne l'accepteur, la section efficace d'absorption à la longueur d'onde

du plasmon de surface lancé par le donneur doit être grande pour optimiser la probabilité que l'accepteur soit exicté par le plasmon de surface et le rendement quantique doit être proche de 1 pour augmenter la probabilité que des photons de fluorescence soient émis. Le spectre d'absorption de l'accepteur doit présenter un recouvrement spectral avec le spectre d'émission du donneur afin de réaliser le transfert d'énergie. Nous avons choisi d'utiliser des molécules organiques car ce sont des émetteurs très fréquemment utilisés pour faire des expériences de FRET, ils ont des spectres qui couvrent notre zone spectrale d'intérêt et ils peuvent avoir une efficacité quantique élevée (>60%).

Nous avons testé plusieurs types d'accepteurs : Alexafluor647 (Invitrogen), Atto647N (Atto-tec) et Atto665 (Atto-tec). La différence principale entre ces molécules réside dans les spectres d'absorption et d'émission, et la solubilité dans divers solvants. Le spectre d'émission du donneur (Red FluoSphere) et les spectres d'absorption des accepteurs : Atto647N, Alexafluor647 et Atto665, sont présentés sur la figure VI.1, montrant un bon recouvrement spectral des trois accepteurs avec le donneur.



Figure VI.1 – Spectre d'émission du donneur (Red FluoSphere 580/605) et spectres d'absorption des accepteurs : Atto647N, Alexafluor647 et Atto665, de gauche à droite.

Pour réaliser une couche homogène d'accepteurs d'une épaisseur de quelques dizaines de nanomètre, il est nécessaire de rajouter dans la solution d'accepteurs un polymère soluble dans le même solvant. Dans la section suivante, nous allons discuter les différentes possibilités en termes de couples accepteur-polymère.

VI.1.2 Choix du polymère

Pour avoir une couche mince ($\simeq 50 - 100$ nm) homogène de molécules fluorescentes, nous avons mélangé la solution de molécules à des polymères. Pendant ma thèse, nous avons testé deux types de polymères : PMMA (polymethyl methacrylate) et PVA (polyvinyl alcohol).

PVA (polyvinyl alcohol)

Les trois molécules que nous avons citées plus haut sont solubles dans l'eau et dans des solvants organiques. Comme premiers tests nous avons donc décidé d'utiliser du PVA, qui est aussi soluble dans l'eau, pour réaliser une couche d'accepteurs homogène, d'épaisseur d'environ 50 nm. La procédure utilisée pour la fabrication de cette couche est reporté en annexe A.

Nous avons testé cette procédure sur les molécules. La couche obtenue présente une luminosité assez élevée (environ 10^4 coups/s sous une excitation laser de puissance 15 nw) et une bonne photostabilité.

PMMA (polymethyl methacrylate)

A plus long terme, nous envisageons d'effectuer des expériences qui demandent non pas d'avoir une couche homogène d'accepteur étalée sur tout l'échantillon, mais une zone bien définie contenant les accepteurs. C'est la cas de l'exemple illustré dans la figure VI.2, où une zone de quelques dizaines de nanomètre d'extension contenant les accepteurs est située à l'extrémité d'une barrette d'or. L'émission du donneur va exciter le plasmon de surface sur la barrette d'or qui va ensuite se coupler avec les accepteurs à l'extrémité de la barrette. La fluorescence des accepteurs pourra donc être détectée.



Figure VI.2 – Le tranfert FRET entre le donneur et les accepteurs est engendré par le plasmon de surface sur une barrette d'or. Les accepteurs sont déposés à l'extrémité de la barrette par lithographie électronique.

Une voie possible pour avoir une zone d'accepteurs bien définie est d'utiliser la lithographie électronique. Le principe de fabrication de l'échantillon est de déposer une couche continue d'accepteurs dilués dans une résine photosensible sur les barrettes, et d'exposer au rayonnement électronique toutes les zones non voulues. Après avoir immergé l'échantillon dans un solvant, seulement les accepteurs non exposés au rayonnement restent sur l'échantillon de barrettes, et leurs positions coïncident avec l'extrémité des barrettes.

Ce procédé implique que le polymère et le solvant utilisés doivent satisfaire aux exigences de la lithographie. Comme à terme les échantillons serons fabriqués au LPN par N. Bardou et S. Collin, nous avons décidé d'effectuer des premiers tests en mélangeant les molécules avec du PMMA et du MIBK qui sont habituellement utilisés au LPN pour la lithographie électronique.

Les tests sur la solution Atto665 (Atto647N)+PMMA+MIBK n'ont pas donné de résultats satisfaisants. En effet, la fluorescence des molécules dans la solution de PMMA+MIBK n'étaient pas stables. De plus, les échantillons doivent être chauffés sur une plaque chauffante à 160 °C pendant 90 s avant de procéder avec la lithographie électronique. Le recuit avait un effet négatif sur les propriétés des molécules.

Des tests supplémentaires seront donc à effectuer en vue de l'application de cette méthode. Par exemple il a été montré que la méthode envisagée peut fonctionner avec de la RhB dissoute dans de l'anisole et mélangée avec du PMMA [120].

VI.1.3 Donneur, accepteur et polymère choisi

Nous avons donc fixé le couple FRET : des billes de polystyrène de diamètre 100 nm $(\lambda_{exc}/\lambda_{emi} = 580/605)$ comme donneur et des Atto665 comme accepteur. Les accepteurs sont quant à eux préparés dans une solution de PVA+eau. Les spectres d'absorption et d'émission du donneur et de l'accepteur sont présentés sur la figure VI.3. Nous pouvons constater un recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. L'Atto665 a été préférée en tant qu'accepteur aux autres molécules disponibles car la probabilité d'excitation à la longueur d'onde du laser ($\lambda = 532$ nm) est très faible et ceci nous permet de réduire l'intensité de fluorescence de l'accepteur par excitation directe du laser.



Figure VI.3 – Spectres d'absorption et d'émission pour le donneur (Red FluoSphere 580/605) et l'accepteur (Atto665).

VI.2 Préparation des échantillons

VI.2.1 Dépôt des donneur et des accepteurs

Le choix du couple FRET et du polymère n'est que la première étape. Le dépôt du donneur et de l'accepteur doit prendre en compte certains critères. Il faut s'assurer que la concentration des donneurs et des accepteurs soit correcte de même que l'épaisseur de la couche d'accepteurs.

Concentration des donneur et des accepteurs

Un paramètre clé pour une préparation réussie des échantillons fluorescents est la concentration des molécules. Il faut que la distance entre deux donneurs soit de l'ordre de 10 μ m afin d'être sûr de n'exciter qu'un seul donneur à la fois. Cette distance est déterminée par la taille du champ large d'excitation que nous utilisons, qui est d'environ 20 μ m de diamètre (détaillé dans la section VI.3.1). Sinon, nous ne pouvons pas distinguer l'origine du signal FRET (c'est-à-dire quel donneur lance le plasmon).

Comme les accepteurs sont préparés dans une mélange de PVA+eau, il faut étudier la concentration d'accepteurs par rapport au PVA. Nous avons constaté que lorsque la concentration d'accepteurs est trop élevée, le temps de vie des accepteurs diminue beaucoup à cause du self-quenching. Nous avons aussi constaté un décalage du spectre d'émission des accepteurs vers le rouge quand la concentration augmente. La figure VI.4 montre les spectres d'émission normalisés pris sur les échantillons d'accepteurs à trois concentrations différentes. Pour ces trois échantillons, nous avons déposé à la tournette un mélange de PVA+eau+accepteurs (Alexa Fluor 647) sur un substrat de verre avec le même programme de dépôt. La quantité de PVA par rapport à l'eau est constante dans les trois cas, et il n'y a que la quantité d'accepteurs (donc la concentration dans la solution finale) qui change. La courbe bleue claire est mesurée sur l'échantillon où la concentration d'accepteurs est faible. Ce spectre est donc le même que celui donné par le fournisseur, indiquant que la concentration n'est pas trop élevée. Ensuite, nous avons augmenté 10 fois la concentration d'accepteurs, le spectre mesuré (la courbe noire) montre un décalage évident vers le rouge. Quand nous augmentons 50 fois la concentration, le spectre (la courbe bleue) se décale encore vers le rouge, et présente un décalage total de 25-30 nm par rapport au spectre initial.



Figure VI.4 – Décalage du spectre d'émission normalisé des accepteurs suivant la concentration.

Ceci peut être expliqué par le transfert d'énergie entre les molécules. Quand la concentration est trop élevée, l'émission d'un accepteur peut exciter un autre accepteur. Par conservation d'énergie, l'émission du deuxième accepteur doit être à une longueur d'onde plus grande que l'excitation. Plus la concentration est élevée, plus la probabilité que ce phénomène se produise est grande, et plus le spectre d'émission est décalé vers le rouge. Pour éviter ce phénomène, nous avons choisi la concentration qui ne modifie pas le spectre.

Si la concentration d'accepteurs n'est pas assez élevée, il n'y aura pas assez de signal de fluorescence. Il faut donc trouver une concentration d'accepteurs où l'intensité de fluorescence est élevée et le temps de vie et le spectre des accepteurs ne sont pas modifiés par la présence d'autres molécules. Nous avons donc fabriqué une série d'échantillons d'accepteurs à différentes concentrations et mesuré l'intensité de fluorescence, le temps de vie et le spectre de chaque échantillon afin de trouver la bonne concentration d'accepteurs. Pour les échantillons qui possèdent une concentration d'accepteurs correcte, nous mesurons un temps de vie de 3 ns.

Épaisseur de la couche d'accepteurs

Un autre point clé pour la préparation d'un échantillon fluorescent est l'épaisseur de la couche de molécules. Dans notre cas, il s'agit des accepteurs. Si la couche d'accepteurs n'est pas assez épaisse (≤ 20 nm), les accepteurs seront très proches de la surface d'or et l'intensité de la fluorescence des accepteurs (et donc l'intensité du signal FRET) va être diminuée à cause du *quenching* par la surface d'or. Si la couche d'accepteurs est trop épaisse (≥ 100 nm), des modes guidés peuvent apparaître dans la matrice de polymère. Luan et al. [121] ont étudié l'influence de l'épaisseur des couches diélectriques fluorescentes (PMMA + Rhodamine B) sur le diagramme de rayonnement, et ont démontré l'apparition des modes guidés dans la matrice de diélectrique. Dans notre cas, si l'épaisseur de la couche d'accepteurs est grande, les accepteurs pourraient être excités par les photons émis par le donneur et transmis à longue distance par le guide d'ondes, au lieu d'être excités seulement par le plasmon de surface comme nous cherchons à le faire. Une couche de 50 nm semble être un bon compromis.

La technique que nous utilisons pour déposer les accepteurs est le spin-coating à l'aide d'une tournette. Une petite goutte de solution avec les molécules à déposer (20-150 μ l selon la viscosité de la solution) est déposée au centre de l'échantillon. Ensuite, la tournette tourne à grande vitesse afin d'étaler la goutte sur toute la surface et d'enlever l'eau de la solution. A la fin du programme, nous obtenons donc un échantillon avec une couche homogène de molécules. Dans ce cas concret, les paramètres qui définissent l'épaisseur de la couche sont la concentration de PVA par rapport à l'eau et le programme de spin-coating. Nous avons constaté que l'épaisseur de la couche devient plus importante quand la concentration de PVA augmente ou que la vitesse de spin-coating diminue. Dans le cas où les paramètres sont mal choisis, des couches trop épaisses ou trop peu épaisses, des couches non-homogènes en épaisseur ou des couche qui ne s'étalent pas sur toute la surface peuvent être produites.

La composition de la solution finale et le programme utilisé pour la déposition à la tournette pour avoir une couche de 50 nm sont présentés dans l'annexe A.

Une autre astuce pour la réussite d'une couche fine est le contôle de l'état de surface de l'échantillon substrat. Si la surface de l'échantillon est hydrophile, la goutte s'étale mieux sur la surface de l'échantillon, il y a donc plus de chance d'obtenir une couche homogène et fine. Mais si la surface de l'échantillon est hydrophobe, la goutte va être éjectée de l'échantillon avec la force centrifuge due au mouvement de rotation sans avoir pu préalablement s'étaler sur toute la surface de l'échantillon.

VI.2.2 Film d'or continu

Les premiers échantillons plasmoniques que nous avons utilisés sont des films d'or continus. Ils sont fabriqués par évaporation par nous mêmes à l'université Paris 7. Nous disposons des films d'or continus de trois épaisseurs différentes : 20, 30 et 40 nm. Nous limitons l'épaisseur du film à 40 nm puisque, pour les premières expériences que nous avons réalisées, la collection de fluorescence se fait en transmission au travers du film d'or. L'intensité de fluorescence de l'accepteur à travers un film de 40 nm est déjà très faible. Si nous augmentons la puissance d'excitation pour collecter plus d'émission de fluorescence, nous risquons de photoblanchir les émetteurs fluorescents.



Figure VI.5 – Echantillons finaux : les donneurs et les accepteurs sont déposés à la tournette sur un film d'or.

Une fois le film d'or évaporé, une solution de donneur avec des accepteurs à la bonne concentration est déposée à l'aide d'une tournette au dessus du film avec le programme présenté dans l'annexe A afin de réaliser une couche d'accepteurs de 50 nm d'épaisseur avec des donneurs isolés. Un schéma simplifié des échantillons finaux que nous fabriquons est présenté sur la figure VI.5. Nous avons vérifié l'épaisseur de la couche d'accepteurs en AFM.

VI.3 Montage expérimental

Nous procédons maintenant à la mise en évidence du signal FRET. Conne nous l'avons déjà discuté dans le chapitre précédent, la signature du FRET peut être mise en évidence en utilisant différents dispositifs et différentes méthodes : (1) Visualiser l'augmentation d'émission de fluorescence aux longueurs d'onde d'émission de l'accepteur sur le spectromètre; (2) Mesurer l'augmentation d'intensité de fluorescence de l'accepteur et la diminution d'intensité de fluorescence du donneur soit à l'aide d'un spectromètre, soit à l'aide d'un photodétecteur à avalanche; (3) Mesurer la diminution de temps de vie du donneur et le changement de temps de vie de l'accepteur à l'aide d'un photodétecteur à avalanche. Pendant ma thèse, nous avons utilisé le spectromètre pour visualiser le changement des spectres et l'intensité de fluorescence, et les photodétecteurs à avalanche pour les mesures d'intensité de fluorescence et de temps de vie.

Nous allons montrer les deux montages que nous avons utilisé pour mener les expériences de FRET. Le premier montage utilise le même objectif à huile pour réaliser l'excitation en champ large et la détection de la fluorescence. Pour le deuxième montage, nous avons ajouté une fibre micro-lentillée qui permet de focaliser le laser sur le donneur, tandis que la détection de fluorescence de l'accepteur se fait avec l'objectif à huile.

VI.3.1 Montage avec excitation en champ large

Le montage que nous présentons dans cette section utilise le même objectif à huile pour l'excitation et la détection. C'est le même montage que celui que nous avons présenté dans le chapitre II, sauf qu'à la sortie du microscope, nous avons ajouté un spectromètre comme présenté sur la figure VI.6(a).



Figure VI.6 – (a) Montage expérimental pour les mesures de FRET en spectroscopie ou en temps de vie. (b) Schéma agrandi de l'échantillon : principe de l'expérience de FRET avec excitation en champ large.

Le laser filtré à 532 nm entre dans le microscope par un objectif à huile d'ouverture numérique 1,4 puis est focalisé sur le donneur (et/ou l'accepteur) qui se situe sur l'échantillon. La fluorescence du donneur (et/ou de l'accepteur) est collectée par l'objectif et envoyée soit sur le détecteur à avalanche pour effectuer des mesures de temps de vie et d'intensité, soit sur le spectromètre pour analyser le spectre d'émission.

L'avantage de ce montage par rapport à celui présenté dans le chapitre IV est qu'il laisse la possibilité d'exciter en champ large avec une lentille amovible et de détecter en champ focalisé puisque les chemins d'excitation et d'émission sont séparés. Ceci est nécessaire pour les expériences de FRET à longue portée qui nécessite l'excitation du donneur et la détection de la fluorescence de l'accepteur à distance d du donneur simultanément tout en utilisant le même objectif à huile. Le principe de cette expérience est schématisé sur la figure VI.6(b). L'échantillon est excité par le faisceau laser en champ large (une zone d'environ 20 μ m de diamètre) en utilisant une lentille amovible dans le chemin d'excitation avant d'entrer dans le microscope, et nous varions la distance d entre le donneur et le point de détection en déplaçant l'échantillon par un système piézoélectrique. La fluorescence de l'accepteur est ensuite collectée à l'aide du spectromètre à réseau fibré à différentes distances d. Le diamètre de la fibre du spectromètre est 50 μ m et le grandissement de l'objectif à l'huile est 100, ce qui donne une zone de détection d'environ 500 nm de diamètre.

Nous avons constaté des problèmes au cours des expériences. Premièrement, pour réaliser les expériences de FRET à longue portée, nous excitons en champ large en permanance tous les accepteurs autour du donneur pendant la durée d'un balayage. Les accepteurs que nous utilisons sont des molécules organiques qui photoblanchissent rapidement si elles sont exposées à la lumière d'excitation. Nous avons constaté une diminution de fluorescence des accepteurs sous excitation directe à la fin du balayage. Deuxièmement, nous ne pouvons pas détecter le signal du donneur et de l'accepteur indépendamment quand ils sont séparés par une longue distance. Nous avons donc décidé d'utiliser une fibre micro-lentillée pour exciter le donneur et collecter son signal de fluorescence.

VI.3.2 Montage avec fibre micro-lentillée

Une fibre micro-lentillée a été implémentée pendant le stage de master de Dorian Bouchet qui a eu lieu de mars à septembre 2014. La fibre micro-lentillée (Nanonics) est une fibre optique étirée qui agit comme une micro-lentille d'ouverture numérique 0.5. Cela permet de focaliser le laser sur une zone d'environ 1 μ m de diamètre avec une distance de travail de 4 μ m. La figure VI.7 est le schéma complet du système optique avec la fibre micro-lentillée.



Figure VI.7 – Montage expérimental avec une fibre micro-lentillée [10].

Dans cette configuration, le laser d'excitation est injecté dans la fibre micro-lentillée à l'aide d'un collimateur. En amenant la fibre micro-lentillée à 4 μ m de la surface à l'aide d'un positionneur piézoélectrique à trois axes de translation (Smaract SLC-2460-S), le laser est focalisé sur le donneur. La fluorescence du donneur peut être collectée par la fibre micro-lentillée et être transmise par la fibre sur un photodétecteur à avalanche (Perkin-Elmer) pour réaliser des mesures du temps de vie et de l'intensité de fluorescence du donneur. La fluorescence de l'accepteur, qu'il soit situé à longue distance ou pas du donneur, est collectée par l'objectif à huile et envoyée sur le spectromètre pour des mesures de spectres ou sur un deuxième détecteur à avalanche (Micro Photon Devices, MPD) pour des mesures de temps de vie et d'intensité de fluorescence.

Avec le positionneur piézoélectrique trois axes, la fibre micro-lentillée peut effectuer

des déplacements nanométriques. Nous pouvons donc éclairer n'importe quelle position de l'échantillon avec une précision nanométrique et aussi éclairer des objets situés à différentes hauteurs par rapport à l'échantillon. Ceci donne la possibilité d'exciter une bille accrochée sur la pointe AFM à différentes hauteurs pour des expériences que nous envisageons de réaliser ensuite (voir section VI.7.2).

Ici, l'objectif à huile est utilisé pour la détection de la fluorescence de l'accepteur du fait de sa grande ouverture numérique. Le signal de l'accepteur étant très faible, il vaut mieux utiliser un objectif à grande ouverture numérique afin de collecter le plus de signal possible. Par rapport à la fibre micro-lentillée, l'objectif à huile peut collecter presque 10 fois plus de signal.

En résumé, avec ce montage muni d'une fibre micro-lentillée, nous pouvons focaliser le laser sur le donneur, et mesurer simultanément de façon indépendante la fluorescence du donneur et des accepteurs même s'ils sont à grande distance. Nous avons commencé les expériences de FRET en utilisant le premier montage en excitation en champ large, et avons poursuivi les expériences en utilisant le deuxième montage avec la fibre microlentillée.

VI.4 Mesures spectrales

Dans un premier temps, nous avons utilisé le spectromètre pour mettre en évidence le FRET. La méthode que nous utilisons pour extraire le signal qui donne le signature du FRET est détaillée dans la section VI.4.1. Les mesures de temps de vie seront présentés dans la section VI.5.

VI.4.1 Signature spectrale du FRET à courte portée

La première expérience de FRET a été consacrée à la vérification de l'observation du signal FRET classique (à très courte distance) pour le couple donneur-accepteur choisi afin de déterminer sa signature. Ceci permet simplement de valider le choix du couple donneur-accepteur.



Figure VI.8 – Schémas de la mesure et observation spectrale du FRET.

Dans un premier temps, nous avons fabriqué un échantillon de référence qui contient un mélange d'accepteurs et de donneurs à la bonne concentration déposé à la tournette sur un substrat de verre. La procédure que nous avons utilisé pour extraire le signal FRET est schématisée sur la figure VI.8. Le laser, à la longueur d'onde d'excitation du donneur (532 nm), est focalisé sur ce dernier à l'aide d'un objectif de microscope, et la fluorescence de l'accepteur et du donneur est collectée par le même objectif comme présenté sur la figure VI.8(a). Le spectre de cette fluorescence est montré sur la figure VI.8(d) en noir. Dans ce signal, nous observons à la fois la fluorescence du donneur, la fluorescence de l'accepteur sous excitation directe par le laser, et la fluorescence de l'accepteur due à l'effet FRET. Pour estimer le nombre d'accepteurs qui ont été excités grâce au FRET, il faut arriver à soustraire, du signal détecté au spectromètre, le signal de fluorescence du donneur et le signal de fluorescence des accepteurs dû à l'excitation directe par le laser. Le processus que nous utilisons pour estimer l'intensité du signal FRET est décrit dessous.

- 1. Acquisition du signal de fluorescence du donneur et de l'accepteur.
- 2. Soustraction du signal de fluorescence des accepteurs à cause de l'excitation directe par le laser.

L'émission de l'accepteur sous l'excitation directe du laser est facile à mesurer. Il suffit de déplacer l'échantillon pour sortir le donneur du faisceau laser, de focaliser le laser sur un endroit où il n'y a que des accepteurs et d'enregistrer le spectre d'émission de l'accepteur (voir figure VI.8(c)). La courbe bleue sur la figure VI.8(d) est le spectre de l'accepteur sous l'excitation directe enregistré pendant la même durée que la courbe noire. La soustraction entre la courbe noire (accepteur+donneur) et la courbe bleue (accepteur seul) est reportée en bleu clair sur la figure VI.8(d).

3. Soustraction du signal de fluorescence du donneur.

La courbe bleue claire que nous avons obtenue dans l'étape précédente contient le signal de fluorescence du donneur et le signal de fluorescence de l'accepteur induit par l'effet FRET. Il faut donc soustraire le signal du donneur afin d'estimer le signal FRET. Il suffit donc d'enregistrer le spectre du donneur sur un substrat de verre sans accepteur et de le normaliser par rapport à la courbe bleue claire afin d'éliminer toutes les contributions venant du donneur. Nous faisons l'hypothèse que le spectre du donneur ne change pas du fait de la présence des accepteurs.

Nous avons donc réalisé une autre mesure (la figure VI.8(b)) en enregistrant le spectre du donneur seul en absence d'accepteurs. Le spectre est présenté sur la figure VI.8(d) en rouge. Ce spectre est déjà normalisé par rapport à la courbe noire en minimisant l'erreur quadratique entre les deux courbes dans l'intervalle 618-640 nm où l'émission de fluorescence de l'accepteur est négligeable par rapport au signal dû au donneur.

4. Mesure du signal FRET.

La différence entre la courbe bleue claire et le spectre du donneur normalisé (zone hachurée) correspond au signal d'intensité du FRET. Le signal FRET (zone hachurée dans la figure VI.8(d)) peut être quantifié en calculant la surface de cette zone.

Pour les spectres acquis sur tous les échantillons, nous utilisons cette méthode pour extraire le signal de FRET. Cette expérience valide le choix du couple donneur-accepteur et montre que le transfert d'énergie a eu lieu en zone proche du donneur. Les expériences visant à démontrer l'existence du FRET à longue portée seront présentées dans les sections suivantes.

VI.4.2 Signature spectrale du FRET à longue distance

Résultats obtenus avec le montage sans fibre micro-lentillée

Les premières expériences de FRET à longue portée ont été réalisées en utilisant le montage avec excitation en champ large que nous avons décrit dans la section VI.3.1. L'idée est très simple : nous excitons le donneur par le faisceau laser en champ large et nous collectons la fluorescence de l'accepteur à différentes distances d du donneur. Le principe de cette expérience a été schématisé sur la figure VI.6(b).

Pour d grande, la fluorescence de l'accepteur est excitée par le plasmon de surface puisque d est trop grande pour avoir du FRET classique et l'accepteur ne peut pas être excité par le laser. En effectuant une série de mesures à différentes distances d, nous pouvons déterminer jusqu'à quelle distance peut avoir lieu le transfert FRET engendré par plasmon.

La figure VI.9 montre les résultats que nous avons obtenus sur un film d'or de 30 nm pour différentes distances d. Dans cette figure, la méthode que nous utilisons pour calculer le signal FRET est celle que nous avons présentée dans la section précédente. Les courbes noires sont la fluorescence du donneur et de l'accepteur prises sur l'échantillon d'or de 30 nm où nous avons déposé à la tournette des donneurs et des accepteurs. Les courbes rouges représentent les spectres du donneur seul sur un échantillon d'or de 30 nm obtenu par le même processus de dépôt que celui utilisé pour les expériences de FRET. Cette opération assure que nous comparons les spectres pris sur les mêmes échantillons. Le signal de l'accepteur seul sous excitation directe (courbe bleue) est pris sur le même échantillon que pour le signal donneur avec accepteur, mais à un endroit où il n'y a pas de donneurs dans le champ large d'excitation. Les zones hachurées représentent le signal FRET.

La première mesure est en coïncidence avec le donneur (figure VI.9(a)). Nous observons une intensité du signal FRET élevée puisque le FRET classique intervient. La figure VI.9(b) montre les signaux pris à d = 300 nm du donneur. A cause de la grande taille de détection (de diamètre d'environ 500 nm) et de la forte intensité de fluorescence du donneur, nous observons encore la fluorescence du donneur, mais l'intensité du FRET est aussi calculé à cette position. Quand le point de détection est très éloigné du donneur (figure VI.9(c)), la fluorescence du donneur n'est plus présente dans les spectres. Le spectre enregistré contient donc seulement la fluorescence de l'accepteur.

Ainsi, le signal d'intensité du FRET, l'intégrale de la zone hachurée, est calculé à plusieurs distances d du donneur afin de trouver jusqu'à quelle distance a lieu le transfert d'énergie. Il diminue environ d'un facteur trois quand le point de détection s'éloigne du donneur de 300 nm. Cette décroissance du signal FRET (courbe rouge) en fonction de la distance d est présentée sur la figure VI.10. La courbe est normalisée par son maximum.

Le pas du balayage de l'échantillon est de l'ordre de 150 nm dans cette expérience. Ce pas résulte d'un compromis entre avoir une courbe avec un nombre de points élevé et réduire le temps du balayage afin de limiter les dérives thermiques et le photoblanchiement des molécules, puisque la durée totale du balayage est d'environ 10 min.

La courbe est comparée à la décroissance de l'intensité du donneur seul sur un substrat



Figure VI.9 – Spectres obtenus sur un film d'or de 30 nm à différentes distances d du donneur. (a) d=0 nm. (b) d=300 nm. (c) d=2000 nm. L'intégrale de la partie hachurée (proportionnel au signal d'intensité du FRET) vaut (a) 5065, (b) 1695 et (c) 103. Nous remarquons que pour d=2000 nm, le signal FRET a disparu et que cette intégrale nous renseigne sur la valeur du bruit.

de verre afin de comprendre quels sont les effets du plasmon de surface. L'intensité de fluorescence du donneur seul sur un substrat de verre est mesurée à différentes distances d entre le donneur et le point de détection, en faisant le même balayage que celui sur l'or. La courbe verte sur la figure VI.10 est la décroissance de l'intensité du donneur en



Figure VI.10 – Distribution de l'intensité de fluorescence du donneur (courbe verte) et du signal FRET (courbe rouge) en fonction de la distance entre le donneur et le point de détection sur un film d'or de 30 nm d'épaisseur.

fonction de la distance d, elle est normalisée par son maximum.

Sur cette figure, nous faisons un balayage de 5 μ m et la position 0 correspond à la position du donneur. Les valeurs négatives et positives signifient respectivement la côté gauche et la côté droite du donneur sur la même ligne. Nous pouvons constater que les deux courbes coïncident au voisinage du donneur. Ceci est dû à la grande taille de détection puisque nous utilisons une fibre de diamètre 50 μ m. Quand le point de détection est éloigné du donneur, la courbe rouge décroit plus lentement que la courbe verte, ce qui montre l'existence du FRET engendré par le plasmon de surface. Sans le plasmon de surface, l'accepteur à longue distance ne pourrait pas être excité par le donneur et nous observerions la même courbe que sur du verre. Nous pouvons en déduire aussi la longueur de transfert FRET dans cette situation à partir des deux courbes : elle est de l'ordre de 1 μ m dans les deux directions.

La longueur de propagation théorique du plasmon de surface à l'interface or/air et or/verre a été calculée dans le chapitre précédent. Dans notre cas, le film d'or est recouvert d'une couche de PVA qui a une indice de réfraction d'environ 1,5. La longueur de propagation calculée à 605 nm, l'émission maximale du donneur que nous utilisons, est 2,3 μ m. La diminution de la longueur de propagation dans notre expérience peut être expliquée par plusieurs phénomènes :

- Dans le cas théorique, nous considérons un film d'or sans défaut sur la surface. Dans le cas réel, la rugosité de la surface peut diffusé le plasmon de surface en champ lointain et par conséquent diminuent la longueur de propagation. Ceci a été observé dans plusieurs expériences [122]. Nous avons imagé l'état de surface des films d'or que nous avons utilisé, la rugosité de la surface est assez élevée.
- Le modèle que nous avons utilisé pour calculer la longueur de propagation, deux milieux semi-infinis, ne représente pas exactement notre échantillon. Dans un article de **Zhang et al.** [123], les auteurs ont fabriqué un échantillon similaire à celui que nous utilisons, une couche de 45 nm de PMMA sur un film d'argent de 45 nm qui est déposé sur un substrat de verre. La distance de propagation du plasmon de surface à 650 nm est 3 μ m sur cet échantillon au lieu de 12 μ m pour le modèle

de deux milieux semi-infinis argent/verre. La superposition de plusieurs couches minces peut donc changer de manière non négligeable la longueur de propagation.

• Ce que nous mesurons ici n'est pas exactement la longueur de propagation du plasmon de surface, mais l'étendue du FRET engendré par le plasmon de surface. Il faut donc prendre en compte la probabilité que le plasmon excite les accepteurs, qui va dépendre entre autre de l'étendue en Z (direction orthogonale au plan de l'échantillon) du plasmon par rapport à l'épaisseur de la couche d'accepteurs.

Pendant les mesures du signal FRET à longue distance, nous avons constaté une diminution de fluorescence d'accepteur sous excitation directe du laser à la fin du balayage due à l'excitation en champ large à cause du photoblanchiement des accepteurs. Cette diminution de fluorescence ne met pas en cause les résultats que nous avons présenté sur la figure VI.10. En effet, pour extraire le signal FRET à partir des trois spectres, nous soustrayons toujours la fluorescence de l'accepteur seul prise au début du balayage. Comme ce signal est plus important que celui que nous obtenons quand les accepteurs sont partiellement photoblanchis à la fin du balayage, nous sous-estimons le signal FRET. Cela ne change pas la conclusion que sur un film d'or de 30 nm d'épaisseur, nous pouvons observer le FRET à environ 1 μ m de distance.

Le montage avec la fibre micro-lentillée est conçu en partie pour résoudre ce problème de photoblanchiement des accepteurs sous excitation en champ large.

Résultats avec fibre micro-lentillée

Pour éviter le problème du photoblanchiement des accepteurs sous l'excitation en champ large, nous avons décidé d'utiliser le montage avec la fibre micro-lentillée. La figure VI.11 est un schéma simplifié de ce montage.



Figure VI.11 – Montage expérimental pour le FRET.

L'utilisation de la fibre micro-lentillée permet de focaliser le laser d'excitation sur le donneur. La même expérience que celle présentée dans la section précédente est réalisée sur un film d'or de 40 nm d'épaisseur en utilisant la fibre micro-lentillée pour exciter le donneur et le spectromètre pour acquérir la fluorescence des accepteurs à une distance d. Comme la position de la détection est fixée par la position de l'objectif de microscope, nous sommes obligés de déplacer en même temps la fibre micro-lentillée et l'échantillon

afin d'exciter toujours de la même façon le donneur et de récolter la fluorescence des accepteurs à une distance d.



Figure VI.12 – Distribution de l'intensité de fluorescence du donneur (courbe verte) et du signal FRET (courbe rouge) en fonction de la distance entre le donneur et le point de détection sur un film d'or de 40 nm d'épaisseur.

La courbe de décroissance du signal FRET est présentée sur la figure VI.12 en rouge. La courbe verte est la décroissance de l'intensité de fluorescence du donneur seul sur verre en utilisant le même système. Nous pouvons aussi observer une décroissance plus lente due aux plasmons de surface.

VI.5 Mesures de temps de vie

Une autre signature du FRET est le changement du temps de vie du donneur en présence de l'accepteur. Nous avons réalisé des mesures en utilisant le montage expérimental sans fibre micro-lentillée. D'autres mesures de temps de vie utilisant le montage avec fibre micro-lentillée ont été effectuées dans le cadres du stage de M2 de Dorian Bouchet, mais ne seront pas présentées dans ce manuscrit de thèse.

Sur la figure VI.13, nous pouvons observer que le temps de vie du donneur sur un substrat de verre passe de 7.14 ns (courbe rouge) à 4.38 ns (courbe violette) lorsque les accepteurs sont présents. Les résultats sur un film d'or présentent un changement analogue. Le temps de vie du donneur seul sur l'or est de 3.5 ns (courbe bleue claire), et il devient 1.14 ns en présence de l'accepteur (courbe verte).

Les changements de temps de vie du donneur en présence de l'accepteur sont significatifs. Cependant, l'émission du donneur s'étale spectralement jusqu'à plus que 700 nm et se confond avec l'émission de l'accepteur. Les signaux de temps de vie présentés dans la figure VI.13 ont donc une composante parasite due au signal de fluorescence des accepteurs, qui peut fausser la mesure.

Les mesures de temps de vie du donneur et de l'accepteur deviennent plus simple à mettre en oeuvre avec le montage incluant la fibre micro-lentillée. La fibre permet de collecter la fluorescence du donneur et l'objectif à huile permet de détecter la fluorescence de l'accepteur à une distance d du donneur. La détection de ces deux signaux est réalisée



Figure VI.13 – Observation du FRET en temps de vie.

à l'aide de l'objectif à l'huile et la fibre micro-lentillée. La présence de la fluorescence parasite est donc moins importante par rapport au montage sans fibre micro-lentillée où nous collectons l'ensemble de la fluorescence par le même objectif.

VI.6 Confirmation des résultats préliminaires par photoblanchiement

Les résultats préliminaires montrés dans la section VI.4 semblent être une démonstration convaincante de l'existence du FRET à longue portée. Cependant, dans la configuration que nous utilisons pour faire les mesures, deux processus peuvent avoir lieu :

- 1. L'émission du donneur excite le plasmon de surface qui va ensuite se coupler avec les accepteurs. Dans ce processus, les accepteurs sont excités par le plasmon de surface, ce qui correspond au signal que nous voulons étudier.
- 2. L'émission du donneur excite directement les accepteurs à proximité, et ces derniers vont exciter le plasmon de surface. Ici, la fluorescence que nous détectons est le plasmon de surface généré par l'émission d'accepteurs et diffusé par la rugosité de surface. Dans ce scénario, nous restons dans le FRET classique, puisque le transfert d'énergie entre donneur et accepteur a eu lieu à très courte distance.

Pour être sûr que les signaux FRET que nous avons obtenus sont issus du premier processus, il faut montrer que le deuxième processus n'est pas celui qui domine le transfert dans notre expérience. Pour démontrer cela, une idée très simple est mise en place : il s'agit de photoblanchir les accepteurs autour du donneur pour diminuer la probabilité que le processus de FRET direct ait lieu. Les signaux détectés à longue distance seront donc dus à l'émission des accepteurs engendrée par le plasmon de surface. Les expériences que nous reportons dans cette section ont été réalisées par Dorian Bouchet pendant son stage de M2.

Le photoblanchiement des accepteurs est effectué avec le montage expérimental utilisant la fibre micro-lentillée. Le principe de cette opération est montré sur la figure VI.14. Le laser à 532 nm est d'abord utilisé pour optimiser la fluorescence du donneur. Ensuite,



Figure VI.14 - Principe de la procédure de photoblanchiment.

la longueur d'onde d'excitation passe à 642 nm par le changement du filtre d'excitation et le laser à 642 nm est focalisé sur le donneur. Le point clé de cette opération est que le laser à 642 nm n'excite pas le donneur, et que les accepteurs présentent une très forte absorption à cette longueur d'onde, et donc photoblanchissent rapidement en étant exposés au rayonnement intense à 642 nm. Après avoir photoblanchi les accepteurs, nous revenons sur une excitation à 532 nm afin de réaliser les mesures de FRET à longue portée.

La durée du processus de photoblanchiement doit être bien contrôlée pour ne photoblanchir que les accepteurs situés autour du donneur. Comme la longueur de propagation des plasmons de surface est de l'ordre de 1,5 μ m, la zone où les accepteurs sont photoblanchis ne doit pas dépasser cette taille afin de pouvoir observer le signal de FRET.



Figure VI.15 – Evolution temporelle de la fluorescence des accepteurs en fonction du temps et de la distance pendant la procédure de photoblanchiement, sur un échantillon d'or.

Une étude a été menée pour caractériser la procédure de photoblanchiement en fonction du temps et de la distance d entre le point de détection et le donneur. La figure VI.15 montre l'intensité émise par les accepteurs pendant la procédure de photoblanchiement à différentes distances d du donneur, sous excitation à 642 nm. Nous pouvons observer que l'intensité de fluorescence des accepteurs situés au centre du faisceau laser (en coïncidence avec le donneur, courbe bleue) et à 500 nm (courbe rouge) diminue rapidement. Après 20 s d'excitation intense, l'intensité de fluorescence des accepteurs est plutôt stable. En revanche, à 1 μ m du donneur, l'intensité de fluorescence des accepteurs reste relativement constante, ce qui implique que le faisceau laser photoblanchit une zone plus petite que 1 μ m de rayon. La stabilité de l'intensité de fluorescence du donneur au cours du temps sous une excitation à 642 nm (courbe jaune) confirme que le donneur n'est pas influencé par le photoblanchiement.



Figure VI.16 – Evolution spectrale de la fluorescence des accepteurs en fonction du temps et de la distance pendant la procédure de photoblanchiement, sur un échantillon d'or.

Un autre moyen de vérifier le photoblanchiement autour du donneur est le spectre. La figure VI.16 montre le spectre du donneur en présence d'accepteur avant et après photoblanchiment.

Sur le spectre pris avant le photoblanchiement (courbe bleue) en coïncidence avec le donneur sous l'excitation 532 nm, un pic significatif apparait à 690 nm attestant l'existence du transfert FRET entre le donneur et les accepteurs. Après 10 s de photoblanchiement, ce pic d'émission disparaît signifiant la disparition de la fluorescence de l'accepteur par FRET. Cela signifie que 10 s d'excitation intense à 642 nm suffisent pour photoblanchir les accepteurs autour du donneur.

La figure VI.15 et la figure VI.16 démontrent qu'une durée de 10 s permet de photoblanchir les accepteurs en zone proche du donneur, avec un contrôle sur la zone de photoblanchiement qui ne dépasse pas 1 μ m de rayon.

Afin de mesurer les signaux FRET à longue portée après le photoblanchiement autour du donneur, nous avons réalisé une expérience similaire à celle présentée dans la section VI.4.2. Cette expérience a pour objectif de démontrer que le FRET que nous avons observé dans les figures VI.10 et VI.12 a eu lieu par le plasmon excité par le donneur.

L'expérience réalisée consiste à photoblanchir les accepteurs en zone proche du donneur, et à mesurer ensuite l'intensité de fluorescence des accepteurs à différentes positions d du donneur. Afin d'augmenter la sensibilité des mesures, nous avons privilégié l'utilisation des photodiodes à avalanche sur l'utilisation du spectromètre. La distribution d'intensités des accepteurs en fonction de la distance d est présentée sur la figure VI.17 en rouge. Comme référence, la distribution d'intensité du donneur seul sur or (courbe noire) et la distribution d'intensité de l'accepteur avant le photoblanchiement (courbe bleue) sont aussi présentées dans cette figure.



Figure VI.17 – Distributions d'intensité de la fluorescence en fonction de la distance *d* entre le point de détection et le donneur dans trois contextes différents, sur des échantillon d'or.

Dans la courbe noire, aucun transfert d'énergie entre donneur et accepteur ne peut être observé, mais seules les pertes radiatives du plasmon de surface diffusé par les rugosités de la surface d'or peuvent être mesurées. Dans la courbe bleue, un transfert d'énergie peut être observé mais le plasmon de surface peut être lancé soit par le donneur soit par les accepteurs autour du donneur. Cette courbe représente donc la fluorescence des accepteurs due à ces deux phénomènes. Ce graphique est analogue de celui reporté sur la figure VI.12 obtenu en utilisant le spectromètre.

Avant d'acquérir la courbe rouge, le photoblanchiement des accepteurs autour du donneur a été effectué afin d'éliminer la fluorescence des accepteurs en zone proche du donneur. Cette courbe représente donc seulement la fluorescence des accepteurs excités par le plasmon de surface lancé par le donneur. Le signal non nul après 500 nm montre l'existence de ce transfert d'énergie entre donneur et accepteurs engendré par le plasmon de surface.

VI.7 Perspectives : influence de la LDOS sur le FRET

Nous avons démontré jusqu'ici l'existence du transfert FRET à une distance d'environ 1 μ m en utilisant le plasmon de surface. Cette distance peut être augmentée en améliorant le support plasmonique. Des films continus qui possèdent une rugosité de surface moins élevée, ou qui sont fabriqués avec un métal qui présente un taux d'absorption moins élevé (argent par exemple) doivent pouvoir en principe largement augmenter la distance du tranfert FRET, ainsi que des nano-structures métalliques destinées à augmenter la longueur de propagation du plasmon, comme des bandes ou des fils [124].

Cependant, au delà de la réalisation d'expériences où nous pouvons observer une distance de transfert FRET de plus en plus grande, notre objectif est d'étudier l'influence de la LDOS sur le FRET tout en changeant seulement la LDOS du donneur ou de l'accepteur. Les expériences sur le FRET à longue portée ouvrent la possibilité de ne changer que la LDOS du donneur ou de l'accepteur. Dans la suite, nous allons présenter les simulations que Alexandre Cazé et Rémi Carminati ont réalisé sur l'influence de la LDOS sur le FRET et aussi les expériences qui sont envisagés à la suite de cette thèse.

VI.7.1 Simulation des comportements attendus

Alexandre Cazé et Rémi Carminati ont effectué des simulations sur l'étude de l'efficacité du FRET en fonction de la distance d entre les donneurs et accepteurs et la distance z entre les émetteurs et un miroir d'or. Les simulations utilisent un modèle pour le FRET en présence d'une structure développé dans [125]. La figure VI.18 est un schéma du système modélisé dans les simulations. Deux dipôles d'orientation aléatoire espacés d'une distance d sont à la même hauteur z d'un miroir d'argent. Les simulations sont réalisées en changeant la distance d et la hauteur z. Le changement de z correspond au changement de LDOS vu par le donneur ou l'accepteur.



Figure VI.18 – Deux dipôles distants de d se situent à la même hauteur z du miroir d'or.

L'idée de ces simulations est d'étudier l'influence de l'environnement sur l'efficacité du FRET $\eta_{FRET} = \frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_D + \Gamma_{FRET}}$ et l'augmentation du tranfert FRET $f_{FRET} = \frac{\Gamma_{FRET}}{\Gamma_{FRET}^0}$, où Γ_{FRET}^0 désigne le taux de transfert FRET dans le vide ou dans un milieu homogène de référence. L'influence de l'environnement sur le transfert FRET est étudiée en changeant la distance entre le donneur et l'accepteur. Les résultats préliminaires des simulations sont montrés sur la figure VI.19, et nous constatons une dépendance différente entre la LDOS et η_{FRET} et f_{FRET} en fonction de d.

Pour des distance comprises dans le régime du FRET standard, la LDOS (c'est à dire la hauteur z) n'influence pas trop l'efficacité du FRET. En revanche, pour des distances d plus grandes, η est influencé par la LDOS. Pour ce qui concerne f_{FRET} (l'augmentation du FRET par rapport à ce qu'on obtiendrait en milieu homogène, figure VI.19(b)), les simulations indiquent que la LDOS n'a aucune influence pour des courtes distances, tandis que, pour les distances qui nous intéressent, f_{FRET} présente un maximum qui est plus marqué si nous restons près du film d'or (LDOS plus élevée). Nous souhaiterions donc observer ces effets expérimentalement.



Figure VI.19 – Deux émetteurs à longue distance d en champ proche d'un miroir d'or. Les simulations sont effectuées à trois distances : z = 10, 50 et 500 nm. (a) Efficacité du FRET η_{FRET} . (b) Augmentation du transfère FRET f_{FRET} en fonction de d.

VI.7.2 Vers l'observation expérimentale

La versatilité de notre montage expérimental nous permet de changer à la fois la distance d entre le donneur et l'accepteur et la hauteur z du donneur par rapport à l'échantillon. Dans ce chapitre, nous avons discuté les effets observés lorsque nous changeons d. Dans cette section, nous allons montrer les premières études que nous avons effectuées au sein de cette thèse pour préparer les expériences vouées à l'étude du FRET en fonction de z. Pour changer la hauteur des accepteurs, nous envisageons de fabriquer des échantillons comprenant une couche d'espacement diélectrique de différentes épaisseurs entre la couche d'or et la couche d'accepteurs. Ceci revient à changer Γ_A . Pour changer la hauteur du donneur par rapport à la surface d'or nous envisageons d'accrocher le donneur à la pointe d'AFM et de régler la hauteur de la pointe par rapport à la surface au moyen d'un positionneur piézoélectrique. La figure VI.20 est un schéma de l'expérience envisagée.



Figure VI.20 – Principe d'étude de l'influence de LDOS sur l'efficacité du FRET en changeant la distance entre le donneur et l'échantillon.

Modifier la LDOS du donneur en changeant z tout en conservant la LDOS de l'accepteur est réalisable. Nous pouvons ainsi découpler la LDOS du donneur et la LDOS de l'accepteur, et trouver le lien entre l'efficacité du FRET et la LDOS du donneur.

Nous avons réalisé première expérience portant sur la variation de la LDOS en fonction de la hauteur z en utilisant une bille fluorescente de 100 nm de diamètre accrochée



Figure VI.21 – Temps de vie d'une bille fluorescente accroché à l'extrémité d'une pointe d'AFM en face d'un substrat de verre en fonction de la distance entre pointe et échantillon (z). Les deux courbes (a) et (b) sont réalisées avec deux sondes fluorescentes différentes.

sur une pointe d'AFM. Nous faisons varier la distance z entre la sonde fluorescente et un échantillon de verre et mesurons le temps de vie et l'intensité de la fluorescence à chaque position z. Nous montrons sur la figure VI.21 deux courbes obtenues avec deux sondes fluorescentes différentes. Dans les deux courbes, nous pouvons observer une diminution rapide de la LDOS quand la sonde s'éloigne de la surface et des oscillations à partir d'un certain z, comme dans les expériences présentés dans la section I.4.

En comparant les deux courbes, il est intéressant de noter que la période des oscillations indiquée par deux lignes en pointillé est la même, de l'ordre de 300 nm, ce qui correspond à environ la moitié de la longueur d'onde. Ceci confirme la stabilité de notre montage et la possibilité de changer précisément l'environnement du donneur.

Un autre point intéressant à relever est que, en comparant les courbes (a) et (b) nous pouvons déterminer la position de la bille sur la pointe. Dans le chapitre III, nous avons mis en évidence que les mesures de l'intensité de fluorescence et du temps de vie dépendent de la position de l'émetteur sur la pointe et que la combinaison des cartes optiques et de la topographie permet de retrouver la position latérale de l'émetteur par rapport à la pointe. Les courbes d'approche permettent de retrouver la position verticale de l'émetteur par rapport à la pointe. Lorsque l'émetteur se situe à l'extrémité de la pointe, le premier maximum de l'oscillation est à environ la demi longueur d'onde. Il suffit donc d'évaluer le décalage entre le premier maximum de l'oscillation et la demi longueur d'onde pour connître la hauteur de la bille par rapport à l'extrémité de la pointe. Pour les deux courbes présentées sur la figure VI.21, nous pouvons constater que dans la deuxième courbe, l'émetteur est accroché 100 nm plus haut sur la pointe par rapport à celui utilisé

pour la première courbe puisque le premier maximum est apparu 100 nm plus tôt. C'est donc une méthode très précise d'évaluation de la hauteur de l'émetteur.

Nous avons réalisé la même expérience en face d'un film d'or de 30 nm. Nous avons observé des oscillations comme dans le cas d'un substrat de verre. Malheureusement, les mesures ne sont pas fiables par manque de signal de fluorescence (les mesures ont été réalisées en excitant le donneur sur pointe et en récoltant sa fluorescence par le même objectif de microscope, selon le montage présenté en figure VI.3.1). De plus, afin d'acquérir plus de signal pour extraire le temps de vie de l'émetteur, il faut mesurer le signal de fluorescence pendant plus longtemps à chaque position z. Par conséquent le système doit être très stable thermiquement et mécaniquement puisqu'il n'est plus asservi au moment de réaliser des mesures optiques en différents z. Des expériences supplémentaires devrons donc être menées afin de consolider la méthode.

Malgré les difficultés rencontrées, ces expériences confirment que le montage expérimental que nous avons développé permet de réaliser des mesures en changeant précisément la position z du donneur. En mesurant le signal de fluorescence des accepteurs à distance d du donneur, nous pouvons étudier de façon très détaillée l'influence de la LDOS du donneur sur le transfert FRET.

VI.8 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré expérimentalement l'existence du transfert d'énergie non-radiatif entre deux molécules fluorescentes à longue portée engendré par plasmon de surface.

Nous avons commencé par choisir le couple FRET et le polymère servant de support aux accepteurs. En prenant en compte les critères pour le FRET classique et pour notre expérience (il faut que la zone où le spectre du donneur et de l'accepteur se recouvrent soit résonant avec le plasmon de surface), nous avons choisi des billes fluorescentes de polystyrène de diamètre de 100 nm comme donneur, des molécules Atto665 comme accepteur, et le PVA comme polymère. Les échantillons finaux contiennent une couche fine d'or, une couche d'accepteurs d'une épaisseur de 50 nm et les donneurs espacés d'environ 10 μ m.

Ensuite, nous avons montré les deux montages que nous avons utilisés pour mettre en évidence le signal FRET. Le premier montage utilise le même objectif à huile pour l'excitation et la détection, et l'excitation est en champ large à l'aide d'une lentille amovible. Nous avons constaté que les accepteurs photoblanchissent rapidement sous excitation constante en champ large. Nous avons donc développé un deuxième montage possédant une fibre micro-lentillée qui permet de focaliser le laser sur le donneur.

Ces deux montages nous ont ensuite permis de mener des expériences de FRET à longue portée engendré par plasmon de surface. Les expérience sur les films d'or continu de 30 nm et 40 nm ont démontré que nous pouvons observer la fluorescence d'accepteurs situés à 1 μ m de distance du donneur. Nous avons aussi développé un protocole expérimental permettant le photoblanchiement des accepteurs autour du donneur. Nous avons ainsi prouvé que la fluorescence des accepteurs que nous avons détectée à longue distance

du donneur est induite par le plasmon de surface, et elle n'est pas due au FRET classique puisque les accepteurs autour du donneur sont photoblanchis.

Enfin, nous avons présenté les perspectives sur l'étude de l'influence de la LDOS sur le FRET en changeant seulement la LDOS du donneur (ou de l'accepteur), donc la hauteur z entre le donneur (ou l'accepteur) et l'échantillon. Les simulations numériques ont montré qu'à grande distance entre donneur et accepteur, la LDOS influence beaucoup le taux de FRET. Nous avons aussi présenté les premières études que nous avons effectuées pour préparer les expériences sur l'étude du FRET en fonction de la LDOS.

Conclusion

Mes travaux de thèse s'insèrent dans la problématique de l'étude expérimentale de l'interaction émetteur-environnement à l'échelle nanométrique. Durant ma thèse, nous avons d'abord travaillé sur l'interaction d'un émetteur fluorescent et des nanostructures. Dans la suite, nous avons commencé à étudier l'influence de l'environnement sur le transfert d'énergie entre deux émetteurs fluorescents. Nous allons maintenant résumer les résultats que nous avons présentés dans ce manuscrit.

Dans le premier chapitre, nous avons modélisé un émetteur fluorescent par un dipôle électrique et calculé la puissance émise par ce dipôle oscillant. Puis, suivant une approche quantique, nous avons modélisé l'émetteur fluorescent comme un système à deux niveaux et calculé son taux de désexcitation. Une équivalence entre la modification de la puissance émise et la modification du taux de désexcitation a été établie. Nous avons aussi remarqué que le taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent n'est pas une propriété intrinsèque de l'émetteur fluorescent, mais dépend fortement de l'environnement. L'influence de l'environnement sur l'émission spontanée a été formalisée en utilisant le tenseur de Green, plus particulièrement sa partie imaginaire à la position de la source, qui est proportionnelle à la densité locale d'états électromagnétiques de l'environnement. Cette liaison directe entre la LDOS et le taux de désexcitation spontanée donne la possibilité de caractériser les nanostructures en utilisant des émetteurs fluorescents en mesurant leur taux de désexcitation et leur intensité de fluorescence.

Un montage expérimental permettant la cartographie simultanée de la topographie, de l'intensité de fluorescence et du taux de désexcitation d'un émetteur fluorescent en champ proche d'un milieu nanostructuré avait été développé à l'Institut Langevin juste avant mon arrivée en thèse. Le chapitre II porte principalement sur les améliorations que nous avons apportées à ce montage pendant ma thèse, et le protocole que nous utilisons pour réaliser les mesures de temps de vie et d'intensité de fluorescence d'un émetteur fluorescent en champ proche de l'échantillon. Pour la partie mécanique, nous avons conçu une nouvelle tête de balayage permettant un positionnement précis de la pointe d'AFM afin d'augmenter la stabilité et la reproductibilité du système AFM. Pour la partie électronique, un amplificateur transimpédance a été embarqué sur la tête de balayage pour limiter les sources de bruit avant l'amplification. Ce montage expérimental amélioré permet de réaliser des cartes optiques avec une résolution nanométrique.

Après avoir effectué ces développement instrumentaux, dans le chapitre III nous avons présenté des expériences que nous avons réalisées sur des nanoantennes métalliques. Nous avons obtenu simultanément la topographie, la carte d'intensité de fluorescence et la carte de taux de désexcitation fluorescente en champ proche d'une nanoantenne composée de trois disques avec une résolution latérale de 50 nm en utilisant une bille fluorescente de diamètre de 100 nm. Nous avons observé des exaltations de LDOS dans les gaps
entre les disques ainsi qu'à l'extrémité de l'antenne. Des simulations numériques effectuées au sein de l'équipe ont consolidé les résultats expérimentaux. Plus particulièrement, les simulations ont aidé à comprendre le rôle de la taille de l'émetteur fluorescent sur la résolution des cartes de LDOS.

Pour mieux comprendre la proportion des contributions radiatives et non-radiatives dans la LDOS, nous avons mené une étude portant sur la cartographie de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif apparent dans le chapitre IV. L'utilisation du théorème de réciprocité dans une géométrie rigoureusement confocale permet d'extraire à partir des mesures de la LDOS et de l'intensité de fluorescence, le taux de désexcitation radiatif effectif dans l'angle solide de détection ainsi que le taux de désexcitation non-radiatif apparent. Ce dernier prend en compte les pertes dans l'environnement dues à l'absorption et aussi les photons qui sont émis en champ lointain en dehors de l'angle solide de détection. Dans le cas d'une mesure sur 4π stéradians, les taux de désexcitation radiatif effectif et nonradiatif apparent deviennent les taux de désexcitation radiatif effectif et nonradiatif apparent deviennent les taux de désexcitation radiatif effectif et nonradiatif apparent deviennent les taux de désexcitation radiatif entre les expériences et les simulations numériques, ce qui valide la pertinence de notre méthode.

Le montage expérimental que nous avons utilisé dans le chapitre III et le chapitre IV peut être utilisé pour la cartographie de la LDOS et d'intensité d'autres systèmes, que ce soit plasmoniques ou diélectriques. La précision nanométrique du déplacement de la sonde fluorescente permet aussi de positionner l'émetteur fluorescent à des positions précises sur l'échantillon par exemple à l'endroit où il présente un facteur de Purcell élevé.

La méthode présentée dans le chapitre IV pour extraire les taux de désexcitation radiatif et non-radiatif apparents est aussi très générale, elle peut être appliquée sur d'autres systèmes métalliques ou diélectriques. La réalisation des cartes de taux de désexcitation radiatif et non-radiatif apparents ouvre la voie vers la conception de dispositifs qui maximisent l'émission de la fluorescence dans l'angle solide de détection ou qui maximisent l'absorption dans la matière. La seule limite pour la généralisation de cette méthode à tout environnement nanostructuré réside dans la réponse du système étudié qui doit être large bande par rapport au décalage de Stokes de l'émetteur fluorescent utilisé. Ceci peut être en partie résolu par l'utilisation d'émetteurs fluorescents avec un décalage de Stokes très petit.

Après avoir étudié l'influence de l'environnement sur un émetteur fluorescent, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'environnement sur le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes. Dans le chapitre V, nous avons commencé par introduire quelques concepts utiles sur le FRET classique, en particulier la dépendance en $1/r^6$ de l'efficacité du FRET par rapport à la distance entre le donneur et l'accepteur. A cause de cette dépendance, le rayon de Förster, la distance à laquelle l'efficacité du FRET est de 50%, est de l'ordre de 10-20 nm. Si des études pour modifier le rayon de Förster, le taux du transfert ou son efficacité, ont été menées et reportées dans la littérature, le rôle de l'environnement sur le FRET n'est pas encore bien maîtrisé. Les résultats dans la littérature sont souvent contradictoires. Une raison possible est que ces études sont réalisées dans le contexte du FRET classique où le donneur est très proche de l'accepteur. Nous avons donc proposé d'étudier l'influence de l'environnement sur le FRET à longue portée engendré par plasmon de surface, afin de pouvoir modifier séparément la LDOS du donneur et de l'accepteur.

Dans le chapitre VI, nous avons décrit une expérience de FRET engendré par plasmon

de surface que nous avons réalisée pendant ma dernière année de thèse. Pour les systèmes que nous avons étudiés, le plasmon se propage à l'interface d'un film d'or continu et d'une couche de PVA. Une couche de PVA dopée d'accepteurs (Atto665), d'épaisseur 50 nm, est déposée à l'aide d'une tournette sur un film d'or avec des donneurs espacés d'environ 10 μ m dans le PVA. Le donneur est excité par le faisceau laser, et la désexcitation du donneur génère le plasmon de surface sur le film d'or qui va ensuite transférer son énergie aux accepteurs qui se trouvent à la surface du film d'or. Nous avons d'abord mesuré la fluorescence des accepteurs au spectromètre à différentes distances du donneur en utilisant une excitation en champ large. L'expérience sur un film d'or de 30 nm a montré que la portée du FRET engendré par plasmon de surface est de l'ordre de 1 μ m. Pour éviter des problèmes de photoblanchiement des accepteurs sous excitation directe en champ large, nous avons implanté une fibre micro-lentillée qui permet de focaliser le laser sur le donneur et de se déplacer avec une précision nanométrique dans les trois directions de l'espace. Une deuxième expérience a été réalisée en focalisant le laser sur le donneur avec la fibre micro-lentillée et en collectant la fluorescence des accepteurs à différentes distances du donneur. Les résultats ont montré une distance de transfert FRET de l'ordre de 1,5 μ m sur un film d'or de 40 nm d'épaisseur. D'autres expériences ont été menées pour vérifier le phénomène observé. Les résultats que nous avons obtenus ont confirmé que la fluorescence des accepteurs que nous avons détectée à longue distance est induite par le plasmon de surface.

Les premiers résultats sur des échantillons de film d'or continu sont encourageants, nous pouvons imaginer deux types d'expérience dans la suite. (1) Nous pouvons continuer à augmenter la portée du FRET en utilisant différents supports plasmoniques. (2) La longue portée du FRET engendré par plasmon de surface étant validée, l'influence de l'environnement sur le transfert FRET peut être étudié en changeant seulement la LDOS du donneur ou des accepteurs. Ces deux expériences seront réalisées dans les mois à venir.

Annexes

Annexe A

Préparation des échantillons pour les expériences du FRET engendré par plasmon

Les échantillons que nous avons étudié pour démontrer le FRET à longue portée sont constitué d'un film d'or continu, d'une couche d'accepteurs de 50 nm et des donneurs espacés d'environ 10 μ m. La préparation de la solution des émetteurs fluorescents à déposer et le programme de déposition sont les deux points clés pour la réussite de l'échantillon.

A.1 Préparation de la solution

Le couple FRET a été choisi dans le chapitre VI : des billes de polystyrène de diamètre 100 nm comme donneurs et des Atto665 comme accepteurs. Les accepteurs sont préparés dans une solution de PVA+eau. La solution est préparée selon le protocole suivant :

- 1. Dissoudre les accepteurs Atto665 dans l'eau. Les accepteurs sont livrés dans des petites tubes sous la forme de 1 mg de poudre. 100 μ L d'eau est ajouté dans la tube afin de dissoudre les accepteurs dans l'eau. La solution est agitée pendant quelques secondes au vortex pour obtenir un meilleur mélange. Dans la suite nous appellerons cette solutions "solution mère".
- 2. Diluer la solution des accepteurs. La solution mère étant trop concentrée, elle est diluée 1000 fois afin d'atteindre la bonne concentration pour l'expérience. Il est à noter que pour la survie des molécules, il vaut mieux les garder dans des solutions concentrées. Il vaut mieux donc diluer la solution mère étape par étape (diluer 10 fois à chaque étape par exemple), et par petite quantité.
- 3. Mélanger les accepteurs avec le PVA. 33 μ L de la solution d'accepteurs diluée 1000 fois sont mélangés avec 100 μ L de PVA (concentration 2 % en masse).
- 4. Diluer les donneurs. Les donneurs sont livrés en solution très concentrée. Une petite quantité de la solution mère des donneurs est mise dans un bain ultrason pendant 15 min afin de séparer les émetteurs. Cette solution est ensuite diluée 100 fois.
- 5. Mélanger les donneurs avec les accepteurs+PVA. 1,2 μ L de la solution des donneurs diluée 100 fois sont ajoutés dans la solution des accepteurs+PVA. L'ensemble est agité au vortex pendant quelques secondes pour rendre la solution homogène. Cette

étape est indispensable pour réaliser un échantillon homogène d'accepteurs et de donneurs.

A.2 Programme de dépôt

Avant de déposer les accepteurs et les donneurs, le substrat doit être "nettoyé" pour avoir une meilleure adhésion, surtout lorsqu'il s'agit des films d'or. La surface des films d'or devient rapidement hydrophobe (la goutte de la solution ne s'étale pas sur la surface) après fabrication à cause des poussières dans l'air. Si la goutte de solution est déposée sur la surface d'un film d'or sans aucun traitement, la goutte ne s'étale pas sur toute la surface et l'épaisseur de la couche de PVA sur l'échantillon n'est pas homogène. Il faut donc rendre la surface des films hydrophile. Nous avons remarqué que le fait de passer les échantillons 30 min dans l'ozone cleaner permet de rendre la surface hydrophile.

Ensuite, une goutte de 130 μ L de la solution est déposée au centre de l'échantillon nettoyé. L'échantillon est soumis à une rotation de durée de 30 s à la vitesse de 1500 tours/minute avec une accélération de 500 tours/minute² à l'aide d'une tournette.

Bibliographie

- [1] R. R. Chance, A. Prock, and R. Silbey, *Molecular fluorescence and energy transfer* near interfaces, John Wiley (1978).
- [2] B. Buchler, T. Kalkbrenner, C. Hettich, and V. Sandoghdar, *Physical Review Letters* 95, 063003 (2005).
- [3] E. Castanié, Emission dipolaire et absorption en champ proche de nanostructures, Ph.D. thesis (2011).
- [4] S. Y. Suck, Digital Heterodyne Holography for Plasmonic Nanostructures, Ph.D. thesis (2011).
- [5] M. Stockman, S. Faleev, and D. Bergman, *Physical Review Letters* 87, 167401 (2001).
- [6] V. Krachmalnicoff, E. Castanié, Y. De Wilde, and R. Carminati, *Physical Review Letters* 105, 183901 (2010).
- [7] I. Medintz and N. Hildebrandt, FRET-Förster Resonance Energy Transfer : From Theory to Applications, Wiley-VCH (2014).
- [8] W. L. Barnes, A. Dereux, and T. W. Ebbesen, *Nature* **424**, 824–30 (2003).
- [9] P. Andrew and W. L. Barnes, *Science* **306**, 1002–5 (2004).
- [10] D. Bouchet, Transfert d'énergie à longue distance engendré par plasmon de surface, Rapport de stage de master 2 (2014).
- [11] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57–61 (1982).
- [12] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel, Applied Physics Letters 40, 178–180 (1982).
- [13] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933 (1986).
- [14] E. H. Synge, *Philosophical Magazine* **6**, 356–362 (1928).
- [15] E. H. Synge, *Philosophical Magazine* **13**, 299–300 (1932).
- [16] K. Lieberman, S. Harush, A. Lewis, and R. Kopelman, *Science* **247**, 59–61 (1990).
- [17] A. Lewis and K. Lieberman, *Nature* **354**, 214–216 (1991).
- [18] K. Drexhage, J. Lumin 1, 693 (1970).
- [19] F. Rouessac and A. Rouessac, Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes, Dunod (2004).

- [20] L. Novotny and B. Hecht, *Principles of nano-optics*, Cambridge (2006).
- [21] R. Carminati, J.-J. Greffet, C. Henkel, and J. Vigoureux, Optics Communications 261, 368–375 (2006).
- [22] J. M. Wylie and J. E. Sipe, *Phys. Rev. A* **30**, 1185–1193 (1984).
- [23] D. Cao, A. Cazé, M. Calabrese, R. Pierrat, N. Bardou, S. Collin, R. Carminati, V. Krachmalnicoff, and Y. De Wilde, arXiv 1401.2858 (2014).
- [24] M. Frimmer, Y. Chen, and A. F. Koenderink, *Physical Review Letters* 107, 123602 (2011).
- [25] E. Castanié, V. Krachmalnicoff, A. Cazé, R. Pierrat, Y. De Wilde, and R. Carminati, Optics letters 37, 3006–8 (2012).
- [26] V. Krachmalnicoff, D. Cao, A. Cazé, E. Castanié, R. Pierrat, N. Bardou, S. Collin, R. Carminati, and Y. De Wilde, *Optics express* 21, 11536–45 (2013).
- [27] L. Aigouy, Y. De Wilde, and F. Christian, Les nouvelles microscopies : A la découverte du nanomonde, Belin (2006).
- [28] M. Calabrese, Design and development of an AFM scanning probe for applications to lifetime measurements of fluorescent nanoemitters on nanoantenna samples, Rapport de stage (2013).
- [29] J. Rychen, T. Ihn, P. Studerus, A. Herrmann, K. Ensslin, H. J. Hug, P. J. A. van Schendel, and H. J. Güntherodt, *Review of Scientific Instruments* 71, 1695 (2000).
- [30] T. Instruments, Wideband, Unity-Gain Stable, FET-Input Operational amplifier, Technical report (2008).
- [31] H. Nyquist, *Physical Review* **32**, 110 (1928).
- [32] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, and D. J. Nesbitt, *The Journal of Chemical Physics* 112, 3117 (2000).
- [33] B. Mahler, P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, J.-P. Hermier, and B. Dubertret, Nature materials 7, 659–64 (2008).
- [34] P. Bharadwaj, B. Deutsch, and L. Novotny, Advances in Optics and Photonics 1, 438 (2009).
- [35] M. L. Brongersma, Y. Cui, and S. Fan, *Nature Materials* **13**, 451–460 (2014).
- [36] D. Canneson, I. Mallek-Zouari, S. Buil, X. Quélin, C. Javaux, B. Mahler, B. Dubertret, and J.-P. Hermier, *Physical Review B* 84, 245423 (2011).
- [37] C. Vandenbern, L. S. Froufe-Pérez, and R. Carminati, Journal of Optics A : Pure and Applied Optics 11, 114007 (2009).
- [38] J.-J. Greffet, *Science* **308**, 1561–3 (2005).
- [39] J. N. Farahani, D. W. Pohl, H.-J. Eisler, and B. Hecht, *Physical Review Letters* 95, 017402 (2005).
- [40] P. Anger, P. Bharadwaj, and L. Novotny, *Physical Review Letters* 96, 113002 (2006).

- [41] M. D. Birowosuto, S. E. Skipetrov, W. L. Vos, and A. P. Mosk, *Physical Review Letters* 105, 013904 (2010).
- [42] A. G. Curto, G. Volpe, T. H. Taminiau, M. P. Kreuzer, R. Quidant, and N. F. van Hulst, *Science* **329**, 930–3 (2010).
- [43] K. G. Lee, X. W. Chen, H. Eghlidi, P. Kukura, R. Lettow, A. Renn, V. Sandoghdar, and S. Götzinger, *Nature Photonics* 5, 166 (2011).
- [44] R. J. Moerland, T. H. Taminiau, L. Novotny, N. F. van Hulst, and L. Kuipers, Nano letters 8, 606–10 (2008).
- [45] I. Mallek-Zouari, S. Buil, X. Quélin, B. Mahler, B. Dubertret, and J.-P. Hermier, *Applied Physics Letters* 97, 053109 (2010).
- [46] A. V. Akimov, A. Mukherjee, C. L. Yu, D. E. Chang, A. S. Zibrov, P. R. Hemmer, H. Park, and M. D. Lukin, *Nature* 450, 402–6 (2007).
- [47] H. Wei, D. Ratchford, X. E. Li, H. Xu, and C.-K. Shih, Nano letters 9, 4168–71 (2009).
- [48] A. Badolato, K. Hennessy, M. Atatüre, J. Dreiser, E. Hu, P. M. Petroff, and A. Imamoglu, *Science* **308**, 1158–61 (2005).
- [49] K. Hennessy, A. Badolato, M. Winger, D. Gerace, M. Atatüre, S. Gulde, S. Fält, E. L. Hu, and A. Imamoglu, *Nature* 445, 896–9 (2007).
- [50] L. Sapienza, H. Thyrrestrup, S. Stobbe, P. D. Garcia, S. Smolka, and P. Lodahl, Science 327, 1352–5 (2010).
- [51] P. V. Ruijgrok, R. Wüest, A. A. Rebane, and V. Sandoghdar, Optics Express 18, 6360 (2010).
- [52] R. Sapienza, P. Bondareff, R. Pierrat, B. Habert, R. Carminati, and N. F. van Hulst, *Physical Review Letters* 106, 163902 (2011).
- [53] T. van der Sar, E. C. Heeres, G. M. Dmochowski, G. de Lange, L. Robledo, T. H. Oosterkamp, and R. Hanson, *Applied Physics Letters* 94, 173104 (2009).
- [54] A. Huck, S. Kumar, A. Shakoor, and U. L. Andersen, *Physical Review Letters* 106, 096801 (2011).
- [55] A. W. Schell, G. Kewes, T. Hanke, A. Leitenstorfer, R. Bratschitsch, O. Benson, and A. Thomas, *Optics Express* 19, 7914 (2011).
- [56] S. Kumar, N. I. Kristiansen, A. Huck, and U. L. Andersen, Nano letters 14, 663–9 (2014).
- [57] S. Schietinger, M. Barth, T. Aichele, and O. Benson, *Nano letters* 9, 1694–1698 (2009).
- [58] D. Englund, B. Shields, K. Rivoire, F. Hatami, J. Vučković, H. Park, and M. D. Lukin, *Nano letters* 10, 3922–6 (2010).
- [59] J. Michaelis, C. Hettich, J. Mlynek, and V. Sandoghdar, *Nature* 405, 325–8 (2000).
- [60] L. Aigouy, Y. De Wilde, and M. Mortier, Applied Physics Letters 83, 147 (2003).

- [61] A. W. Schell, P. Engel, J. F. M. Werra, C. Wolff, K. Busch, and O. Benson, *Nano letters* 14, 2623–2627 (2014).
- [62] R. Beams, D. Smith, T. W. Johnson, S.-H. Oh, L. Novotny, and A. N. Vamivakas, *Nano letters* 13, 3807–11 (2013).
- [63] J. Berthelot, S. S. Aćimović, M. L. Juan, M. P. Kreuzer, J. Renger, and R. Quidant, *Nature nanotechnology* 9, 295–9 (2014).
- [64] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, R. A. Keller, and J. C. Martin, *Science* 265, 364 (1994).
- [65] H. Gersen, M. F. García-Parajó, L. Novotny, J. A. Veerman, L. Kuipers, and N. F. van Hulst, *Physical review letters* 85, 5312–5 (2000).
- [66] T. H. Taminiau, F. D. Stefani, F. B. Segerink, and N. F. van Hulst, Nature Photonics 2, 234–237 (2008).
- [67] S. Kühn, U. Håkanson, L. Rogobete, and V. Sandoghdar, *Physical Review Letters* 97, 017402 (2006).
- [68] A. Singh, G. Calbris, and N. F. van Hulst, Nano Letters 14, 4715–4723 (2014).
- [69] J. Claudon, J. Bleuse, N. Malik, M. Bazin, P. Jaffrennou, N. Gregersen, C. Sauvan, P. Lalanne, and J.-M. Gérard, *Nature Photonics* 4, 174–177 (2010).
- [70] H. A. Atwater and A. Polman, *Nature materials* 9, 205–13 (2010).
- [71] A. Cazé, Emission, scattering and localization of light in complex structures : From nanoantennas to disordered media, Ph.D. thesis (2013).
- [72] A. Cazé, R. Pierrat, and R. Carminati, Photonics and Nanostructures-Fundamentals and Applications 10, 339–344 (2012).
- [73] E. Palik, Handbook of Optical Constants of Solids, Academic Press (1988).
- [74] R. Harrington, Field Computations by Moment Methods, IEEE Press (1992).
- [75] C. Moosmann, G. S. Sigurdsson, M. D. Wissert, K. Dopf, U. Lemmer, and H.-J. Eisler, Optics express 21, 594–604 (2013).
- [76] X. Brokmann, L. Coolen, M. Dahan, and J. Hermier, *Physical Review Letters* 93, 107403 (2004).
- [77] J. Wenger, B. Cluzel, J. Dintinger, N. Bonod, A.-L. Fehrembach, E. Popov, P.-F. Lenne, T. Ebbesen, and H. Rigneault, *Journal of Physical Chemistry C* 111, 11469–11474 (2007).
- [78] A. I. Chizhik, A. M. Chizhik, D. Khoptyar, S. Bär, A. J. Meixner, and J. Enderlein, Nano letters 11, 1700–3 (2011).
- [79] M. Ranjan Gartia, J. P. Eichorst, R. M. Clegg, G. Logan Liu, M. R. Gartia, and G. L. Liu, *Applied Physics Letters* 101, 023118 (2012).
- [80] R. Carminati, M. Nieto-Vesperinas, and J.-J. Greffet, Journal of the Optical Society of America A 15, 706 (1998).
- [81] L. Novotny and N. van Hulst, *Nature Photonics* 5, 83–90 (2011).

- [82] S. Y. Suck, S. Collin, N. Bardou, Y. De Wilde, and G. Tessier, *Optics letters* 36, 849–51 (2011).
- [83] T. Förster, Ann. Physics 2 (1948).
- [84] R. van Grondelle, J. Dekker, T. Gillbro, and V. Sundstrom, *Biochimica et Biophysica Acta* 1, 1187 (1994).
- [85] D. W. Piston and G.-J. Kremers, Trends in biochemical sciences **32**, 407–14 (2007).
- [86] W. R. Algar, H. Kim, I. L. Medintz, and N. Hildebrandt, Coordination Chemistry Reviews 263-264, 65–85 (2014).
- [87] J. Szöllosi, S. Damjanovich, and L. Mátyus, *Cytometry* **34**, 159–79 (1998).
- [88] V. Raicu and D. R. Singh, *Biophysical journal* **105**, 1937–45 (2013).
- [89] L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, and S. Zhu, Accounts of chemical research 46, 1462–73 (2013).
- [90] S. Zadran, S. Standley, K. Wong, E. Otiniano, A. Amighi, and M. Baudry, Applied microbiology and biotechnology 96, 895–902 (2012).
- [91] K. E. Sapsford, L. Berti, and I. L. Medintz, Angewandte Chemie 45, 4562–89 (2006).
- [92] B. Hötzer, I. L. Medintz, and N. Hildebrandt, Small 8, 2297–326 (2012).
- [93] S. Chanyawadee, R. Harley, M. Henini, D. Talapin, and P. Lagoudakis, *Physical Review Letters* 102, 077402 (2009).
- [94] S. Buhbut, S. Itzhakov, E. Tauber, M. Shalom, I. Hod, T. Geiger, Y. Garini, D. Oron, and A. Zaban, ACS nano 4, 1293–1298 (2010).
- [95] V. Vohra, G. Calzaferri, S. Destri, M. Pasini, W. Porzio, and C. Botta, ACS nano 4, 1409–16 (2010).
- [96] M. Baldo, M. Thompson, and S. Forrest, *Nature* **403**, 750–3 (2000).
- [97] B. Schuler and W. A. Eaton, Current opinion in structural biology 18, 16–26 (2008).
- [98] M. Massey, W. R. Algar, and U. J. Krull, Analytica chimica acta 568, 181–9 (2006).
- [99] M. Lunz, V. A. Gerard, Y. K. Gun'ko, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. S. Susha, A. L. Rogach, and A. L. Bradley, *Nano letters* 11, 3341–5 (2011).
- [100] J. Zhang, Y. Fu, and J. R. Lakowicz, The journal of physical chemistry C 111, 50-56 (2007).
- [101] M. Lessard-Viger, M. Rioux, L. Rainville, and D. Boudreau, Nano letters 9, 3066– 3071 (2009).
- [102] V. K. Komarala, A. L. Bradley, Y. P. Rakovich, S. J. Byrne, Y. K. Gun'ko, and A. L. Rogach, *Applied Physics Letters* 93, 123102 (2008).
- [103] M. L.-Viger, D. Brouard, and D. Boudreau, The Journal of Physical Chemistry C 115, 2974–2981 (2011).
- [104] P. Andrew, *Science* **290**, 785–788 (2000).

- [105] M. de Dood, J. Knoester, A. Tip, and A. Polman, *Physical Review B* 71, 115102 (2005).
- [106] T. Nakamura, M. Fujii, K. Imakita, and S. Hayashi, *Physical Review B* 72, 235412 (2005).
- [107] T. Nakamura, M. Fujii, S. Miura, M. Inui, and S. Hayashi, *Physical Review B* 74, 045302 (2006).
- [108] C. Blum, N. Zijlstra, A. Lagendijk, M. Wubs, A. P. Mosk, V. Subramaniam, and W. L. Vos, *Physical Review Letters* 109, 203601 (2012).
- [109] F. T. Rabouw, S. A. den Hartog, T. Senden, and A. Meijerink, Nature Communications 5, 1–6 (2014).
- [110] P. Ghenuche, J. de Torres, S. B. Moparthi, V. Grigoriev, and J. Wenger, Nano Letters 14, 4707–4714 (2014).
- [111] V. Faessler, C. Hrelescu, A. A. Lutich, L. Osinkina, S. Mayilo, F. Jäckel, and J. Feldmann, *Chemical Physics Letters* 508, 67–70 (2011).
- [112] F. Reil, U. Hohenester, J. R. Krenn, and A. Leitner, *Nano letters* 8, 4128–33 (2008).
- [113] A. Leitner and H. Reinisch, *Chemical physics letters* **146**, 320 (1988).
- [114] D. Courjon and C. Bainier, Le champ proche optique, Théorie et applications, Springer (2001).
- [115] E. Kretschmann and H. Raether, Z. Naturforsch. A 23, 2135 (1968).
- [116] A. Otto, Z. Physik **216**, 398 (1968).
- [117] R. H. Ritchie, E. T. Arakawa, J. J. Cowan, and R. N. Hamm, Phys. Rev. Lett. 21, 1530–1533 (1968).
- [118] T. Ebbesen, H. Lezec, H. Ghaemi, T. Thio, and P. Wolff, *Nature* **391**, 667 (1998).
- [119] A. Cuche, O. Mollet, A. Drezet, and S. Huant, Nano letters 10, 4566–70 (2010).
- [120] D. G. Zhang, X.-C. Yuan, A. Bouhelier, P. Wang, and H. Ming, *Optics letters* 35, 408–10 (2010).
- [121] L. Luan, P. R. Sievert, W. Mu, Z. Hong, and J. B. Ketterson, New Journal of Physics 10, 073012 (2008).
- [122] E. Alieva and V. Konopsky, *Optics Communications* **309**, 148–152 (2013).
- [123] D. Zhang, Q. Fu, M. Yi, X. Wang, Y. Chen, P. Wang, Y. Lu, P. Yao, and H. Ming, *Plasmonics* 7, 309–312 (2011).
- [124] S. A. Maier, *Plasmonics : Fundamentals and Applications*, Springer (2007).
- [125] R. Vincent and R. Carminati, *Physical Review B* 83, 165426 (2011).