

N° d'ordre : 3035

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par

Arnaud CHOVIN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie-Physique

Développement de réseaux de capteurs pour l'imagerie chimique de micro-environnements

Soutenue le 7 Octobre 2005

Devant la Commission d'examen formée de :

M. Jean-Pierre DESVERGNE	Directeur de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1	Président du Jury
M. Benoît LIMOGES	Chargé de Recherche CNRS, Université Paris 7	Rapporteur
M. Eric VIEIL	Professeur, INPG, Université Grenoble 1	Rapporteur
M. Christian AMATORE	Professeur, ENS-Université Paris 6	
M. Philippe HAPIOT	Directeur de Recherche CNRS, Université Rennes 1	
M. Alexander KUHN	Professeur, ENSCPB, Université Bordeaux 1	
M. Neso SOJIC	Maître de Conférence, ENSCPB, Université Bordeaux 1	Directeur de thèse

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire d'Analyse Chimique par Reconnaissance Moléculaire (ENSCP, Université Bordeaux 1). Je remercie M. Christian VIDAL, directeur du laboratoire jusqu'en 2003, ainsi que M. Alexander KUHN, qui lui a succédé dans cette tâche, pour leur accueil, leur soutien, et pour les excellentes conditions de travail dont j'ai bénéficié tout au long de ces années.

J'adresse mes remerciements les plus respectueux à M. Neso SOJIC, qui a dirigé et bonifié l'ensemble de mon travail de manière approfondie. Je le remercie pour la confiance qu'il a placée en moi. La qualité de ses conseils et sa persévérance au quotidien ont été pour moi une source vive et sans égal d'épanouissement personnel et professionnel. Je lui en suis extrêmement reconnaissant.

Je tiens à remercier sincèrement M. Benoît LIMOGES et M. Eric VIEIL de l'intérêt qu'ils ont apporté à mon travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je remercie également M. Christian AMATORE, M. Philippe HAPIOT et M. Jean-Pierre DESVERGNE d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. J'en suis très honoré.

Je suis particulièrement reconnaissant envers M. Laurent SERVANT pour sa motivation sans faille sur ce projet. Ses approches rigoureuses des aspects autant théoriques qu'expérimentaux de ce travail ont été essentielles pour fructifier les résultats. J'exprime aussi ma gratitude envers M. Philippe VINATIER et Mme Inka MANEK-HÖNNINGER pour leur apport indispensable dans la réalisation, respectivement, des dépôts de couches minces conductrices et de l'analyse de propriétés optiques. Je remercie également M. Hassan SAADAoui et M. Gilles PECASTAINGS pour m'avoir fait découvrir et exploiter le potentiel de la microscopie AFM à pointe conductrice. L'aide et la compétence de M. Michel LAHAYE m'ont également été précieuse pour la microscopie à microsonde Auger, et je l'en remercie.

J'adresse mes remerciements à l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques de l'Université Bordeaux 1 pour les soutiens financiers qui m'ont été accordés à deux reprises pour participer à des congrès internationaux. De même, je remercie la division de Chimie Analytique de la Société Française de Chimie pour l'attribution d'une bourse de participation aux Journées d'Electrochimie 2005.

J'exprime aussi ma gratitude envers M. le commandant Jean-Claude RENARD, de l'Ecole de Santé Navale à Bordeaux (ESSA), de m'avoir fait pleinement confiance en me donnant la

responsabilité d'enseigner la chimie comme vacataire au sein de son établissement. Je suis convaincu de tout le bon que m'a apporté cette tâche.

J'adresse un grand merci à M. Patrick GARRIGUE pour le soin particulier qu'il a apporté dans la préparation des échantillons et pour les nombreuses heures passées en microscopie électronique à balayage. Sa complicité, son contact chaleureux et sa bonne humeur naturelle sont le ciment d'une amitié durable. Je remercie vivement M. Nicolas MANO, Mlle Dina FATTAKHOVHA, M. Philippe DA COSTA et M. Sébastien SALLARD, post-doctorants, pour leur amitié forte et les moments de détente passés à leur côté. Le partage de leurs connaissances et de leurs vécus fut fort intéressant, et je les en remercie chaleureusement.

Je tiens à remercier sans réserve l'ensemble de tous les autres membres du laboratoire (Anne-Marie, Jean-Pierre, Mireille, Isabelle G. et Isabelle B., Valérie, Raphaël, Samia, Dina, Manuela, Emmanuel, Anne, Véronique, et bien d'autres). Pour la gentillesse et le soutien témoigné par chacun au quotidien, je leur adresse toute ma reconnaissance et mon amitié. Je n'oublie pas de remercier tous les étudiants qui se sont tour à tour pleinement investis sur ce projet, en contribuant à maintenir l'excellente entente au sein de l'équipe. Je remercie également M. Didier Campagne, de l'ENSCP, de son aide précieuse pour l'impression des manuscrits de cette thèse.

Enfin, mes remerciements ne seraient pas complets sans évoquer le soutien affectueux de mes parents, de mes sœurs et de mon frère, ainsi que de ma compagne Emilie. Je les en remercie sans limites.

Table des Matières

<i>Introduction générale</i>	3
<i>Chapitre 1 : Imagerie épifluorescente de la dynamique d'une couche de diffusion plane</i>	7
1. Introduction.....	8
2. Cartographies de couches de diffusion.....	9
2.1 Techniques d'analyse locale par balayage	10
2.1.1 Détection locale par une micro-sonde électrochimique	10
2.1.2 Détection locale par voie spectroscopique	13
2.2 Techniques d'imagerie globale	16
2.2.1 Approches basées sur l'absorbance ou l'effet mirage	16
2.2.2 Imagerie luminescente.....	19
3. Imagerie épifluorescente de profils de concentration	23
3.1 Méthode d'imagerie <i>via</i> un faisceau de fibres optiques	23
3.2 Paramètres influant sur la résolution spatiale	29
3.2.1 Influence de l'ouverture numérique	30
3.2.2 Influence de la concentration initiale.....	35
3.3 Etude dynamique des profils de concentration	41
3.4 Etude des écarts observés près de la surface de l'électrode	45
3.4.1 Réflexion par la surface de l'électrode ?	45
3.4.2 Effet mirage ?	46
3.4.3 Effet de filtre interne primaire ?	48
4. Conclusion.....	51
<i>Chapitre 2 : Développement d'un réseau de capteurs submicrométriques: application à l'imagerie par électrochimiluminescence</i>	53
1. Introduction	54
2. Développement d'un réseau de capteurs opto-électrochimiques.....	56
2.1 Ultramicroélectrodes, ensembles, réseaux	56
2.2 Capteurs opto-électrochimiques.....	60
2.3 Fabrication du réseau de capteurs opto-électrochimiques.....	63
2.3.1 Fabrication d'une structure ordonnée de nanopointes.....	63
2.3.2 Dépôt d'un film d'ITO	66
2.3.3 Isolation par dépôt d'une peinture électrophorétique.....	69
2.4 Caractérisations de surface du réseau	71
2.4.1 Composition de la surface étudiée par microsonde Auger	71
2.4.2 Caractérisation par AFM à pointe conductrice	73
2.5 Propriétés électrochimiques	76

2.5.1	Caractérisation par voltampérométrie cyclique	76
2.5.2	Caractérisation par électrochimiluminescence de surface	82
3.	Application à l'imagerie électrochimiluminescente à distance	88
3.1	Réaction électrochimiluminescente modèle : Ru(bpy) ₃ ²⁺ /tri- <i>n</i> -propylamine.....	90
3.1.1	Applications bioanalytiques	89
3.1.2	Imagerie quantitative à travers le réseau de capteurs submicrométriques	92
3.2	Imagerie électrochimiluminescente du peroxyde d'hydrogène.....	99
3.2.1	Détection par le système luminol/H ₂ O ₂	99
3.2.2	Effet du potentiel sur l'intensité d'électrochimiluminescence.....	101
3.2.3	Détection quantitative de H ₂ O ₂	103
4.	Imagerie en lumière blanche <i>via</i> le réseau de capteurs opto-électrochimiques.....	104
5.	Conclusion	106
 <i>Chapitre 3 : Développements de réseaux de nano-sondes optiques et applications.....</i>		109
1.	Introduction	110
2.	Fabrication et caractérisation	115
2.1	Etapes de fabrication	116
2.2	Caractérisation des nano-ouvertures.....	118
2.2.1	Images en microscopie électronique à balayage.....	118
2.2.2	Caractérisation par microscopie AFM à pointe conductrice	120
3.	Propriétés d'imagerie à distance et applications	123
3.1	Imagerie photoluminescente à travers le réseau.....	123
3.2	Modulation électrochimique de la photoluminescence.....	127
3.2.1	Démonstration du concept en chronoampérométrie.....	127
3.2.2	Réversibilité de la modulation rédox	130
4.	Propriétés optiques des nano-ouvertures en champ lointain.....	131
4.1	Description du montage expérimental	133
4.2	Distribution angulaire de la lumière transmise à travers un réseau.....	135
4.3	Analyse des propriétés de diffraction selon de la taille des ouvertures	138
5.	Conclusion	142
 <i>Conclusion générale</i>		145
 <i>Section expérimentale</i>		149
 <i>Annexe 1 : Propriétés des fibres optiques et des fibres d'imagerie</i>		165
 <i>Annexe 2 : Ru(bpy)₃²⁺</i>		171
 <i>Bibliographie</i>		181

Introduction générale

L'évolution de la chimie et de la physico-chimie analytique est orientée vers l'étude de systèmes de plus en plus complexes, tels que ceux rencontrés notamment dans le Vivant. Cette tendance « bio » est un axe fort de la recherche actuelle non seulement à cause de la demande sociétale importante, mais également à cause des extraordinaires défis que représentent les molécules, les structures et les processus biologiques. Cependant ces domaines requièrent des méthodes et des outils respectant souvent des critères assez sévères : sélectivité, résolution spatiale et temporelle, biocompatibilité, sensibilité, etc. Un second courant puissant qui vient d'ailleurs souvent nourrir le premier cité est tourné, depuis plusieurs décennies, vers ce qu'il est convenu d'appeler, les nanosciences. Cette course au « nano » ne doit cependant pas faire oublier que de nombreux processus ou questions physico-chimiques mais aussi biologiques se déroulent aussi bien à une échelle nanométrique que micrométrique. Il est donc essentiel de sonder ces 2 échelles simultanément de sorte à appréhender l'évènement dans sa globalité. Les approches désignées sous le terme générique de « microscopie à balayage de sonde locale » (microscopie à force atomique, microscopie électrochimique à balayage, microscopie à champ proche optique, etc.) ont déjà fourni des résultats exceptionnels dans presque tous les domaines expérimentaux. Une possibilité complémentaire est d'augmenter le flux d'informations recueillies tout en multipliant leur nature. Nous avons choisi d'explorer cette seconde voie en développant des réseaux de capteurs submicrométriques qui fonctionnent sur des principes différents.

L'ensemble de ce travail est tourné vers la conception et le développement de nouvelles approches combinant notamment l'électrochimie et l'optique pour réaliser l'imagerie chimique à distance de micro/nano-environnements. Ce but nous a conduit à ancrer ces recherches dans une démarche pluridisciplinaire, tant par les concepts et outils employés que par les applications attendues. Les applications potentielles sont orientées vers plusieurs domaines touchant l'électrochimie, la chimie bioanalytique et l'imagerie en champ proche optique. Avant de pouvoir arriver à des applications nouvelles dans les domaines de la biochimie ou de la biologie cellulaire, il est indispensable non seulement de caractériser en profondeur l'ensemble des outils développées, mais aussi de respecter un certain temps de maturation pour bien cibler les applications visées. De ce fait, comme dans ce travail nous nous situons pour le moment en amont, nous ne sommes pas encore au stade des applications purement biologiques ou cellulaires.

L'électrochimie et l'optique sont des sciences provenant de champs disciplinaires relativement éloignés. Les principes mis en jeu de nature différente. Dans ce travail, nous avons justement choisi de les combiner afin de les enrichir mutuellement. Les approches développées dans ce travail profitent du couplage entre ces 2 aspects, à travers l'utilisation de signal combinant l'électrochimie et l'optique, comme par exemple l'électrochimiluminescence ou la fluorescence rédox. Les stratégies d'imagerie décrites étant basées sur des outils invasifs, ces derniers doivent être miniaturisés à l'échelle du volume que l'on souhaite analyser et du processus qui s'y déclenche, en l'occurrence les couches de diffusion électrochimique ou les échantillons biologiques. Afin de répondre aux impératifs de résolution spatiale, nous utilisons des objets de dimension micrométrique. Il est surtout question dans ces travaux de faisceaux cohérents contenant des milliers de fibres optiques. Le diamètre global de cet outil est d'environ 300 μm . Nous démontrons au cours de ce mémoire comment se décline la notion de résolution spatiale de ce type d'outil en fonction de la technique d'imagerie qui s'y rapporte et des applications envisagées. Enfin, la performance dynamique de l'outil d'imagerie chimique doit être excellente, afin de pouvoir analyser finement les variations spatio-temporelles du processus étudié. Pour atteindre cet objectif, notre approche consiste à utiliser non pas une seule sonde que l'on balaye de point en point, mais plutôt un assemblage très dense de sondes enregistrant une grande quantité de signaux en parallèle. Les procédés d'imagerie employés devraient permettre en conséquence l'identification et la quantification simultanées d'une espèce chimique à différents endroits de l'échantillon, ainsi que sa réactivité chimique et sa répartition spatiale en fonction du temps.

Les résultats reportés dans ce mémoire se présentent en 3 chapitres distincts. Cependant une complémentarité importante existe entre ces 3 approches comme en attestent les nombreux recouvrements thématiques et conceptuels. Le chapitre 1 porte sur l'imagerie chimique d'un processus de diffusion plan. La méthode s'appuie sur les propriétés d'imagerie à distance d'un faisceau cohérent de fibres optiques disposé à la surface d'une macroélectrode. Les profils de concentration s'établissant à l'électrode sont cartographiés en fonction du temps par photoluminescence. Le second et le troisième chapitre concernent le développement d'outils originaux de détection opto-électrochimique réalisés à partir de faisceaux cohérents de fibres optiques. Le premier axe (Chapitre 2) est la réalisation d'un réseau ordonné d'ultramicroélectrodes transparentes. Les étapes de fabrication et de caractérisation de ce type de réseau sont détaillées, puis nous démontrons les potentialités de

ce dispositif en imagerie électrochimiluminescente. Dans l'autre axe d'activités (Chapitre 3), des réseaux de nano-ouvertures à champ proche optique ont été développés. Les propriétés en champ optique lointain ont été caractérisées, montrant un comportement optique radicalement éloigné de celui des réseaux d'ultramicroélectrodes transparentes. Des propriétés d'imagerie photoluminescente à distance ont également été démontrées dans le champ proche optique.

CHAPITRE 1 :

**IMAGERIE EPIFLUORESCENTE DE
LA DYNAMIQUE D'UNE COUCHE
DE DIFFUSION PLANE**

1. Introduction

L'établissement de couches de diffusion chimique est un phénomène dynamique se structurant notamment à l'échelle micrométrique ou submicrométrique. L'examen résolu dans le temps de telles hétérogénéités spatiales est la clé de la compréhension de nombreux phénomènes physico-chimiques. En biologie, les flux chimiques sont également d'une importance capitale puisqu'ils régulent le fonctionnement de nombreux processus cellulaires essentiels (neurotransmission, croissance axonale lors du développement du système nerveux, etc.).^[1,2] Un exemple illustrant leur importance est la communication intercellulaire, impliquant des changements locaux de concentration en ions ou molécules. Ces échanges sont localisés au niveau de la surface extérieure des cellules vivantes, entités de dimension micrométrique. La dynamique très rapide de ces flux, de l'ordre de la milliseconde, nécessite des techniques permettant le suivi en temps réel de ces fluctuations chimiques.^[3] De même, les réactions électrochimiques, les phénomènes de corrosion ou encore de catalyse hétérogène sont quelques exemples où l'échange de matière se produisant à une interface joue un rôle fondamental. En électrochimie, une importance essentielle repose sur les phénomènes de transport à l'interface électrode/électrolyte, assuré, selon les conditions expérimentales, par la diffusion, la migration ou la convection. Le plus souvent, les méthodes d'électroanalyse sont purement relatives à la mesure d'un courant, d'un potentiel ou d'une impédance. Dans le volume proche de la surface d'une électrode, les profils de concentration restent « transparents » pour l'expérimentateur, alors que paradoxalement ce sont eux qui imposent les variations de ces grandeurs observées au cours du temps. Le courant faradique est une mesure directe du gradient de concentration du composé électroactif à la surface de l'électrode. Sa mesure reflète la cinétique du processus à l'électrode (la cinétique du transfert de charge à l'interface, du transport de matière, des réactions homogènes éventuelles à proximité de l'électrode). La couche de diffusion contient nettement plus d'informations sur les processus se produisant en solution (par exemple, réaction chimique de l'espèce électrogénérée). En effet, les profils de concentration reflètent directement la réactivité et le transport des espèces impliquées. Cette connaissance est particulièrement essentielle pour élucider certains mécanismes électrochimiques complexes, que la simple mesure du courant ne permet pas toujours de clarifier. La détection de profils de concentration à une électrode doit être réalisée au moyen de méthodes analytiques qui soient sélectives et qui présentent une haute résolution spatiale et temporelle.

Dans ce premier chapitre, les travaux sont orientés vers le développement d'une nouvelle approche permettant de visualiser, dans sa globalité, la dynamique d'une couche de diffusion plane. Dans un premier temps, nous allons présenter, dans le contexte de l'électrochimie, les approches pertinentes qui ont été développées afin d'acquérir une information spatialement résolue sur des flux chimiques locaux. La plupart de ces stratégies repose sur l'électrochimie, la microscopie et la spectroscopie, ou des combinaisons entre ces techniques. Nous avons choisi de distinguer ces techniques suivant deux approches : celles par balayage d'une sonde locale et celles d'imagerie globale du phénomène. Chacune de ces techniques possède des avantages ainsi que des limitations, qui sont essentiellement liés au principe de la mesure et à la nature du phénomène étudié. Dans un second temps, nous présenterons l'approche que nous avons suivie pour sonder la dynamique diffusionnelle s'établissant au voisinage de la surface d'une électrode millimétrique. Le principe de notre méthode de détection repose sur la capture d'une série d'images de photoluminescence directement enregistrées à l'interface électrode/solution au moyen d'un faisceau cohérent de fibres optiques. Dans cette nouvelle approche, nous montrons que les profils de concentration peuvent être visualisés *in situ* avec une résolution temporelle à l'échelle de la milliseconde au voisinage d'une électrode. La résolution temporelle de cette méthode est bien adaptée à l'étude de la dynamique diffusionnelle se produisant au voisinage de l'électrode. L'originalité de notre apport est, d'une part, son mode d'acquisition en temps réel, et, d'autre part, son aptitude à sonder la totalité de la couche de diffusion. En effet, avec une seule image, l'ensemble de la couche de diffusion est visualisé à un instant donné. Par ailleurs, l'équipement et la conception du montage sont relativement simples. De plus, l'expérience n'exige qu'une seule mesure, contrairement aux techniques d'analyse locale par balayage. Le principe, les outils ainsi que les résultats obtenus sont exposés, en y intégrant les discussions sur les propriétés et les potentialités de cette méthode d'imagerie dynamique.

2. Cartographies de couches de diffusion

Les techniques d'exploration des profils de concentration peuvent être classées arbitrairement en deux grandes familles : approches ponctuelles ou approches globales. Dans le premier cas, un capteur électrochimique ou une sonde optique est utilisée afin de mesurer dans l'environnement immédiat de l'objet une concentration locale. La mesure du signal chimique est ensuite répétée en différents points de l'échantillon de sorte à

reconstruire le profil de concentration complet. Dans le second cas, la technique employée fournit la cartographie de l'ensemble du phénomène par une observation globale de la couche de diffusion.

2.1 Techniques d'analyse locale par balayage

2.1.1 Détection locale par une micro-sonde électrochimique

Les techniques par balayage d'une sonde locale sont parmi les plus répandues et les plus puissantes pour venir sonder directement une concentration chimique dans un micro-environnement. Elles reposent sur l'exploitation des propriétés remarquables des ultramicroélectrodes. Les ultramicroélectrodes sont par définition des électrodes dont au moins l'une des dimensions est d'ordre micrométrique.^[4-6] Les propriétés de ces électrodes sont tout à fait remarquables du fait de leur dimension, en particulier la réduction de la chute ohmique, les temps de réponse très rapides, ainsi que les régimes de diffusion particuliers donnant lieu à des courants stationnaires. Elles se présentent sous diverses géométries : disque, cylindre, bande, ainsi que sous forme de réseaux, ordonnés ou aléatoires, adressables ou interconnectés.^[7] La plus simple de ces configurations est le disque plan, fabriquée à partir d'une fibre de carbone, d'or ou de platine de diamètre variable. Dans cette géométrie, la couche de diffusion s'étend sur une distance qui ne représente au plus que quelques fois la taille de l'électrode elle-même. De ce fait, les ultramicroélectrodes permettent l'analyse électrochimique de flux locaux au sein de volumes micrométriques de l'ordre de grandeur du rayon de l'électrode. Du fait de leur résolution spatiale, elles apparaissent à la fin des années 1970 comme outils précurseurs pour effectuer des mesures électrochimiques *in vivo*.^[8-10] Parmi les très nombreuses applications dans des domaines extrêmement variés, on peut citer l'étude de l'exocytose de neurotransmetteurs, principalement de la famille des catécholamines.^[11-13] Elles ont ainsi permis de mieux comprendre ce phénomène de communication synaptique au niveau de cellules nerveuses,^[14] ou d'effectuer des mesures directes dans le cerveau de rat vivant.^[10, 15-17]

Avec l'émergence des techniques de balayage à champ proche, la combinaison du microscope à effet tunnel (STM) et des ultramicroélectrodes a initié le développement de la microscopie électrochimique à balayage (ou SECM).^[18-21] Cette approche consiste à enregistrer, lors d'un balayage de l'échantillon (ou substrat), le changement de réponse

électrochimique ponctuelle de l'ultramicroélectrode. Le signal mesuré est usuellement soit le courant faradique soit le potentiel. L'« image électrochimique » du substrat est obtenue en traitant l'ensemble des mesures ponctuelles pour en reconstruire la cartographie. Les différentes approches utilisant les ultramicroélectrodes comme micro-sondes électrochimiques locales sont présentées ci-après à travers quelques exemples significatifs.

On peut distinguer globalement deux principes de fonctionnement du SECM suivant la nature de l'échantillon analysée. Dans le mode ampérométrique, le courant de l'ultramicroélectrode varie en fonction de la topographie et de la réactivité électrochimique du substrat.^[22] Si une espèce sous forme oxydée est présente initialement en solution, l'ultramicroélectrode portée à un potentiel qui permet de la réduire crée localement une couche de diffusion stationnaire à sa surface. Cependant, cette couche de diffusion va être perturbée à l'approche de la surface du substrat. Si la zone d'approche est isolante, la diffusion est bloquée et le courant de pointe décroît. Par contre, si elle est conductrice et portée à un potentiel oxydant, le courant va être amplifié du fait du recyclage de l'espèce oxydée. Le suivi en continu de ces réponses est assuré par un mode « feedback » qui donne accès à la cartographie de la réactivité électrochimique de l'interface substrat/solution. La topographie du relief de la surface est assurée par l'enregistrement de la distance substrat/ultramicroélectrode. Suivant les configurations employées, cette technique permet d'étudier le transport de matière, la cinétique ou le mécanisme chimique de processus se produisant à l'électrode ou à son voisinage. L'ultramicroélectrode peut être génératrice ou collectrice, et dans les différents cas, la combinaison de deux signaux ampérométriques, provenant de l'ultramicroélectrode et du substrat (mode générateur/collecteur) est une approche plus complexe mais présentant souvent une meilleure sensibilité.^[23,24] La seconde approche du SECM repose sur l'utilisation d'une ultramicroélectrode comme pseudo-référence locale ou électrode sélective ionique. La réponse est alors associée aux changements de potentiel. Ce mode potentiométrique est adapté à la détection de profils de concentration, car la mesure est passive. En effet, elle ne consomme pas l'analyte, et donc ne cause pas de perturbations dans la structuration de la couche de diffusion.^[25] Cette propriété est en revanche un écueil en mode ampérométrique. Dans ce cas, la concentration locale que l'on mesure est affectée puisque le composé à détecter est également consommé par la réaction rédox à l'ultramicroélectrode. Cet effet perturbateur est limité si la dimension de l'ultramicroélectrode est beaucoup plus petite que l'épaisseur de la couche de diffusion de l'électrode. Dans ce cas, la consommation à l'ultramicroélectrode de l'espèce diffusante

n'interfère pas significativement sur la mesure de sa concentration locale.^[26] De nombreux phénomènes de transport ont été étudiés par sondes potentiométriques, tels que les profils de concentration d'ions K^+ , NH_3^+ ou Zn^{2+} proches d'une surface,^[27] ou encore les gradients locaux de pH à différentes interfaces modèles.^[28] La méthode a été étendue à l'étude de cinétiques de réactions électrochimiques à des interfaces liquide/liquide.^[29-31] Cependant, la limitation du mode potentiométrique est le temps de réponse relativement long causé par le délai pour atteindre l'équilibre rédox de la micromembrane sélective.

Différentes approches possédant des similitudes avec la SECM ont été appliquées au suivi de profils de concentrations s'établissant sur une électrode de taille conventionnelle.^[18, 32] Les capacités de cette méthode ont aussi été exploitées par exemple au suivi de l'électrodéposition de métal dans des microcavités.^[33, 34] On peut également citer les travaux sur les mécanismes complexes impliquant des réactions de dismutation ou de catalyse rédox,^[25, 35, 36] ou encore les effets de la convection spontanée sur la diffusion.^[37] Récemment, l'exemple d'utilisation d'une nanoélectrode ampérométrique a permis d'étudier finement la convection spontanée dans la couche de diffusion hémisphérique d'une ultramicroélectrode disque.^[38]

Dans l'ensemble, les stratégies de cartographie électrochimique répondent très bien aux impératifs de résolution temporelle (milliseconde) et spatiale (micromètre) nécessaire pour mener une analyse fine des propriétés ou du transport dans des micro-environnements variés : monocouches auto-assemblées, canaux ioniques, polymères, échantillons biologiques, etc.^[39, 40] On peut citer ici quelques autres exemples typiques d'applications prometteuses de la microscopie électrochimique à balayage. La topologie et la réactivité de réseaux microfabriqués d'ultramicroélectrodes peuvent être contrôlées grâce à l'action d'une ultramicroélectrode unique.^[7, 41] D'autres exemples qui témoignent des performances de cette méthode sont la détection de flux chimiques à travers des membranes nanoporeuses artificielles ou biologiques,^[42, 43] ou récemment la capture de nanoparticules.^[44] La cellule vivante est également un substrat très étudié maintenant du point de vue des transferts de charge essentiels à son métabolisme ou à son activité enzymatique.^[45, 46] Des profils de concentration d'espèces consommées ou libérées par des cellules ont aussi été mesurés.^[47] Les applications se multiplient maintenant par le couplage avec d'autres techniques variées d'analyse, telle que la microscopie à effet tunnel ou à force atomique,^[48-50] la microbalance à quartz,^[51] l'électrochimiluminescence,^[52] la microscopie confocale,^[53] la fluorescence de

molécule unique,^[54] etc. L'avantage attendu de ces innovations porte non seulement sur la résolution spatiale, mais également sur l'accès à une information additionnelle, d'ordre topographique ou spectroscopique.

2.1.2 Détection locale par voie spectroscopique

D'autres schémas de détection reposent sur des analyses optiques ou spectroscopiques au voisinage d'une électrode. Le principe est toujours celui d'une mesure locale, maintenant de nature optique ou spectroscopique, qui est répétée en chacun des points de sorte à couvrir l'ensemble de la zone d'exploration. Les fibres optiques sont des outils analytiques performants permettant de réaliser une analyse spectroscopique locale, principalement par fluorescence ou par diffusion Raman.^[55] En effet, comme le trajet du faisceau laser est guidé par la fibre optique, il en résulte différents avantages en terme de potentiel analytique. Un gain majeur est lié à la flexibilité du parcours lumineux, qui permet d'acheminer directement l'excitation au coeur d'un milieu d'étude qui sera distant et inaccessible pour les microscopes et spectromètres conventionnels. De plus, du fait de la dimension micrométrique des fibres optiques, cette excitation est ainsi concentrée à la sortie de la fibre au niveau d'un endroit précis de l'échantillon. Cela induit localement une émission lumineuse qui est liée aux propriétés de la molécule à mesurer dans la zone illuminée. L'information spectroscopique est alors collectée soit par la même fibre excitatrice, soit par un assemblage de plusieurs fibres collectrices. Pour simplifier, il y a principalement deux configurations qui sont employées. La première est le mode à fibre unique (mode monofibre), où une même fibre guide la lumière excitatrice vers l'échantillon et collecte la lumière émise ou diffusée en réponse à l'excitation. Dans la seconde configuration (mode multifibre), l'une des fibres transporte l'excitation et une ou plusieurs autres fibres collectent le signal généré. L'efficacité optique (efficacité de l'illumination et efficacité de la collecte de lumière) de ces diverses configurations mono- ou multifibre a été étudiée expérimentalement^[56,57] et théoriquement.^[58-62] Le schéma le plus répandu se compose de deux fibres optiques parallèles et proches l'une de l'autre, l'une étant excitatrice et l'autre collectrice. L'intérêt de cette géométrie simple est lié au recouvrement entre la zone d'excitation et la zone de détection qui peut être optimisé, notamment grâce aux couplages avec des microlentilles ou d'autres dispositifs de collimation optique.^[63-65]

Les sondes spectroscopiques basées sur les fibres optiques ont été appliquées pour la détection neurobiologique *in vivo* [66,67] ou la mesure confinée au sein de dispositifs spectroélectrochimiques. [68,69,70] Elles sont par ailleurs employées au développement extraordinairement varié de capteurs et biocapteurs optiques (cf. annexe 1). [71,72] La résolution spatiale est bien évidemment un point fondamental dans le développement des sondes et capteurs optiques. Cet aspect connaît depuis peu une attention tout particulière, avec le perfectionnement de méthodes pour concevoir des nanosondes et des nanocapteurs à fibres optiques pour la mesure de flux chimiques dans les milieux biologiques. [73-75] L'essor de ce domaine est guidé par le besoin de méthodologies nouvelles, sélectives et spatialement résolues pour la bioanalyse, notamment au niveau intracellulaire. [76,77] Les nanosondes optiques sont essentiellement développées pour la microscopie à champ proche optique, qui est en quelque sorte l'analogue optique de la microscopie électrochimique à balayage. Ce domaine sera largement présenté au cours du chapitre 3 de cette thèse.

Parmi les techniques d'analyse optique locale à balayage d'échantillon figurent également les méthodes de microscopies laser confocales. Elles reposent sur la notion d'imagerie spectrale d'échantillon qui est basée sur un dispositif hybride microscope/spectromètre, dont le premier prototype fut décrit en 1975. [78] Par principe, la microscopie ne requiert pas l'utilisation d'un outil de détection invasif comme une fibre optique par exemple. Un volume d'extension micrométrique est sondé en mode confocal. L'information spectroscopique est ainsi enregistrée localement. La mesure est ensuite répétée en différents points de sorte à couvrir l'ensemble de l'échantillon. Le mode confocal est réalisé en plaçant un trou confocal de dimension ajustable devant le détecteur, au niveau du plan focal image du microscope. Le signal lumineux provenant du micro-domaine analysé est alors collecté sous une condition d'ouverture particulière qui affine la zone d'échantillonnage spectroscopique à un « volume confocal ». [79-81] Ce véritable filtre spatial permet d'éliminer le signal provenant des volumes hors du plan focal. La résolution spatiale dépend du volume confocal qui est fonction du grossissement de l'objectif, de son ouverture numérique et de la dimension du trou confocal. Typiquement, la microscopie confocale permet de sonder un échantillon à l'échelle de quelques micromètres. En variant la profondeur du plan confocal, l'analyse peut de plus être réalisée dans les trois dimensions.

La microspectrométrie Raman et la microscopie de fluorescence sont les plus largement employées en mode confocal. L'avantage de la spectroscopie Raman est la sélectivité intrinsèque, puisque l'on enregistre le spectre de diffusion Raman, donc les différentes bandes vibrationnelles caractéristiques de l'espèce chimique se trouvant dans le volume confocal. La microspectrométrie Raman est aussi bien adaptée à l'étude *in situ* de phénomènes de surface^[82] qu'à la caractérisation d'espèces en solution. Les signaux étant peu intenses, les temps d'acquisition sont parfois rédhibitoires dans certaines applications. Cependant, le phénomène de résonance Raman qui donne lieu à une amplification du signal, peut être utilisé pour améliorer la sensibilité de détection. Cela offre la possibilité d'étudier des solutions faiblement concentrées. La caractérisation de processus interfaciaux par microscopie confocale Raman est l'une des applications particulièrement révélatrice du potentiel de cette méthode. A titre d'exemples, les processus de réduction du benzène sur une électrode de platine,^[83] d'électrodéposition de cuivre^[79] ou de corrosion d'un alliage d'aluminium dans une solution d'ion chromate^[84] ont pu être étudiés *in situ*. La caractérisation électrochimique et la localisation des sites électroactifs d'un réseau ordonné d'électrodes submicrométriques ont montré une autre piste intéressante d'application pour l'imagerie Raman confocale.^[80] En imagerie, l'obtention de profils de concentration d'un sel de lithium transporté dans un électrolyte polymère de batterie a été décrite.^[85,86] Pour l'étude de couches de diffusion en milieu aqueux, la microspectroscopie Raman a permis de prouver, pour la première fois, par observation directe, le mécanisme d'une réaction de dismutation qui ne pouvait être mise en évidence par des mesures purement électrochimiques.^[87,88] Une autre application sans cartographie de surface a également été présentée pour la caractérisation structurale d'intermédiaires électrochimiques à courte durée de vie.^[89]

La microscopie fluorescente confocale est une technique de routine pour les échantillons biologiques.^[81, 90-92] En effet, ces derniers peuvent facilement être marqués spécifiquement par une sonde fluorescente. L'atout principal provient de la résolution spatiale du mode confocal, ainsi que du « sectionnement virtuel » du volume confocal qui évite la destruction de l'échantillon par intrusion mécanique. Grâce à la résolution spatiale dans les trois directions de la microscopie confocale, le profil de concentration d'un fluorophore a par exemple été mesuré expérimentalement à travers une micromembrane polymère échangeuse d'ions en suivant *in situ* un profil de fluorescence.^[93] La cartographie en trois dimensions d'un gradient de pH par fluorescence confocale a été récemment mise au point pour la caractérisation spatiale de l'électroactivité d'une microélectrode ou d'un

ensemble désordonné de nanotubes de carbone.^[94, 95] Pour les études à l'interface électrode/électrolyte, la technique de microspectrométrie fluorescente a été relativement récemment exploitée. Pour finir, on peut également citer le développement d'une technique hybride microscopie confocale/microscopie à microsonde électrochimique.^[53]

2.2 Techniques d'imagerie globale

L'analyse d'interface électrode/électrolyte et la détermination de profils de concentration peuvent être réalisées *via* des techniques alternatives d'imagerie optique couplée à des dispositifs électrochimiques particuliers. Le principe des ces méthodes est à l'opposé des approches d'échantillonnage local par balayage précédemment décrites. En effet, la perturbation électrochimique ou optique n'est plus locale mais, au contraire, l'échantillon est soumis à une perturbation globale. La réponse complète est résolue spatialement afin d'établir la cartographie des hétérogénéités du processus. Deux méthodologies différentes sont décrites dans la suite. La première est basée sur la spectroélectrochimie qui utilise principalement des mesures d'absorbance ou d'indice de réfraction pour retracer des changements locaux de concentrations.^[96,97] La seconde est basée sur les méthodes d'imagerie globale par luminescence chimique afin de caractériser l'activité électrochimique d'une interface. Il s'agit, en particulier, de l'utilisation de la fluorescence et de l'électrochimiluminescence.

2.2.1 Approches basées sur l'absorbance ou l'effet mirage

Nous concentrons ici essentiellement notre propos sur certains travaux basés sur des dispositifs spectroélectrochimiques.^[96] Le principe est de sonder la couche de diffusion d'une électrode en faisant traverser le compartiment de solution où elle s'établit par un rayon lumineux collimaté. Dans ces expériences, la lumière ne perturbe en aucune façon le processus électrochimique. Pour suivre les conséquences d'une perturbation électrochimique, le signal optique choisi est celui qui est sensible aux fluctuations d'une propriété physico-chimique locale de la solution dans le volume perturbé. La propriété la plus aisée à mesurer et, par conséquent, la plus répandue dans les méthodes spectroélectrochimiques est l'absorbance dans le domaine UV/visible.^[98] Dans de nombreuses situations, une variation de l'absorbance renseigne sur les fluctuations locales

des concentrations d'espèces qui sont absorbantes à la longueur d'onde du rayon collimaté ; ces espèces apparaissant ou disparaissant à proximité de l'électrode. L'analyse optique de la perturbation électrochimique est instantanée, ce qui permet de détecter temporellement une concentration surfacique ou une cinétique de réaction à la surface d'une électrode.^[99, 100] Dans les techniques en transmission, les plus usuelles, un faisceau laser traverse perpendiculairement une électrode transparente. Dans ce cas, la mesure de l'absorbance est globale et ne tient pas compte des hétérogénéités locales des concentrations, dues à la structuration de la couche de diffusion. Cela signifie que la méthode est incapable de fournir le profil de concentration spatialement résolue en fonction de la distance à l'électrode. De ce fait, l'analyse spatio-temporelle du transport de matière par diffusion plane est accessible seulement avec une configuration où le faisceau laser est collimaté parallèlement à la surface de l'électrode.^[101] Le profil d'absorbance d'une espèce générée à une macroélectrode^[102, 103] ou à une ultramicroélectrode^[104] a ainsi permis de visualiser sélectivement la construction de son profil de concentration complet en fonction de la distance à l'électrode. Dans ces travaux, la résolution spatiale atteignait 5 μm . Ce schéma a aussi été appliquée à la détermination de cinétique de réaction d'intermédiaires rédox par l'image de couche de diffusion plane,^[105, 106] ou de diffusion hémisphérique.^[107] Un procédé similaire est basé sur la diffraction des rayons lumineux causée par la proximité de la surface de l'électrode. Il a été envisagée pour étudier la distribution de chromophore électrogénéré possédant une courte durée de vie, par conséquent ne diffusant pas à plus de 5 ou 10 μm de l'électrode.^[108, 109] Cette seconde approche n'a pas été appliquée à la détermination de profils complets concentration/distance à l'électrode, la diffraction du trajet optique ne se produisant que dans les dix premiers micromètres de solution immédiatement adjacente à l'électrode.

Des méthodes spectroélectrochimiques basées sur l'imagerie d'absorbance ont été appliquées aux phénomènes de diffusion ionique dans des membranes polymères déposées sur une électrode. L'intérêt majeur est de disposer d'une preuve directe des profils de concentration internes dans les membranes, et de pouvoir optimiser les performances des capteurs potentiométriques. Un premier exemple, similaire au montage précédent mais basée sur la photométrie a été développé pour suivre en temps réel l'équilibre potentiométrique d'une membrane PVC sélective aux ions nitrite.^[110] Le profil de concentration transverse du récepteur métalloporphyrinique des ions nitrite était tracé en fonction du temps, démontrant l'inhomogénéité de la distribution du ionophore au sein de la membrane dans le sens de la direction du flux ionique. Plus récemment une autre méthode d'imagerie spectro-

potentiométrique a été appliquée pour visualiser le transport dans une membrane en concomitance avec une mesure de potentiel transitoire.^[111] La méthode est capable de visualiser *in situ* la distribution spatiale d'un chromoionophore sensible au pH, grâce à l'image temporelle d'un profil d'absorbance réalisé dans la membrane. La résolution spatiale et la sensibilité de cette approche ont depuis été améliorées.^[112, 113]

Une toute autre approche d'analyse est basée sur la mesure de l'indice de réfraction du milieu. La configuration est similaire à la méthode basée sur l'absorbance, où le faisceau laser est parallèle à l'électrode. Or l'indice de réfraction ne contient pas d'informations spectrales spécifiques, comme cela peut être le cas de l'absorbance ou de la fluorescence. En revanche, des inhomogénéités de température ou de concentration peuvent induire une fluctuation de l'indice de réfraction. La technique la plus élémentaire pour enregistrer cette fluctuation spatiale durant une perturbation électrochimique est l'interférométrie.^[114] Dans cette technique, un faisceau lumineux sonde et un faisceau de référence traverse un chemin optique semblable. Seul le faisceau sonde est parallèle à la surface d'une électrode, et il est combiné optiquement à la sortie de la cellule avec le faisceau référence pour créer un motif d'interférence. Un gradient de concentration s'établissant à la surface d'une électrode induit un gradient d'indice de réfraction perpendiculairement à la surface de l'électrode. Lorsque ce phénomène se produit sur le trajet du faisceau sonde, l'image interférométrique est fortement dégradée. Un traitement spécifique du changement occasionné permet alors de reconstruire le profil concentration/distance à l'électrode.^[115] Les exemples de la littérature montrent que cette technique est maintenant obsolète, ayant été rapidement restreinte du fait des limitations expérimentales dues à l'absence de sélectivité et à la très faible sensibilité de la mesure. Cette technique est encore utilisée pour l'étude du transport électrochimique dans les solutions très concentrées, où la mesure par absorbance est elle impossible du fait de la dépendance non linéaire avec la concentration. L'un des rares exemples récents de l'exploitation de l'interférométrie pour visualiser une couche de diffusion concerne une réaction de réduction dans un solvant organique.^[116] L'interférométrie est par ailleurs encore utilisée pour la biodétection sur guides d'ondes.^[117]

Une autre technique beaucoup plus courante, basée sur le même effet de gradient d'indice de réfraction, est décrite dans la littérature sous le nom de « spectrométrie mirage » ou déviation de chemin optique. En effet, il est connu que la lumière ne se propage pas de façon rectiligne dans les milieux où l'indice de réfraction est inhomogène. Ce phénomène

est l'« effet mirage ».^[118,119] Il a été activement appliqué et évalué pour déterminer des gradients de concentration.^[120-122] Un exemple récent montre par exemple le couplage de la spectrométrie mirage avec la voltampérométrie cyclique pour suivre quantitativement les mouvements ioniques dans un électrolyte binaire lors d'une réaction à l'électrode.^[118] D'autres applications électroanalytiques sont réalisées en exploitant cet effet. L'analyse de flux ioniques lors du stockage de charges dans des films électroactifs,^[123-126] l'étude de réactions de transfert de charges aux électrodes^[127] ou le suivi d'un processus d'électrodéposition de métal^[128] en sont les principaux exemples. Dans une autre approche un peu différente, une mesure d'indice de réfraction dans des gels a récemment été réalisée pour étudier la distribution d'espèces chimiques dans ces milieux diffusifs.^[129]

2.2.2 Imagerie luminescente

La luminescence désigne l'émission de lumière par une substance chimique et qui ne soit pas d'origine thermique. Pour générer un phénomène de luminescence, une molécule doit nécessairement être portée à un état excité. La formation d'un état excité résulte d'un processus d'absorption d'énergie qui affecte le nuage électronique d'une molécule initialement à l'état fondamental. Selon ses propriétés et son environnement, la molécule à l'état excité peut suivre diverses voies de relaxation énergétique. Dans les cas où la relaxation a lieu par émission de lumière, le processus est dit luminescent. Le terme « luminescence » se décline en fonction du processus qui a conduit à la formation de l'état excité. Le tableau 1 résume les principaux types de luminescence en fonction du mode d'excitation de la molécule.^[130] Dans cette liste non exhaustive, nous portons particulièrement notre attention sur l'électrochimiluminescence et la photoluminescence. En effet, ce sont principalement ces phénomènes qui ont donné lieu à des applications particulières pour l'imagerie d'hétérogénéités spatiales observées en électrochimie. La nature des dispositifs est variée selon l'application envisagée, mais dans le cadre de ce chapitre, les techniques présentées fonctionnent en mode d'illumination globale. Elles échantillonnent la surface ou la couche de diffusion dans son intégralité. C'est pourquoi on les distingue nettement des méthodes spectroscopiques basées sur le microscope confocal, présenté au paragraphe 2.1.2. Le dispositif d'acquisition digitale de l'image est le plus souvent un microscope associé à une caméra à couplage de charges (CCD). Il doit disposer d'une résolution spatiale et temporelle suffisante afin de cartographier les processus électrochimiques en temps réel.

Types de luminescence	Mode d'excitation
Photoluminescence (Fluorescence, Phosphorescence)	Photons
Sonoluminescence	Ultrasons
Electroluminescence	Champ électrique
Radioluminescence	RX, Rayonnement γ
Chimiluminescence	Réaction chimique
Bioluminescence	Réaction enzymatique
Electrochimiluminescence	Réaction électrochimique

Tableau 1 : Principaux types de luminescence.

Le terme électrochimiluminescence décrit les processus aboutissant à l'émission de lumière suite au transfert électronique au voisinage de la surface d'une électrode. Dans ce type d'expérience, la lumière peut être perçue comme un « produit » de la réaction électrochimique. L'état excité émetteur de la luminescence est donc formé suite à la réaction électrochimique. L'électrochimiluminescence est une méthode très séduisante pour visualiser directement l'électroactivité de surface d'une électrode. En effet, la distribution de la lumière électrogénérée reflète précisément la distribution de la densité de courant.

Comme l'intensité d'émission électrochimiluminescente en une zone particulière de l'électrode est proportionnelle à la densité de courant locale, la mise au point d'un montage pour l'observation directe de l'électrochimiluminescence a permis de caractériser des densités non uniformes de courant, avec une résolution spatiale micrométrique.^[131] Une méthode dynamique a permis de mettre en évidence la distorsion d'un régime de diffusion plane à une macroélectrode.^[132] En effet, des effets de bords ont pu être visualisés près de la périphérie de l'électrode, dus aux contributions sphériques de la diffusion aux temps longs. La distribution spatiale des sites électroactifs d'électrodes de carbone hétérogènes et d'électrodes composites a également été visualisée par cette technique.^[133-135] Elle fournit une vue microscopique directe des variations locales de cinétique de transfert d'électrons du à la microstructure hétérogène de l'électrode. La distribution spatiale des sites de transfert d'électron d'une ultramicroélectrode à fibre de carbone a été caractérisée, en utilisant le luminol ou le complexe ruthénium(tris-bypiridine) comme indicateur électrochimiluminescent.^[136] L'influence des états de charge par prétraitement électrochimique sur l'architecture chimique et l'électroactivité de l'ultramicroélectrode était également

analysée.^[137] L'imagerie électrochimiluminescente basé sur les propriétés du diphenylantracène^[138] est une voie qui a permis de révéler la géométrie de microélectrodes de forme totalement irrégulière, ou des densités de courant non uniformes d'une microélectrode.^[139, 140] Appliquée à l'imagerie de surface, l'électrochimiluminescence est une méthode très pertinente pour corrélérer la microstructure de la surface avec les propriétés électrochimiques locales. Des applications originales en imagerie ont été décrites pour le suivi de processus de surface, comme par exemple l'électrodéposition de polymère,^[141] ou bien la microcristallisation à la surface d'une électrode d'un sel perylénique.^[142] L'électrochimiluminescence peut être également utilisée pour caractériser spatialement les propriétés de transport au niveau d'un réseau ordonné d'ultramicroélectrodes.^[143]

Une autre technique importante pour étudier la surface d'une électrode est la photoélectrochimie. Elle est basée sur la mesure du photocourant d'une électrode induit par une illumination extérieure. La photoélectrochimie peut être vue dans son principe comme l'effet inverse de l'électrochimiluminescence. La lumière prend part au mécanisme électrochimique en agissant en tant que « réactif ». Elle porte, par voie photochimique, une molécule à l'état excité qui sert d' « intermédiaire » dans le mécanisme électrochimique. La photosensibilisation de réactions électrochimiques est un domaine assez diversifié, avec des applications essentiellement en bioélectrochimie pour y induire des transferts d'électrons,^[144] ainsi que pour la conversion d'énergie solaire.^[145] Une thématique très représentée dans la littérature qui recoupe ce dernier domaine est celle des électrodes enrobées d'un film polymère polyélectrolyte (notamment le Nafion) où sont piégés des photosensibilisateurs comme le ruthéniumtris(bipyridine).^[146] Un seul exemple de mesures photoinduites, concernant la caractérisation de l'électroactivité d'une électrode, est rappelé ici même si elle repose plus sur une technique à balayage. Le principe est de cartographier la distribution du photocourant local crée par sur une électrode semi-conductrice à l'endroit précis où se concentre un faisceau laser.^[147] La méthode est restreinte aux seuls matériaux d'électrode semi-conducteurs.^[148]

Les méthodes d'imagerie globale de la surface d'une électrode utilisent également des approches basées sur la fluorescence et le phénomène Raman. L'échantillonnage optique se fait directement sur l'ensemble de la surface ou dans la couche de solution interfaciale prises dans sa globalité. Ces techniques d'imagerie récentes ont le plus souvent maintenant recours à des analyseurs de longueurs d'ondes très efficaces, comme les filtres réglables à

cristaux liquides, qui sont généralement couplés à des détecteurs CCD performants en terme de résolution spatiale et temporelle. L'imagerie Raman spatialement résolue est une technique essentiellement employée pour la cartographie bidimensionnelle d'une propriété structurale d'une surface d'électrode (adsorption, corrosion, monocouche auto-assemblée, etc.). Le développement des spectromètres d'imagerie Raman couplé à un mode d'illumination global est assez récent. Les aspects technologiques sont reportés dans une revue récente, où est également abordés la comparaison avec les méthodes à balayage (paragraphe 2.1.2).^[149] Pour ne citer que quelques exemples, l'imagerie Raman a été utilisée pour cartographier la morphologie d'électrode à surface rugueuse ou l'architecture de matériaux polymères.^[82,150] Un autre exemple d'imagerie Raman reporte la caractérisation de micro-hétérogénéités d'une électrode de carbone en suivant la distribution de surface d'une rhodamine physisorbée.^[151] En cartographie de fluorescence, à la différence de l'imagerie Raman, une molécule sonde extérieure doit le plus souvent être incorporé à la surface afin d'acquérir l'image de la nature chimique de l'échantillon.^[152] Un exemple élégant montre une stratégie de caractérisation de la distribution de groupes fonctionnels sur une fibre de carbone utilisée pour le greffage covalent d'enzymes, avec une résolution spatiale submicrométrique.^[153] La densité des fonctionnalités de surface était également comparée à la densité de courant obtenue par l'électrochimiluminescence (voir plus haut).^[136] Le transport ionique par migration a par exemple été analysé dans des cas spécifiques d'interfaces électrode/film organique ou dans des polymères conducteurs.^[154,155] Récemment, le premier exemple d'imagerie de fluorescence d'un film contenant une enzyme a permis d'étudier l'influence de l'environnement chimique de la matrice d'immobilisation sur l'activité biocatalytique de l'enzyme.^[156] L'imagerie par fluorescence n'est pas restreinte à la seule analyse de surface ou de film, mais peu s'étendre au sondage de couches de diffusion. Soit l'espèce électrogénérée diffusante possède elle-même une propriété de fluorescence, soit elle réagit dans la couche de diffusion avec un agent fluorescent ajouté à la solution. Ce principe a été exploité pour visualiser la réduction de l'eau à une électrode, en créant localement un pH basique qui modifie l'émission de la fluorescéine dissoute en solution.^[157] Il a également permis d'obtenir l'image de la réduction d'oxygène ou de formation d'un oxyde à une interface,^[158,159] ou encore la carte des gradients de pH individuels générés par un réseau d'ultramicroélectrodes.^[160] Un dispositif spectroélectrochimique en transmission a été développé très récemment, permettant de visualiser par fluorescence la présence d'oxyde nitrite simultanément dans des cellules vivantes et dans le milieu extracellulaire.^[161]

3. Imagerie épifluorescente de profils de concentration

3.1 Méthode d'imagerie *via* un faisceau de fibres optiques

Dans cette partie du travail de thèse, notre but est de développer une nouvelle méthode globale permettant de sonder la dynamique diffusionnelle qui s'établit au voisinage d'une électrode millimétrique. Dans cette étude, nous avons exploité des concepts, techniques et outils provenant de différents champs disciplinaires : électrochimie, fibre optique, photoluminescence et imagerie. Notre méthode repose sur l'imagerie *in situ* des profils de concentration électrochimiques à l'interface électrode/solution, par la photoluminescence guidée à travers un faisceau cohérent de fibres optiques. Les propriétés des fibres optiques et des faisceaux d'imagerie sont rappelées dans l'annexe 1. Le montage expérimental est présenté schématiquement sur la figure 1. La face distale d'un faisceau cohérent de 6000 fibres optiques est positionnée perpendiculairement à une macroélectrode disque en contact direct avec sa surface. La surface de l'électrode est dans le plan XY et la face distale de la fibre est perpendiculaire, c'est-à-dire dans le plan YZ. L'ensemble électrode/faisceau est plongé dans une solution d'électrolyte support contenant une molécule sonde luminescente, 2,2'-tris(bipyridine) ruthénium(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$).

Ce complexe de métal de transition a été choisi car il possède un fort rendement quantique de photoluminescence, en solution aqueuse et à température ambiante.^[162] La structure électronique de cette molécule et ses propriétés photophysiques sont reportées dans l'Annexe 2 de ce mémoire. Il est toutefois important de préciser ici la nature de l'état excité responsable de l'émission de lumière. Il est formé suite à la promotion d'un électron d'une orbitale t_{2g} localisée sur l'ion métallique vers une orbitale π^*_L associée aux ligands bipyridine, donnant lieu à une transition de transfert de charge métal-ligand (MLCT). Du fait d'un fort couplage spin-orbite, l'état excité se caractérise par un état de spin dont la multiplicité est ambiguë. Le niveau émetteur est un mélange d'états triples et singulets. De ce fait, nous préférons ne pas employer les termes de « phosphorescence » ou de « fluorescence » pour désigner la nature de l'émission. Même si le caractère triplet est dominant, nous préférons employer uniquement le terme plus général de « photoluminescence » qui n'implique aucune condition sur la nature de l'état émetteur.

L'acquisition d'image photoluminescente de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, à travers la fibre, est réalisée en utilisant un microscope épifluorescent en configuration horizontale (Figure 1).^[163] A partir d'une lampe à xénon, une lumière de longueur d'onde 485 nm, correspondant à l'excitation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, est sélectionnée par un filtre d'excitation avant de se réfléchir sur un miroir dichroïque. Elle est alors dirigée vers un objectif, puis focalisée à la sortie de l'objectif sur la face d'entrée du faisceau d'imagerie (ou face proximale).

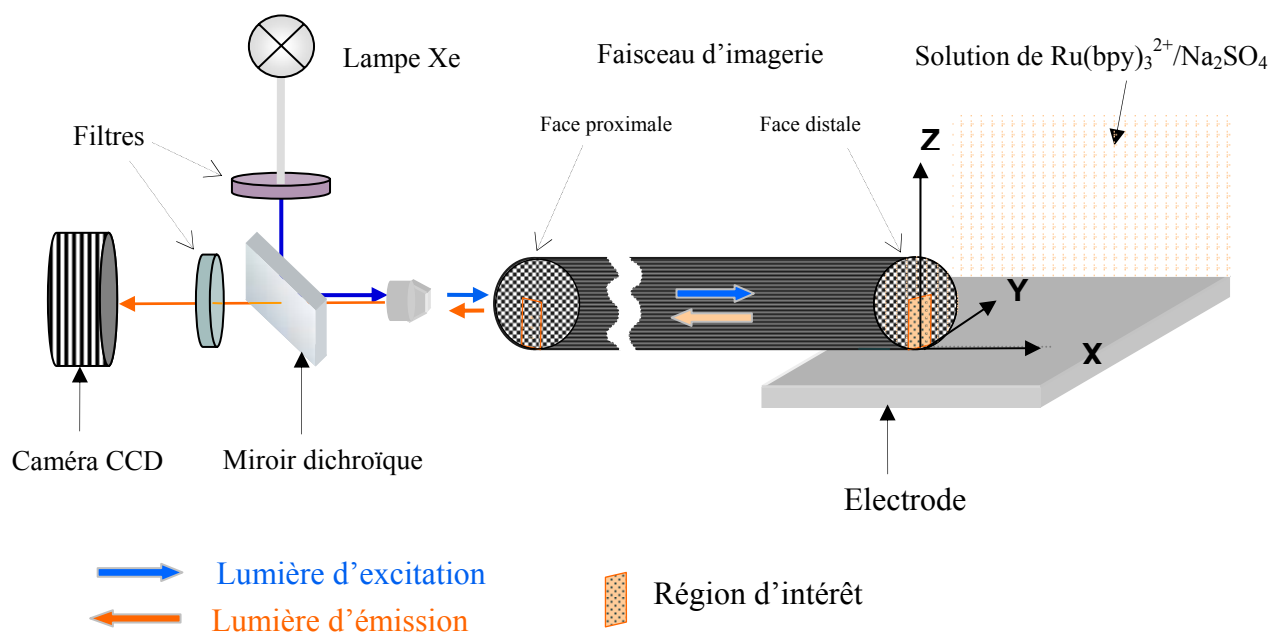


Figure 1 : Représentation schématique du montage expérimental d'imagerie épifluorescente utilisant un faisceau de fibres optiques

La lumière excitatrice traverse chacune des fibres optiques individuelles du faisceau pour initier, à la sortie de la face distale, l'émission de photoluminescence rouge-orangée à 605 nm caractéristique de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. L'intensité de photoluminescence générée est proportionnelle à la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, dans la couche de solution directement adjacente à la face du faisceau. Ce point est discuté plus en détails ci-dessous. La photoluminescence ainsi initiée est recapturée par la fibre d'imagerie. Elle traverse à son tour le faisceau par le chemin inverse de celui de l'excitation. On dit que le faisceau d'imagerie travaille en mode émetteur/collecteur. La lumière d'émission transportée par l'ensemble des 6000 cœurs est collectée par l'objectif, traverse le miroir dichroïque et un filtre d'émission, puis est visualisée à l'aide d'une caméra CCD. Les 6000 spots d'émission issus de chacune des fibres optiques individuelles sont restitués sous forme d'image.

La figure 2 ci-dessous montre l'image globale de la photoluminescence acquise *via* la face distale d'un faisceau d'imagerie immergé dans une solution 1 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dans l'électrolyte 1 M Na_2SO_4 . Elle est visualisée en observant la face proximale par le dispositif microscope/caméra CCD. En codant l'intensité suivant une échelle de couleurs 16 bits, l'image représente les intensités de la photoluminescence provenant de chaque spot. Le noir correspond à une faible intensité lumineuse, alors que le rouge représente les intensités les plus fortes. La zone délimitée en orange est la « région d'intérêt » (voir texte ci-dessous). Chaque spot correspond à la dimension d'un cœur optique du faisceau qui a un diamètre de 3 μm , et qui constitue alors un « pixel » permettant de former l'image. La résolution spatiale optique offerte par le faisceau d'imagerie dépend de la taille de ces cœurs, mais aussi d'autres paramètres comme le nombre de cœurs et la distance entre les cœurs. La résolution spatiale optique est la capacité à distinguer des détails de l'image.

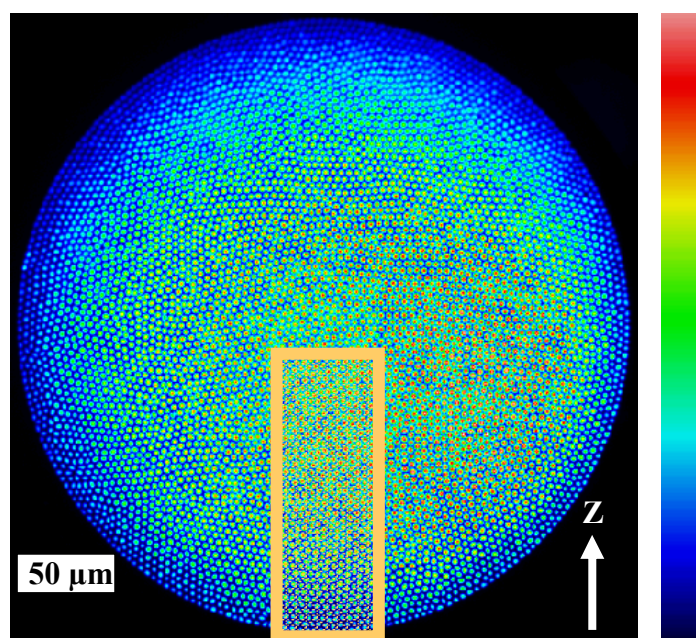


Figure 2 : Image de photoluminescence acquise *via* un faisceau d'imagerie dans une solution 1 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ contenant un électrolyte support (Na_2SO_4 1 M). Temps d'exposition = 100 ms. Le cadre orange représente la région d'intérêt (voir texte).

Dans ce système, la fibre d'imagerie est capable d'échantillonner la photoluminescence en fonction de la distance Z orthogonale à la surface de l'électrode. L'étendue maximale que l'on peut potentiellement échantillonner correspond au diamètre total de l'aire de transmission du faisceau, c'est-à-dire 270 μm . L'expérience est conçue de façon à visualiser l'épuisement de la concentration d'une espèce consommée à l'électrode. L'espèce

luminescente $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est oxydée suite à un saut de potentiel appliqué à l'électrode, pour former l'espèce $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ qui n'est pas luminescente.^[164] Le courant d'oxydation à l'électrode est limité par le transport de matière. Le transport par migration est rendu négligeable par ajout d'un électrolyte support en excès. Donc, la diffusion demeure le seul mode de transport de l'espèce électroactive. De plus, comme la fibre d'imagerie est placée au centre de l'électrode qui est de taille millimétrique, le régime de transport est celui de la diffusion plane. Autrement dit, le flux par diffusion se fait perpendiculairement à la surface de l'électrode, suivant l'axe Z. Le choix de cette configuration permet ainsi de minimiser les perturbations liées à l'intrusion d'un tel objet au sein de la couche de diffusion. En effet, la symétrie du phénomène est respectée. Finalement, en observant au cours du temps la décroissance séquentielle de la photoluminescence en fonction de la distance à l'électrode, on réalise ainsi directement le suivi de la structuration d'une couche de diffusion à l'électrode.

La résolution temporelle est défini comme étant le délai entre l'acquisition de deux images consécutives. Cela correspond à la somme des temps d'exposition et de lecture de la caméra. Le régime de diffusion que l'on veut sonder est un événement transitoire se développant à l'échelle de quelques dizaines à quelques centaines de millisecondes. Cette échelle est incompatible avec le temps de lecture complet de la caméra CCD approchant une seconde. Afin d'obtenir la résolution temporelle de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes, les performances de vitesse d'acquisition d'image de la caméra sont améliorées par deux procédures. D'abord la zone d'acquisition de l'image épifluorescente est restreinte à une « région d'intérêt » (figures 1 et 2). Sur les deux figures précédentes, cette zone particulière est représentée par un rectangle orangé. Avec ce procédé, la caméra CCD ne procède qu'à la lecture de la région d'intérêt, en considérant comme noir l'ensemble de la zone en dehors du cadre sélectionnée. Le temps de lecture peut ainsi descendre en dessous de 150 millisecondes. Par ailleurs, la région d'intérêt est choisie depuis le bord du faisceau, en contact avec l'électrode, jusqu'au centre du faisceau, de manière à conserver une dimension d'observation suffisamment grande pour sonder l'ensemble de la couche de diffusion suivant l'axe Z (voir figure 3). Un autre procédé appelé « binning » est appliqué pour réduire le temps de lecture de l'image. Le binning 2x2 par exemple procède à la sommation de deux pixels adjacents, suivant l'axe Z et suivant l'axe Y. Ce procédé permet un gain considérable en temps de lecture, pouvant descendre en dessous de 50 millisecondes. Nous avons adapté les choix de la région d'intérêt et du

binning afin de trouver le compromis entre le gain de résolution temporelle et la perte de résolution spatiale optique que provoque le binning. Grâce aux différents paramètres d'acquisition, chaque image de photoluminescence est acquise avec un temps d'exposition de 10 ms, suivi d'un temps de lecture réduit à 50 ms, durée au cours de laquelle la caméra est « aveugle ». Etant donné le fort rendement quantique de photoluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et des concentrations suffisamment élevées que l'on emploie, l'intensité de photoluminescence n'est pas limitante pour employer la méthode avec un temps d'exposition aussi court. En fait, la vitesse de l'obturateur mécanique de la caméra limite le temps d'exposition à 10 ms.

La figure 3 montre les images de l'extinction de la photoluminescence en fonction de la distance à l'électrode. Pour réaliser cette expérience, l'acquisition et le saut de potentiel électrochimique sont déclenchés de façon simultanée à un temps donné ($t=0$ s).

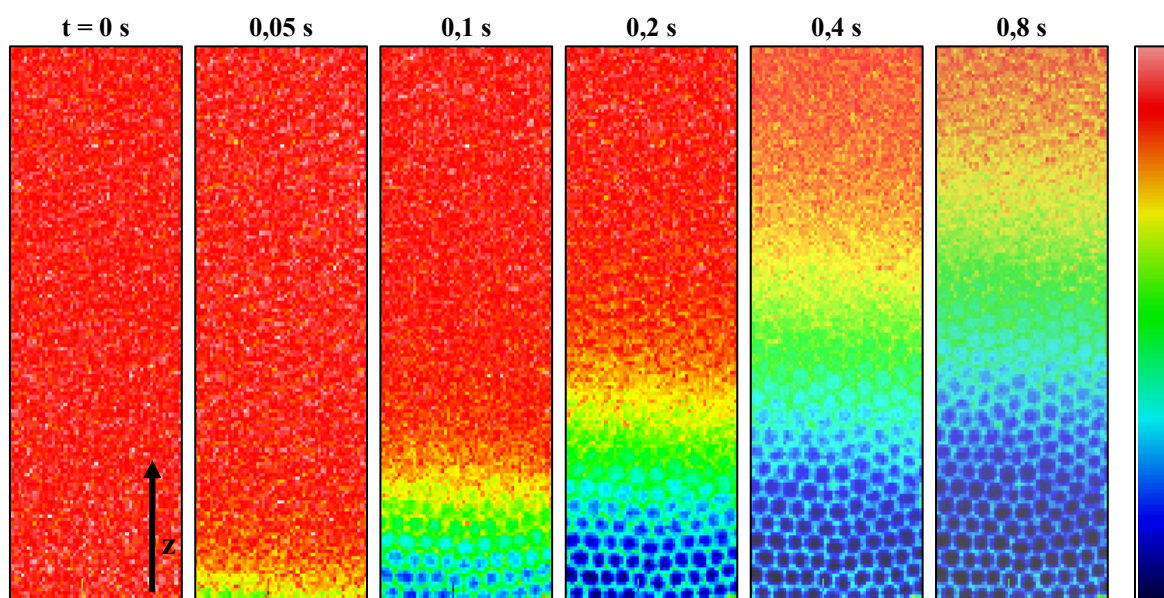


Figure 3 : Séquence d'images normalisées de photoluminescence collectées dans la région d'intérêt au cours de l'oxydation de Ru (II) à l'électrode. Les images sont codées selon la même échelle de couleur : la couleur rouge correspond à l'intensité lumineuse maximale. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 5 \text{ mM}$; $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 1\text{M}$; temps d'exposition = 10 ms.

En effet, l'électrode est portée au potentiel de 1,2 V par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl. La région d'intérêt représente une surface de $50 \mu\text{m}$ suivant l'axe Y et de $150 \mu\text{m}$ suivant l'axe Z où se produit le phénomène de diffusion linéaire. L'image correspondant à $t = 0$ s est parfaitement homogène après normalisation (voir ci-dessus).

La propagation de l'extinction de la photoluminescence observée au cours de la séquence d'images est directement associée aux changements de composition de la solution près de l'électrode. La concentration de l'espèce luminescente diminue au voisinage de la surface de l'électrode polarisée. L'observation se limite ici à la première seconde où se produit l'oxydation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ à l'électrode. La méthode n'est en effet plus valide après quelques secondes, car le transport par convection vient perturber le régime de diffusion pure. Ce point est détaillé ci-dessous. Pour exploiter les images, on attribue une valeur t dans l'échelle de temps commençant au saut de potentiel ($t = 0$ s). L'incertitude sur le temps attribuée à chaque image est ± 5 ms. Chaque image correspond à l'accumulation des photons de photoluminescence émis pendant le temps d'exposition de la caméra CCD de 10 ms. Cependant même pendant ce court laps de temps, le phénomène d'extinction continue de varier. De ce fait, l'image ne retranscrit que la résultante de la moyenne des profils de photoluminescence qui s'établissent successivement au cours de cette durée. En d'autres termes, la distribution spatiale de la photoluminescence que montre une image n'est donc pas associée à un profil instantané de concentration, mais plutôt à une moyenne des profils pendant un temps de 10 ms. Ce délai de 10 ms est cependant le temps minimum d'exposition de la caméra CCD étant donné la vitesse de l'obturateur mécanique. Néanmoins, l'acquisition d'image reste très rapide en comparaison au temps total d'établissement d'une couche de diffusion complète. On peut donc considérer en première approximation que chaque capture d'image est quasi-instantanée vis-à-vis du phénomène.

Les images enregistrées ne sont qu'une représentation codée des intensités mesurées sur chaque pixel de la caméra CCD. Les images de la figure 3 sont normalisées numériquement. Cette étape consiste à diviser chaque image obtenue à un temps t par l'image de photoluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ enregistrée à $t = 0$ s avant la perturbation dans les mêmes conditions expérimentales (intensité I^0). C'est-à-dire que l'intensité de chaque pixel mesurée à un temps t est divisée par l'intensité du même pixel à $t = 0$ s. En absence de perturbation, on peut remarquer, sur l'image de la figure 2 acquise en sélectionnant la totalité de 6000 coeurs de la fibre, que l'intensité n'est pas homogène. Elle est plus intense au centre qu'à la périphérie du faisceau, bien que la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ soit partout égale. Du point de vue optique, la situation des coeurs situés au centre ou à la périphérie n'est pas équivalente. D'une part, la distribution de l'intensité de lumière excitatrice qui est focalisée sur la face proximale du faisceau n'est pas uniforme. Ainsi si on considère les

cœurs séparément, ils ne produisent pas tous la même intensité de photoluminescence au niveau de la face distale. D'autre part, un cœur situé au centre se trouve dans le « bulk » des autres cœurs, alors qu'un cœur périphérique est à l'interface faisceau/solution. Il en résulte cette différence d'intensité lumineuse. En effet, un cœur du « bulk » collecte la photoluminescence des molécules de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ situées dans son voisinage. Ces molécules sont excitées par ce cœur, mais aussi, pour une part, par les nombreux cœurs qui l'entourent. Par contre, dans le cas d'un cœur de la périphérie, il collecte une intensité qui résulte de l'excitation apportée par un nombre plus faible de cœurs environnants, du fait de la proximité avec la bordure du faisceau. Pour l'exploitation des images, l'opération de normalisation est ainsi indispensable pour éliminer l'effet d'inhomogénéité lié aux propriétés intrinsèques du faisceau de fibres optiques. En effet, il se manifeste notamment au niveau de la région d'intérêt sélectionnée (i.e. près de la surface de l'électrode). Ainsi, à partir de chaque image de la figure 3, un profil de photoluminescence en fonction de la distance à l'électrode est calculé en moyennant suivant l'axe Y les intensités collectées par les pixels qui correspondent à la même distance Z à l'électrode. A l'issue de la normalisation, puisque l'intensité de photoluminescence I est directement proportionnelle à la concentration locale en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, le profil de photoluminescence I/I° peut être corrélé au profil de concentration C/C° . Le terme C° correspond à la concentration initiale en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

3.2 Paramètres influant sur la résolution spatiale

Le premier objectif de ce travail est de trouver les conditions expérimentales permettant de déduire les profils de concentration générés à l'électrode à partir des profils d'intensité de photoluminescence. Dans ce but, il est nécessaire de tester l'influence d'un certain nombre de facteurs qui contrôlent la résolution spatiale. Les facteurs qui entrent en jeu sont liés aux propriétés du faisceau de fibres optiques et aux propriétés physico-chimiques de la solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. La résolution spatiale de notre méthode d'imagerie épifluorescente dépend, d'une part, des propriétés optiques du faisceau (résolution spatiale optique) et, d'autre part, du milieu à tester (résolution spatiale chimique). Concernant le faisceau de fibres, la résolution spatiale optique est fonction de l'arrangement géométrique, du diamètre des cœurs, de la distance inter-cœur et de l'ouverture numérique. La résolution spatiale chimique représente la capacité du système constitué du faisceau d'imagerie et de la

solution luminescente à décomposer la couche de sondage optique en zones d'échantillonnage discrètes et indépendantes pour chaque cœur individuel. Elle dépend de la solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$: absorbance à la longueur d'onde d'excitation, indice de réfraction, etc. En effet, ci-dessus, nous avons mis l'accent sur la différence entre l'intensité lumineuse des cœurs situés dans le « bulk » et l'intensité lumineuse des cœurs situés à la périphérie du faisceau. Nous avons donné une explication intuitive à cette observation : un cœur du « bulk » collecte non seulement la photoluminescence des molécules $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ excitées par lui-même, mais aussi, par les nombreux cœurs qui l'entourent. Avec les expériences que nous présentons ci-dessous, nous allons chercher à minimiser l'influence des cœurs environnants sur le signal lumineux collecté par un cœur donné. De cette manière, chaque cœur sera indépendant optiquement et il sonde alors la concentration locale du volume de solution qui lui est immédiatement adjacent. Cette résolution spatiale chimique est la notion clé de ce procédé d'imagerie, où les profils de photoluminescence doivent correspondre exactement aux profils de concentration transitoires. Les deux paramètres que nous avons testé sont, dans un premier temps, l'ouverture numérique des fibres optiques, et, dans un second temps, la concentration de la solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

3.2.1 Influence de l'ouverture numérique

La trajectoire d'un rayon lumineux dans une fibre optique est guidée par réflexion totale interne à l'interface cœur/gaine. A l'entrée ou à la sortie de ce cœur, la lumière se propage selon une distribution spatiale radiale qui est définie par un cône d'acceptance d'angle $\theta_{\text{acceptance}}$ par rapport à la normale à la fibre (cf. annexe 1). Le cône d'acceptance définit l'espace où se répand la lumière d'excitation émanant de chaque cœur. Cet angle est directement lié à la valeur de l'ouverture numérique (Equation 1) :

$$\text{Ouverture numérique} = \sin \theta_{\text{acceptance}} = \left(\frac{n_{\text{cœur}}^2 - n_{\text{gaine}}^2}{n_{\text{milieu}}^2} \right)^{1/2} \quad \text{Equation 1}$$

Dans cette relation, $n_{\text{cœur}}$ et n_{gaine} désignent respectivement l'indice de réfraction des cœurs optiques et de la gaine environnante. L'indice de réfraction n_{milieu} du milieu extérieur dépend de la composition locale de la solution. Nous avons étudié l'influence de l'ouverture numérique sur la résolution spatiale chimique. L'ouverture numérique est un paramètre que l'on peut faire varier en modifiant la composition des matériaux constituant les cœurs et la

gaine. Il est nécessaire de fixer la différence entre les indices des deux matériaux. Plusieurs types de faisceaux commerciaux ont été testés. Nous avons utilisé trois fibres d'imagerie qui diffèrent par les valeurs de leurs ouvertures numériques respectives : 1,0 (valeur théorique de $\theta_{\text{acceptance}}$ égale à 90°), 0,35 ($\theta_{\text{acceptance}} \approx 20^\circ$) et 0,22 ($\theta_{\text{acceptance}} \approx 13^\circ$). Dans les trois cas, l'intensité lumineuse envoyée à l'intérieur des faisceaux pour exciter la photoluminescence est identique.

Sur la figure 4 sont représentés les profils normalisés de photoluminescence par rapport à la distance à l'électrode, réalisés avec ces trois fibres d'imagerie dans une solution électrolytique contenant 5 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Ces profils sont déterminés, dans les trois cas, à partir de l'image capturée 100 ms après le saut de potentiel. Comme précisée ci-dessus, chaque profil est normalisé par rapport à l'image correspondante capturée à $t = 0$ s. Les trois profils correspondant aux différentes fibres utilisées sont comparés à un profil de concentration théorique (figure 4). Le profil théorique, correspondant au temps $t = 100$ ms, est calculé à partir des lois de la diffusion plane.^[165] Son expression est donnée par :

$$C(z, t) / C^\circ = \text{erf} \left[Z / 2(Dt)^{1/2} \right] \quad \text{Equation 2}$$

$C(Z, t)$ est la concentration de l'espèce électroactive et photoluminescente à la distance Z de l'électrode au temps t . D est le coefficient de diffusion de l'espèce consommée à l'électrode ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$). Cette dernière valeur a été déterminée au moyen de deux méthodes électrochimiques : par la mesure du courant stationnaire d'une ultramicroélectrode disque, et, également, par la loi de Randles-Sevcik sur une électrode millimétrique (voir Section Expérimentale). La valeur trouvée est dans les deux cas en très bon accord avec la valeur reportée dans la littérature, égale à $5,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.^[166,167]

Les profils I/I° de la figure 4 montrent un appauvrissement progressif de la concentration de l'espèce luminescente lorsque la distance à l'électrode diminue. Cependant, les intensités expérimentales ne sont pas en accord avec le profil de concentration théorique.

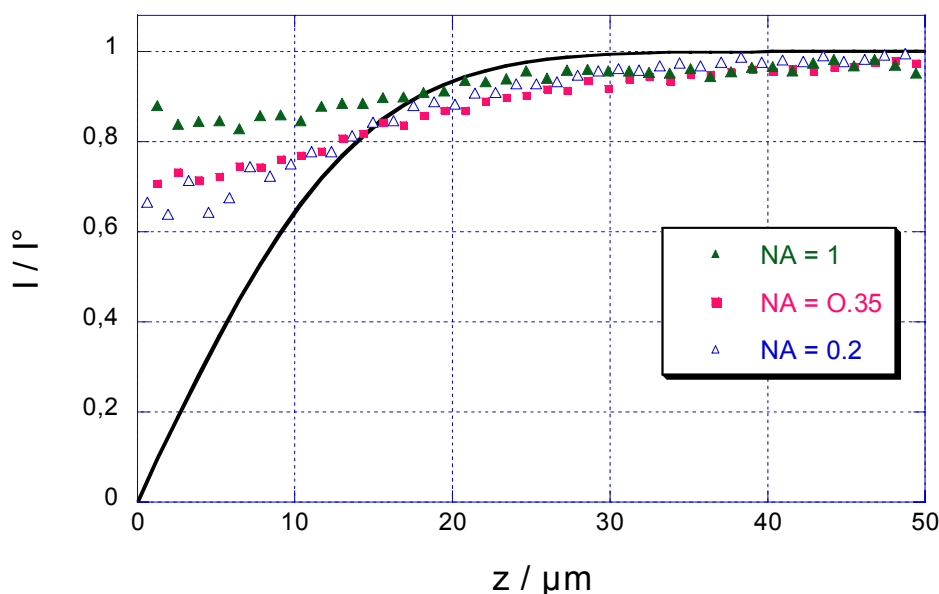


Figure 4 : Evolution de l'intensité de photoluminescence normalisée (I / I°) en fonction de la distance à l'électrode. Les mesures ont été obtenues à $t = 100$ ms dans une solution contenant 5 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et 1 M Na_2SO_4 , avec trois fibres d'imagerie d'ouvertures numériques différentes (0,22 , 0,35 et 1). Le trait plein représente le profil théorique $C(Z,t)/C^\circ$ à $t=100$ ms.

Loin de l'électrode, les intensités normalisées sont légèrement inférieures aux valeurs prédites par l'équation 2. Les courbes correspondant aux trois faisceaux semblent se confondre. Par contre, lorsqu'on se rapproche de la surface de l'électrode, on observe des variations différentes suivant les faisceaux. L'écart entre l'expérience et la théorie est plus faible quand la valeur de l'ouverture numérique diminue. En effet, pour une ouverture numérique égale à 0,22, la pente est plus importante et les valeurs tendent progressivement vers le comportement théorique.

L'ouverture numérique a un effet direct sur l'extension du volume sondé par les cœurs optiques. La figure 5 schématise les cônes d'acceptance de deux cœurs optiques adjacents de faisceaux d'imagerie d'ouverture numérique différente. Ces schémas sont construits en ne présentant que deux cœurs adjacents par souci de clarté. Etant donné la configuration expérimentale, l'illumination émanant des cœurs optiques est frontale. Elle suit l'axe X suivant une direction perpendiculaire au sens de la diffusion plane.

Le schéma 5A représente deux cônes d'acceptance d'angle θ_1 . A partir de ce schéma, nous pouvons détailler comment se produit l'échantillonnage de la photoluminescence au niveau d'un cœur. La lumière excitatrice à la sortie du coeur émerge dans la solution à l'intérieur du cône d'acceptance. Celui-ci représente le « volume local » d'échantillonnage du cœur. Le volume d'échantillonnage n'est ainsi pas confinée au niveau du coeur mais au contraire se propage frontalement. La lumière d'excitation initie l'émission photoluminescente des molécules de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se trouvant dans l'espace défini par le cône d'acceptance. Chaque cœur collecte alors une fraction de la photoluminescence isotrope qu'il a initiée dans ce volume local. Comme les fibres adjacentes sont proches les unes des autres (distance inter-cœur 4 μm), le cœur peut également recueillir une part importante de la photoluminescence qui est en fait initiée par un cœur voisin, et dont le cône d'excitation se recouvre avec le sien. Sur la figure 5A, la partie hachurée désigne cette zone de recouvrement entre les cônes d'excitation des deux cœurs adjacents. Ainsi, l'échantillonnage de photoluminescence auquel procède l'ensemble des 6000 cœurs optiques n'est pas discret et confiné au niveau du coeur individuel. Etant donné le recouvrement spatial des cônes d'excitation, la zone d'échantillonnage résulte d'une superposition extrêmement complexe de zones distantes d'illumination inégale. Le recouvrement spatial des zones d'échantillonnage altère la résolution spatiale du système suivant l'axe Z. En effet, un cœur qui est positionné à une certaine distance Z^* de l'électrode ne sonde pas seulement un signal de photoluminescence correspondant précisément à la composition de la solution à cette distance particulière. En fait, il collecte un mélange de signaux de photoluminescence du fait du recouvrement par les volumes d'échantillonnage voisins. Une quantité non négligeable de photons provient en effet de molécules émettrices qui sont en fait excitées par les cœurs positionnés autour, et notamment en dessous et au dessus de Z^* . De ce fait, l'intensité relative de photoluminescence collectée par un cœur ne traduit pas la véritable valeur de la concentration à la distance Z^* . En conséquence, il semble intéressant de diminuer l'ouverture numérique pour minimiser cet effet de recouvrement.

Le schéma 5B représente l'effet de la diminution de l'angle d'acceptance. L'angle θ_2 étant inférieur à θ_1 , la section transverse des cônes est réduite, ce qui minimise le recouvrement latéral (partie hachurée). En d'autres termes, la diminution de l'ouverture numérique permet de réaliser un « confinement transversal » des volumes d'échantillonnage des différents cœurs. La photoluminescence collectée par un cœur provient en grande majorité d'une zone d'excitation quasi-indépendante.

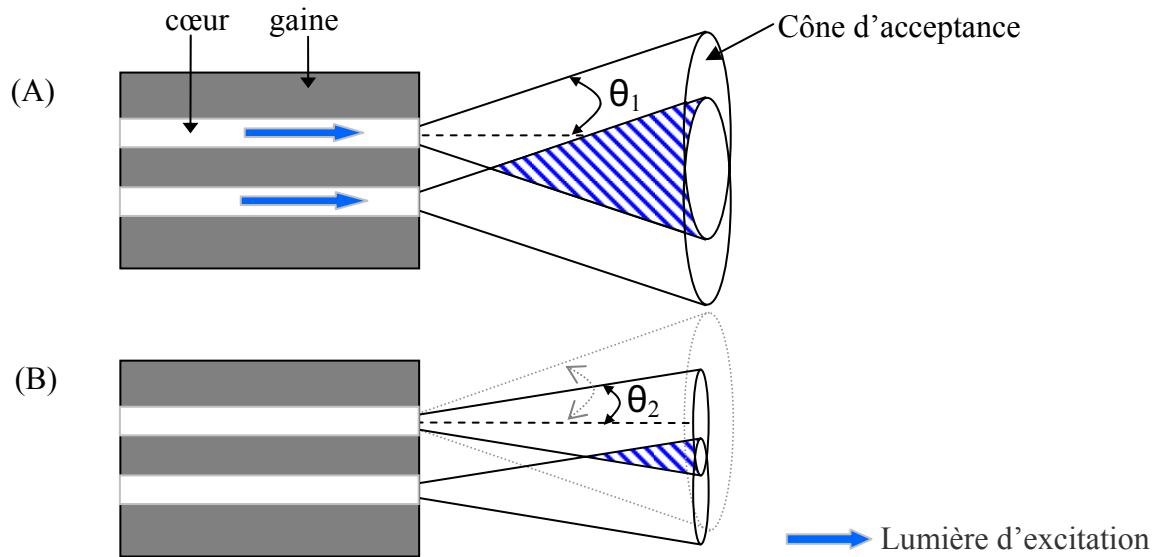


Figure 5 : (A) Représentation schématique de l'extension des volumes d'échantillonnage de 2 cœurs adjacents d'un faisceau d'imagerie caractérisé par l'angle d'acceptance θ_1 . La partie hachurée représente le recouvrement entre les deux cônes (voir texte). (B) Effet de la diminution de l'ouverture numérique, en utilisant un faisceau d'angle d'acceptance $\theta_2 < \theta_1$.

Les deux situations de la figure 5 expliquent en partie l'écart croissant que l'on observe entre l'expérience et la théorie lorsque la valeur de l'ouverture numérique du faisceau augmente (figure 4) Pour le faisceau d'ouverture numérique égal à 1, l'angle d'acceptance vaut théoriquement $\theta = 90^\circ$. Il n'y a donc aucun confinement transversal des volumes sondés. Les photons de photoluminescence qui arrivent au niveau d'un cœur peuvent provenir de n'importe quel autre cœur à proximité. De ce fait, étant donné le manque crucial de discrimination spatiale du signal suivant l'axe Z, le profil expérimental est très peu représentatif de la théorie. En revanche, pour des ouvertures numériques plus faibles, le gain de résolution spatiale obtenue se manifeste par une amélioration des profils expérimentaux par rapport à la courbe théorique. C'est principalement proche de l'électrode que l'amélioration est notoire, l'écart avec la théorie se réduisant progressivement dans la zone où les pentes sont les plus fortes. Ce résultat n'a pu être vérifié plus en détails par des expériences utilisant un faisceau d'ouverture numérique inférieure à 0,22. Ce faisceau a été fabriqué spécialement pour cette application. Il n'a pas été possible de trouver de fabricant pouvant produire des faisceaux cohérents de fibres optiques avec une plus faible ouverture numérique.

3.2.2 Influence de la concentration initiale

Le second effet pouvant agir sur l'allure des profils de photoluminescence expérimentaux I/I^0 est la concentration initiale de la solution en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. En effet, ces molécules absorbent très fortement la lumière d'excitation. Dans ce mode d'illumination frontale, plus la solution est concentrée, plus l'absorbance a d'effet sur la profondeur de pénétration dans la solution de la lumière excitatrice. Cette profondeur d'échantillonnage est le principal facteur qui fixe l'extension suivant l'axe X du volume sondé par les cœurs optiques. Une diminution de la profondeur d'excitation peut ainsi être une voie intéressante pour minimiser le recouvrement des zones d'échantillonnage. Pour tester l'influence de la concentration sur la résolution spatiale, nous avons fait varier la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ de la solution et mesuré les profils résultants d'intensité de photoluminescence. La fibre d'imagerie utilisée est celle présentant l'ouverture numérique la plus faible (0,22). Les résultats des profils expérimentaux, capturés à $t = 100$ ms après l'application du saut de potentiel, dans des solutions à 1 mM, 5 mM et 30 mM, sont présentés sur la figure 6. Le profil normalisé de concentration théorique obtenu à $t = 100$ ms figure aussi sur le graphique (Equation 2).

Les profils expérimentaux de la figure 6 montrent très bien le phénomène d'appauvrissement progressif de la concentration à proximité de l'électrode. Très clairement, les intensités expérimentales se rapprochent d'autant plus du profil théorique que la concentration initiale de la solution augmente. Loin de l'électrode, les intensités normalisées sont inférieures aux valeurs prédites par l'équation 2, excepté sur le profil acquis à 30 mM où l'accord avec la théorie est très bon. Au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'électrode, c'est-à-dire dans la partie de la couche de diffusion où les gradients de concentration sont les plus importants, l'écart entre l'expérience et la théorie décroît quand la concentration diminue de 1 mM à 5 mM.

Lorsque la concentration atteint 30 mM, le profil de photoluminescence épouse remarquablement bien le profil théorique. Ce bon accord est observé jusqu'à environ 10 micromètres de la surface de l'électrode. En deçà de cette distance, c'est-à-dire dans les 10 premiers micromètres, les intensités détectées sont, de nouveau, nettement supérieures à la prévision. Cette distorsion très marquée et systématique sera discutée plus loin dans ce chapitre.

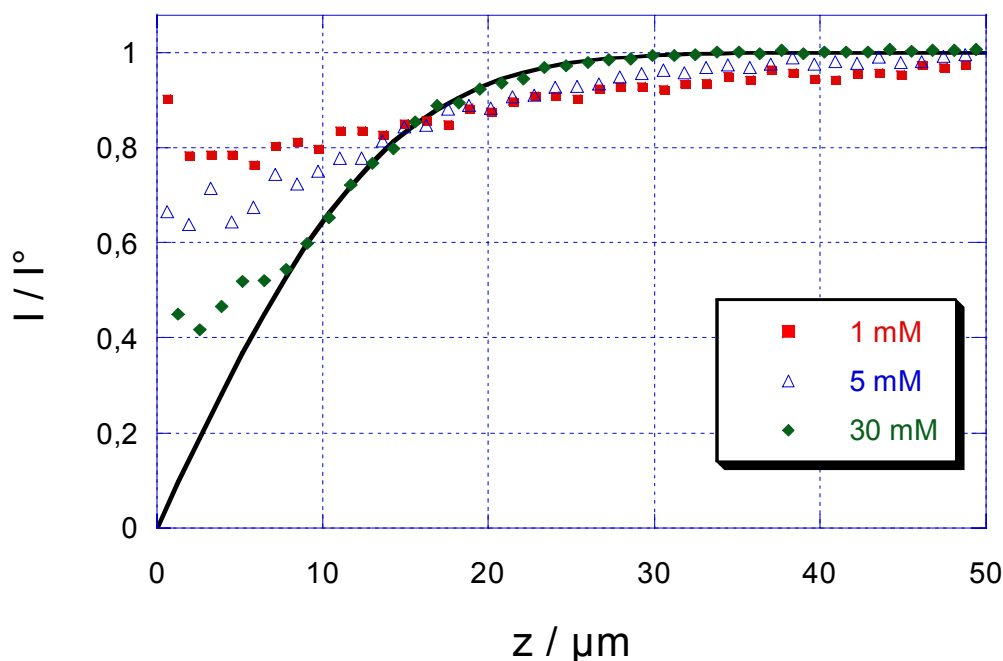


Figure 6 : Evolution des profils normalisés de photoluminescence en fonction de la distance à l'électrode, obtenus pour différentes concentrations en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. $t = 100$ ms. Faisceau d'ouverture numérique égale à 0,22. Le trait plein représente le profil théorique $C(Z,t)/C^\circ$ à $t=100$ ms.

La concentration en molécules absorbantes ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) a directement un effet sur l'extension du volume sondé par un cœur. L'étude des effets de la diminution de la profondeur d'excitation sur la résolution spatiale chimique du système nécessite une analyse détaillée de certains paramètres physico-chimiques mais aussi géométriques. Le schéma qui illustre cette influence est représenté sur la figure 7. Cette figure schématise, pour deux cœurs optiques adjacents d'un faisceau, l'effet de l'absorbance de la solution sur la profondeur d'échantillonnage des cônes d'illumination. Lorsque la concentration de la solution est faible, cette dernière possède un très faible pouvoir absorbant. La profondeur de pénétration des photons correspondant à l'excitation (lignes pointillées) est alors grande. Dans ce cas, un effet de recouvrement des volumes d'échantillonnage affecte la résolution spatiale (zone hachurée), conduisant à des profils de photoluminescence qui ne correspondent pas au profil théorique (figure 6).

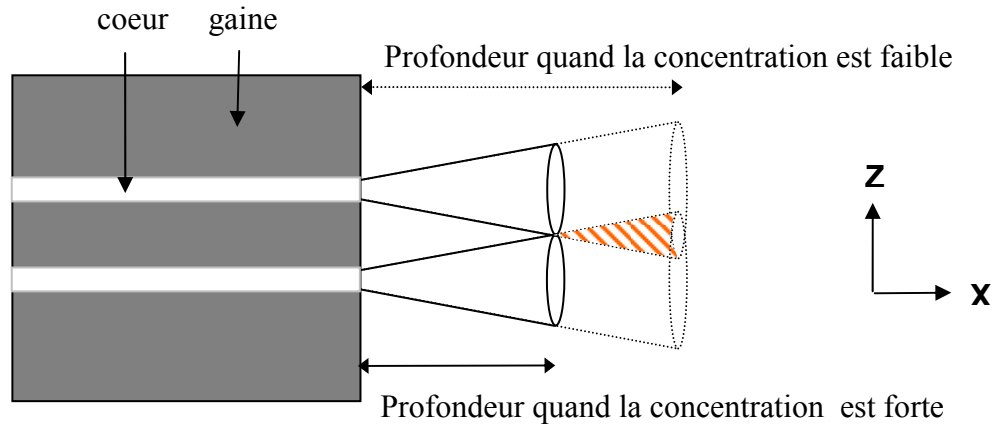


Figure 7 : Représentation de l'influence de la concentration sur la profondeur d'échantillonnage des cônes d'illumination

En se plaçant dans l'hypothèse où l'effet d'absorbance est totalement absent, l'intensité de lumière d'excitation qui émerge du cœur et se propage en solution est atténuée par un facteur lié à l'expansion du cône d'illumination suivant l'axe X. Une représentation de cet effet est montrée sur le schéma de la figure 8. La distribution spatiale de la lumière est ici supposée homogène. Les surfaces délimitées par des pointillés représentent l'expansion de la section transverse du cône d'illumination, de rayon R dépendant de Z et de l'ouverture numérique du cœur. Ces sections du cône représentent aussi les surfaces d'isodensité optique, ou radiance, exprimée en W/cm^2 . La radiance en un point p situé à une distance radiale d décroît ainsi fortement, selon un facteur d'atténuation exprimé en $1/d^2$.^[58]

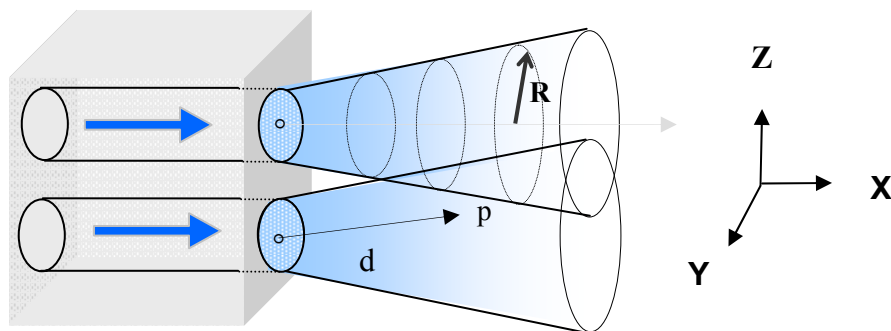


Figure 8 : Représentation de l'atténuation spatiale de l'intensité d'excitation liée à l'expansion du cône d'illumination. Les niveaux de gris décroissant caractérisent l'atténuation progressive de l'intensité lumineuse.

L'ouverture numérique est l'une des variables qui intervient sur l'atténuation de la radiance lumineuse. En effet, la distribution spatiale de l'intensité lumineuse dépend directement du cône d'acceptance (ou d'émergence), donc de son ouverture numérique.^[168] Compte tenu de ce critère d'atténuation purement « géométrique », le nombre de molécules qui sont excitées devrait être plus important près de la surface du faisceau que dans les zones les plus distantes. Par ailleurs, il est nécessaire de tenir compte de l'effet de l'absorbance qui n'est pas négligeable, même dans le cas de faibles concentrations. La valeur du coefficient d'extinction molaire du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est, en effet, élevée : $\varepsilon = 4200 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dans l'eau à 485 nm (cf. Section Expérimentale).^[162] L'absorbance contribue ainsi fortement à atténuer la profondeur de pénétration de la lumière incidente excitatrice dans la solution. En spectroscopie, les effets de l'absorption de la lumière d'excitation ou d'émission sont connus sous le nom d'effets de filtre interne.^[169] Comme pour les effets de « quenching » moléculaires ou du transfert d'énergie de Förster, ils sont en particulier exploités dans les expériences de modulation de fluorescence, par exemple dans le développement de capteurs optiques,^[170] ou pour la détection par fluorescence de molécules non fluorescentes.^[171] On parle d'un effet de filtre interne primaire lorsque la lumière d'excitation est absorbée par le milieu. Elle peut l'être soit par un chromophore différent de l'analyte, soit par l'analyte lui-même. Dans le premier cas, le chromophore joue le rôle de « filtre », limitant la profondeur d'excitation. Dans le second cas, l'effet primaire se manifeste surtout si la solution est relativement concentrée. La lumière excitatrice est alors très vite absorbée en pénétrant dans la solution, et c'est donc la concentration en analyte qui module l'effet de filtre. En fluorescence, l'effet de filtre interne secondaire correspond à l'absorption, par le milieu environnant, de la lumière émise par le fluorophore. Dans les analyses spectroscopiques, ces effets de filtre interne limitent l'étude de solutions concentrées au delà d'une certaine limite d'absorbance. Par ailleurs, des facteurs de correction théoriques de l'intensité de fluorescence peuvent être calculés, notamment pour les cellules fluorimétriques en mode d'illumination frontale.^[172, 173]

Dans notre expérience, nous jouons sur l'effet de filtre interne primaire en augmentant la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Cependant, le résultat de la figure 6 montre que, même pour une concentration atteignant 5 mM, l'effet n'est toujours pas suffisant pour agir favorablement sur la résolution spatiale. Le profil expérimental reste significativement éloigné de la théorie. Lorsque l'on concentre de plus en plus la solution (30 mM) en tendant

vers la limite de dissolution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dans l'électrolyte, le pouvoir absorbant de la solution est alors très important. A cette concentration, l'effet de filtre interne primaire permet d'obtenir une condition extrêmement favorable du point de vue de la résolution spatiale. Le profil de photoluminescence obtenu à 30 mM avec un faisceau d'ouverture numérique 0,22 (figure 6) est en effet en très bon accord avec le profil théorique. Cette situation expérimentale revient à diminuer le recouvrement des volumes d'échantillonnage jusqu'à le rendre négligeable (figure 7). Cela revient à diminuer la profondeur de pénétration des photons d'excitation. Puisque la concentration de la solution agit sur l'extension du volume sondé suivant l'axe X, le confinement des cônes d'échantillonnage est maintenant « longitudinal ». Du fait de ce confinement, l'excitation des molécules de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est ainsi beaucoup plus efficace près du cœur qu'à longue distance du cœur.^[169] D'autres facteurs, autres que ceux agissant sur l'atténuation de la lumière d'excitation, ont un rôle sur le processus d'échantillonnage photoluminescent. Ces facteurs caractérisent l'efficacité de la collecte de photoluminescence par un cœur, en fonction de la distance entre le cœur et une molécule émettrice dans le cône d'illumination située à une distance d (figure 8). Nous avons évoqué ci-dessus que chacun des cœurs optiques ne recueille qu'une fraction de la photoluminescence qu'il a générée dans son propre cône d'illumination. Le premier facteur qui permet d'évaluer qualitativement la fraction collectée est d'ordre géométrique. Si toutes les molécules $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ présentes dans le cône d'illumination participe au signal recueilli, leurs contributions respectives ne sont pas égales. En effet, une molécule émet de la photoluminescence de façon isotrope dans une sphère d'expansion à partir de laquelle seule une part des photons sera collectée *via* le cône de la fibre. Cette part se quantifie par un facteur d'atténuation proportionnel à d^2 . Ce dernier exprime le fait que plus la molécule est excitée loin de la fibre, et moins elle contribue à la photoluminescence détectée. La fraction collectée est également atténuée par un effet de filtre interne dit secondaire. En spectroscopie, il correspond notamment au phénomène de réabsorption de la luminescence par la molécule luminescente elle-même. L'effet de filtre secondaire peut donc être modulé par le facteur concentration. Dans notre expérience, seules les espèces $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ présentes dans la couche de diffusion peuvent éventuellement contribuer à un effet de filtre interne secondaire. Dans un tel cas, la réabsorption stoppe alors le trajet optique des photons photoluminescents depuis la molécule émettrice jusqu'à la face du cœur optique. Cependant, les valeurs des coefficients d'extinction molaire à la longueur d'onde d'émission (605 nm) sont relativement faibles dans les deux états rédox de la molécule ($\epsilon_{\text{Ru(II)}} = 20 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et $\epsilon_{\text{Ru(III)}} = 200 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[162] L'effet de filtre interne secondaire

semble donc négligeable. Ainsi, seul l'effet d'émission isotrope des molécules joue un rôle dans la discrimination longitudinale des photons constituant le signal. Dans la fraction de photoluminescence collectée, il est primordial de ne recueillir que les photons émis à proximité du cœur, afin de retranscrire au plus juste la concentration locale. Le parcours des photons « indésirables », c'est-à-dire émis dans les zones de recouvrement lointain, est toutefois bien atténué. En effet, la contribution des photons lointains diminue très vite en fonction de la distance (fonction décroissante de d^2). En conséquence, il semble donc que la contribution la plus importante au signal collecté provienne des photons émis aux distances les plus proches du cœur. Ainsi, le recours à une forte concentration $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se justifie aussi totalement du point de vue de l'efficacité de collecte de la photoluminescence par un cœur. En effet, la forte concentration diminue la profondeur d'illumination. Cela conduit à une plus grande population de molécules $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ près de la surface du faisceau, où le recouvrement est minimum mais aussi où la collecte de la photoluminescence est la plus efficace. Le confinement de la zone explorée permet ainsi de décomposer l'échantillonnage en zone indépendante pour chaque cœur qui devient, en quelque sorte, un capteur local.

Nous avons analysé de manière qualitative les facteurs de confinement longitudinal, du système, c'est-à-dire suivant l'axe X (Figure 7). On a ainsi montré que c'est la concentration qui est le facteur crucial de la résolution spatiale chimique. La preuve expérimentale a aussi été démontrée (Figure 6), puisque le profil de photoluminescence à 30 mM correspond exactement au profil de concentration théorique sur la majeure partie de la couche de diffusion. Cependant, lorsque l'on tente l'acquisition en utilisant la concentration de 30 mM mais avec la fibre d'ouverture numérique 1, le profil de photoluminescence reste nettement éloigné du profil de théorique (résultat non présenté). Le recouvrement est alors important même à très courte distance du faisceau, et le confinement longitudinal dû à la diminution de profondeur de pénétration de l'excitation n'est pas alors plus suffisant pour créer les bonnes conditions de résolution spatiale. Ainsi, la combinaison des deux conditions expérimentales (forte concentration et faible ouverture numérique) est indispensable.

Notre étude de la résolution spatiale reste, cependant, qualitative et s'appuie sur la confrontation de profils expérimentaux et d'un profil théorique. Des travaux ont été réalisés antérieurement dans le but d'étudier quantitativement le recouvrement des zones de sondage de fibres optiques adjacentes. Quelques modèles simplifiés ont ainsi été décrit afin d'analyser théoriquement l'effet des différents facteurs précédemment exposés (ouverture

numérique, absorbance, profondeur d'excitation, fraction collectée, etc.). Ces différents exemples partent de configurations ne comprenant que de une à six fibres optiques.^[58-62] L'idée de ces calculs était de fournir des approximations d'intégrales de recouvrement entre fibre(s) émettrice(s) et collectrice(s), dans le cadre de mesure locale de fluorescence ou de Raman. Cependant, à ma connaissance, aucun développement de ce type n'a été décrit à ce jour pour de tels faisceaux comprenant 6000 fibres optiques. Cette lacune est probablement liée à la complexité du problème optique et l'ampleur des calculs qu'elle engendre.

3.3 Etude dynamique des profils de concentration

Nous avons présenté les paramètres expérimentaux qui déterminent la résolution spatiale. L'idée de base a été de confiner optiquement la zone échantillonnée en augmentant l'absorbance de la solution et en diminuant l'ouverture numérique des fibres optiques. Pour étudier la dynamique de la couche de diffusion générée par l'électrode millimétrique, la séquence d'images de photoluminescence normalisées (figure 3) est traitée afin d'établir les profils expérimentaux à différents temps. Les conditions expérimentales fournissant une résolution spatiale adéquate sont utilisées, c'est-à-dire une concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ de 30 mM et un faisceau de fibres optiques d'ouverture numérique 0,22. La figure 9 montre les profils expérimentaux au cours de la première seconde de polarisation de l'électrode, ainsi que les profils de concentration théoriques correspondants (Equation 2).

La figure 9A correspond à des profils aux temps très courts compris entre 30 ms et 110 ms. La couche de diffusion ne s'étend alors que sur les premières dizaines de micromètres à l'électrode. L'observation la plus remarquable est le très bon accord entre les profils de photoluminescence expérimentaux et les profils théoriques de concentration. Seul le profil correspondant à $t = 30$ ms est moins représentatif du profil réel. Pour les trois autres temps représentés sur la figure, les points expérimentaux retracent très bien l'épuisement rapide de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ au cours du temps dans la couche de diffusion en expansion. Cependant, ce n'est pas le cas au voisinage immédiat de l'électrode, c'est-à-dire dans les dix premiers micromètres de la couche de diffusion. Dans cette zone où le gradient de concentration est maximal, les profils expérimentaux s'éloignent largement des profils théoriques. La figure 9B reporte sept profils expérimentaux obtenus dans la gamme de temps compris entre 100 ms et 800 ms après le déclenchement de l'électrolyse. A ces temps plus longs, l'épaisseur de la couche de diffusion s'étend progressivement à plus de 80 μm de

la surface de l'électrode. Les profils expérimentaux sont en accord avec les profils théoriques sur une large partie de la couche de diffusion. L'appauvrissement en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est maintenant plus lent qu'au cours des 100 premières millisecondes, et le gradient de concentration à l'électrode continu à décroître mais de façon plus progressive. Cette évolution est très bien représentée par les profils expérimentaux. Pour les profils aux temps longs, on remarque toutefois que l'écart à la théorie près de l'électrode demeure, et semble même s'accroître au cours du temps. Les hypothèses susceptibles d'expliquer ce phénomène de discordance seront développées au paragraphe 3.4.

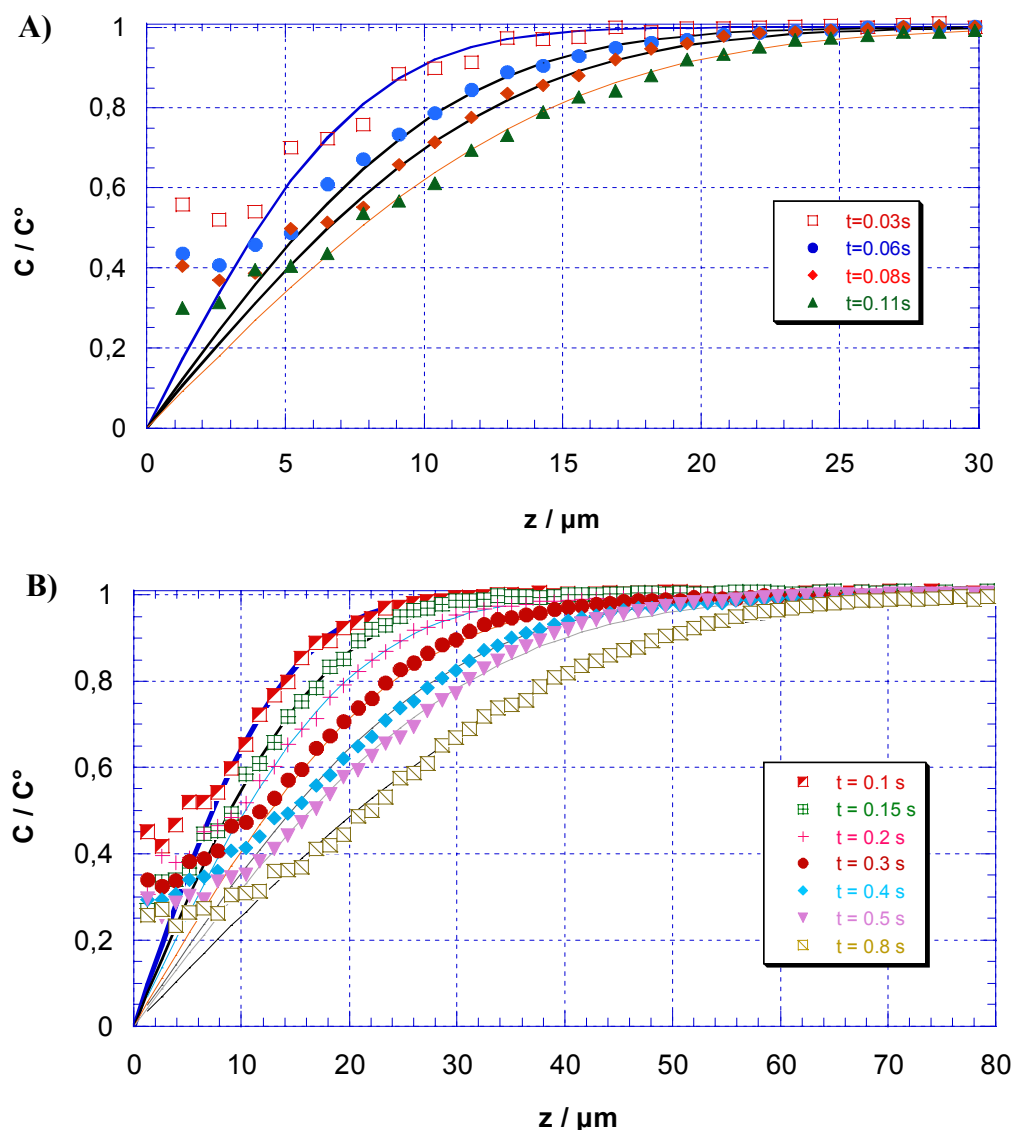


Figure 9 : Evolution des profils de concentration de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dans la couche de diffusion plane, pour les temps courts (A) et pour les temps longs (B). $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 30 \text{ mM}$; électrolyte support $\text{Na}_2\text{SO}_4 = 1 \text{ M}$; saut de potentiel à $1,2\text{V}$ vs Ag/AgCl . Les profils théoriques sont représentés par les lignes continues aux différents temps.

Les résultats de l'imagerie dynamique des profils de concentration de la figure 9 peuvent être discuté sous la forme de droites de corrélation, telles qu'elles sont présentées sur la figure 10.^[36] Chaque profil expérimental est ici représenté en fonction de l'expression théorique (Equation 2). Sur l'axe des abscisses, les points proches de 0 correspondent aux intensités photoluminescentes à proximité de l'électrode, ceux qui tendent vers 1 sont le signal au-delà de l'épaisseur maximale de la couche de diffusion. Les profils théoriques apparaissent sous la forme d'une fonction affine unique de pente égale à 1. Du fait de la normalisation par rapport au temps, tous les profils expérimentaux devraient donc se situer sur cette droite. Sous cette représentation, les points expérimentaux qui s'écartent de la droite théorique correspondent ainsi aux distances à l'électrode où le profil de photoluminescence ne reproduit plus le profil de concentration. Pour faire un parallèle avec la figure précédente, la figure 10A correspond aux corrélations des profils obtenus à temps court (inférieur à 100 ms) et la figure 10B aux profils des temps longs (de 100 ms à 800 ms). L'information est bien entendue la même que celle de la figure 9. Cependant, par cette présentation particulière des données, les écarts entre expérience et théorie sont plus visibles.

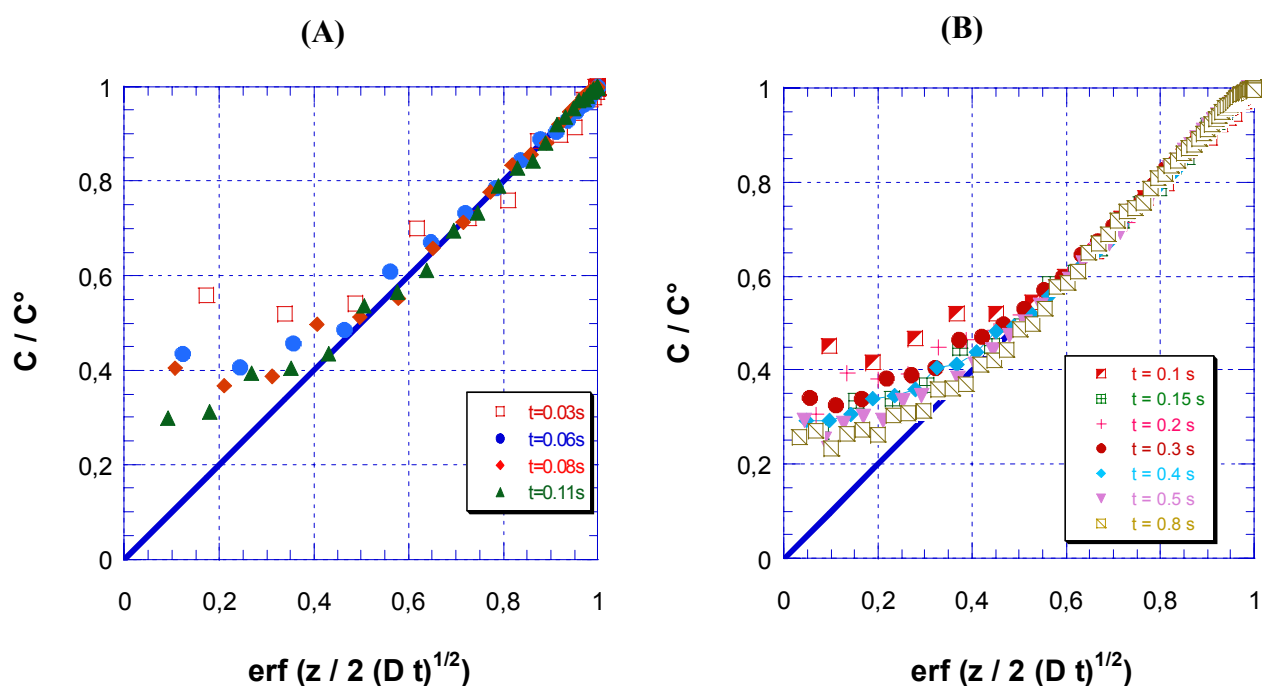


Figure 10 : Corrélation entre les profils de concentration théoriques et expérimentaux pour les temps courts (A), et pour les temps longs (B).

On observe sans équivoque que, dans l'ensemble, les profils expérimentaux se reportent en majeure partie sur la droite théorique. Pour chaque profil, en dehors de la courbe correspondant à $t = 30$ ms, on peut calculer la valeur du coefficient de corrélation linéaire. La valeur moyenne du coefficient de corrélation est très bonne, égale à $0,991 \pm 0,001$. En d'autre terme, cela confirme le bon accord, pour chacun des temps, entre les profils expérimentaux et les profils théoriques. Le phénomène d'écart à la théorie près de la surface de l'électrode, déjà mis en évidence par la figure 9, se révèle encore mieux sous cette représentation des données. La déviation systématique des points expérimentaux normalisés par valeur supérieure est très nette. En théorie, suite à la transformation du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ à l'électrode, la concentration surfacique de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est nulle. Or, la photoluminescence collectée par les cœurs les plus proches de l'électrode n'est elle pas nulle. Au contraire les profils expérimentaux s'aplatissent de façon très caractéristique à proximité immédiate à l'électrode, tendant vers une valeur minimale approchant 0,25 (Figure 10). Ainsi, le profil de concentration réel est totalement surestimé dans cette région critique d'échantillonnage, et ce quelque soit le temps d'acquisition. Nous avons également observé précédemment que l'écart semble même plus prononcé au cours du temps. Cette affirmation est ici prouvée directement. Le décrochage des points expérimentaux se prononce de plus en plus loin de la surface de l'électrode lorsque le temps de diffusion augmente. Cet écart probant à la théorie est observé de façon reproductible.

Les résultats présentés ont permis de valider notre approche d'imagerie épifluorescente appliqué au suivi dynamique du régime de diffusion plane. Toutefois, il est nécessaire de revenir sur deux limitations liées à la fenêtre de temps étudiée. La première a déjà été soulignée lors de la description de la figure 9A. Le profil expérimental à $t = 30$ ms n'est pas en accord avec le comportement théorique. Deux raisons liées à l'appareillage utilisé peuvent être invoquées pour expliquer cet écart. D'abord, l'attribution d'une valeur de temps précise n'est pas évidente pour la première image. Le problème est en partie pratique. Il peut exister en effet un décalage temporel de quelques millisecondes entre le déclenchement de la séquence d'image et le début de l'électrolyse. Ensuite, l'affaiblissement du gradient de concentration à la surface est extrêmement rapide au cours des premières dizaines de millisecondes. La durée d'exposition de l'image (10 ms) ne peut plus être considérée comme négligeable pour ces temps très courts. L'investigation du régime de diffusion transitoire ne peut donc pas se faire dans une fenêtre de temps comprise dans les

50 premières millisecondes. La seconde limitation est liée à l'évolution de la mesure des profils réalisée au delà d'une seconde après l'application du saut de potentiel. Les profils de photoluminescence ne correspondent plus alors de façon précise aux profils théoriques. L'expérience montre que lorsque le temps d'électrolyse augmente, cette distorsion s'accroît d'autant plus. Dans notre expérience, la solution est immobile. Cela implique que l'effet de convection ne devrait se faire sentir qu'après plusieurs secondes.^[37] Cette divergence est probablement liée à un transport de matière induit par une convection additionnelle. Cependant, notre montage expérimental provoque également des vibrations parasites. Ces vibrations sont induites par le dispositif de refroidissement Peltier de la caméra CCD. Celui-ci est indirectement fixé sur la table optique où repose le système électrode/faisceau optique. Dans le cas présent, ce phénomène convectif limite notre expérience dynamique à la première seconde du régime transitoire de diffusion.

3.4 Etude des écarts observés près de la surface de l'électrode

Cette méthode d'imagerie de la couche de diffusion plane d'une électrode permet d'obtenir correctement l'allure des profils de concentration de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en fonction du temps. Cependant, près de la surface de l'électrode, les profils expérimentaux surestiment largement la valeur de la concentration locale prévue théoriquement. La compensation de cet écart n'a pas pu être obtenue expérimentalement. La déviation observée entre l'expérience et la théorie est un phénomène reproductible et qui évolue au cours du temps (figure 10). En effet, comme on peut le voir sur la figure 9, l'écart semble être plus prononcé pour les temps les plus longs. Pour $t=100$ ms, l'accord est bon jusqu'à une distance de ~ 8 μm à partir de l'électrode. Par contre, pour $t = 800$ ms, le décrochage se produit vers 15 μm . Afin de clarifier l'origine de cette déviation, nous avons exploité les données dynamiques des profils expérimentaux. Dans le but de comprendre qualitativement l'origine supposée de cette distorsion, les pistes explorées concernent principalement trois effets : la réflexion sur l'électrode, l'effet mirage relatif à un gradient d'indice de réfraction, et un effet dynamique de filtre interne lié à un gradient d'absorbance.

3.4.1 Réflexion par la surface de l'électrode ?

Etant donné la configuration frontale utilisée dans ces expériences et que l'écart est observé au voisinage immédiat de la surface de l'électrode, il est possible que la distorsion

soit liée à un effet de réflexion de la lumière émanant des coeurs optiques sur la surface de l'électrode. L'électrode employée dans cette série d'expériences est en carbone vitreux. Le carbone est plutôt un matériau absorbant dans le domaine de la lumière visible. Cependant, une première possibilité est la réflexion des photons sur la surface de l'électrode, ce qui modifierait l'intensité mesurée pour des faibles distances. Une vérification expérimentale simple est effectuée pour tester cette hypothèse. La valeur de l'intensité est mesurée pour deux positions du faisceau. Dans le premier cas, le faisceau est en contact direct avec la surface de l'électrode, comme pour les expériences classiques. Dans le second cas, le faisceau est relevé et il se trouve loin de l'électrode au sein de la solution. La concentration est identique pour les deux expériences (30 mM de Ru(bpy)₃³⁺). Dans les deux cas, aucune réaction électrochimique à l'électrode n'est induite. Aucune différence significative n'est constatée selon la position du faisceau (images non présentées). On peut donc en conclure que la réflexion lumineuse sur la surface de carbone vitreux n'est pas un phénomène qui modifie l'intensité mesurée à proximité de l'électrode.

3.4.2 Effet « mirage » ?

Une autre possibilité d'expliquer cet écart est associée à l'indice de réfraction local de la solution. En effet, le trajet de la lumière peut être courbée lors de la traversée d'un milieu d'indice de réfraction inhomogène. Ce phénomène est couramment appelé « effet mirage ».^[118, 119] Il a été utilisé en électroanalyse pour étudier des réactions de transfert de charges en photoélectrochimie,^[127] des gradients de concentrations,^[120-122] ou des flux ioniques lors du stockage de charges dans un film électroactif.^[123, 125] L'indice de réfraction dépend de facteurs tels que la température, la densité ou la concentration en espèces dissoutes. Dans notre échantillon liquide, c'est uniquement l'effet mirage dû à la concentration qui peut intervenir. En effet, le gradient de concentration près de l'électrode est susceptible d'induire un gradient d'indice de réfraction. La distribution spatiale de l'indice de réfraction étant une fonction de la seule coordonnée Z, (la valeur de l'indice est constante dans les plans parallèles à la surface de l'électrode), et le mode d'illumination du faisceau étant frontal, la propagation de la lumière est normale à la direction du gradient d'indice de réfraction. L'angle de déviation θ qui infléchit la lumière à travers la solution est de ce fait défini suivant l'axe Z. L'expression de cet angle est définie par rapport au gradient d'indice de réfraction :^[119]

$$\theta = \frac{L}{n_m} \left(\frac{\partial n}{\partial z} \right) \quad \text{Equation 4}$$

Le coefficient de proportionnalité fait intervenir la longueur du chemin optique L de la zone traversée où l'indice n est pas uniforme, et l'indice de réfraction n_m du milieu non perturbé. L'équation 4 peut être présentée en fonction du gradient de concentration $\partial C/\partial z$,^[174] afin d'obtenir l'expression du gradient d'indice de réfraction dans la solution électrolysée :

$$\theta = \frac{L}{n_m} \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right) \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right) \quad \text{Equation 5}$$

$$\frac{\partial n(z,t)}{\partial z} = \frac{C^\circ}{\sqrt{\pi D t}} \left[\frac{dn}{dC_{Ru(III)}} - \frac{dn}{dC_{Ru(II)}} \right] \exp\left(\frac{-z^2}{4Dt}\right) \quad \text{Equation 6}$$

C° est la concentration initiale de la solution (30 mM). D est le coefficient de diffusion. Il est considéré comme identique pour les deux espèces, $Ru(bpy)_3^{2+}$ et $Ru(bpy)_3^{3+}$. Le gradient dépend de la différence entre la valeur de la dérivé de l'indice n avec les concentrations respectives de l'espèce consommée et de l'espèce produite ($dn/dC_{Ru(II)} - dn/dC_{Ru(III)}$). Dans le cas présent, où les deux états rédox sont des espèces solubles et diffusantes, on peut s'attendre à un terme très petit car deux gradients opposés interfèrent dans la couche de diffusion. En revanche, comme le gradient est proportionnel à la concentration initiale en $Ru(bpy)_3^{2+}$, le fait d'utiliser une solution concentrée ($C^\circ = 30$ mM) peut avoir une influence plus importante sur la déviation optique. Cette relation montre, de même, que le gradient d'indice de réfraction est beaucoup plus marqué pour un temps court et une distance proche de l'électrode. C'est précisément à cette distance que la profondeur de pénétration est plus forte, et donc que le chemin optique L des molécules de $Ru(bpy)_3^{2+}$ vers le faisceau d'imagerie augmente. Or, comme on l'a discuté plus haut, la contribution, à l'intensité mesurée, de molécules située loin du faisceau diminue très rapidement avec la distance. En d'autres termes, pour un long chemin optique, l'effet mirage est plus prononcé (Equation 4) mais l'émission est moins initiée et moins efficacement collecté. En conséquence, il est raisonnable de penser que le gradient d'indice de réfraction soit la cause d'une déviation de la lumière émise par les molécules de $Ru(bpy)_3^{2+}$ en direction des coeurs. Soulignons enfin que nous considérons, dans cette étude, que le gradient d'indice de réfraction local du milieu (n_{milieu}) joue un rôle négligeable sur la valeur de l'angle d'acceptance des coeurs optiques (cf. Equation 1).

L'effet mirage est directement relié au gradient de concentration (Equation 3). Si cet effet est responsable de l'écart observé, la différence entre l'expérience et la théorie devrait se produire pour une même valeur du gradient de concentration. La figure 11 représente l'écart relatif entre les points expérimentaux et les points théoriques en fonction du gradient de concentration à différent temps.

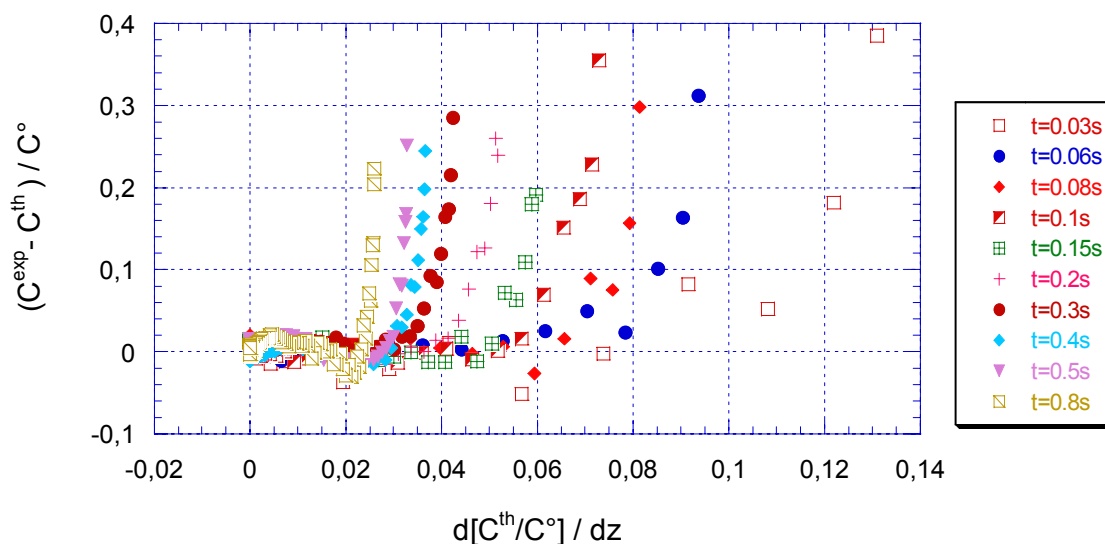


Figure 11 : Evolution de la divergence relative entre les données expérimentales et théoriques en fonction de l'amplitude du gradient de concentration.

Les valeurs de pente proches de zéro correspondent donc aux distances éloignées de l'électrode, distances supérieures à l'épaisseur de la couche de diffusion ($80 \mu\text{m}$). L'écart entre les points théoriques et expérimentaux est très faible à longues distances (gradient de concentration inférieur à $0,02$), ce qui signifie, comme on l'avait précédemment observé, que les profils de photoluminescence sont très représentatifs des profils de concentration. On peut clairement observer que l'écart, pour les différents temps, se creuse pour des valeurs différentes du gradient de concentration. Cette figure semble donc montrer que l'effet mirage est probablement négligeable dans nos conditions expérimentales. Il n'est donc pas à l'origine des distorsions observées près de la surface de l'électrode.

3.4.3 Effet de filtre interne primaire ?

Le troisième phénomène qui peut contribuer aux écarts observés près de l'électrode est l'effet de filtre interne primaire. Il se manifeste du fait de la valeur élevée du coefficient d'extinction molaire de la molécule de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. En effet, après le saut de potentiel, la

quantité de molécules $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ décroît très fortement dans le volume de solution près de la surface de l'électrode, la concentration s'annulant à la surface (Equation 2). En contrepartie, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ est généré à sa place dans ce même espace.

La figure 11 présente les profils de concentrations, à $t=100$ ms, de l'espèce $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ qui est consommée (Equation 2). Pour tracer ces profils, le coefficient de diffusion est considéré, en première approximation, comme identique pour les deux formes rédox de la molécule. Dans la zone proche de l'électrode où l'on a observé les écarts les plus importants, l'appauvrissement progressif en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et l'apparition de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ se produisent simultanément. Ces fortes variations de concentration sur une distance assez courte peuvent être à l'origine de la perte de résolution spatiale, en induisant des variations locales prononcées de l'absorbance. En effet, comme nous l'avons déjà précisé, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ absorbe fortement à la longueur d'onde d'excitation 485 nm ($\epsilon_{\text{Ru(II)}} = 4200 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) alors que $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ est une espèce nettement moins absorbante ($\epsilon_{\text{Ru(III)}} = 600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[162] Les valeurs des coefficients d'extinction molaire des deux états rédox de l'espèce diffusante sont donc très différentes.

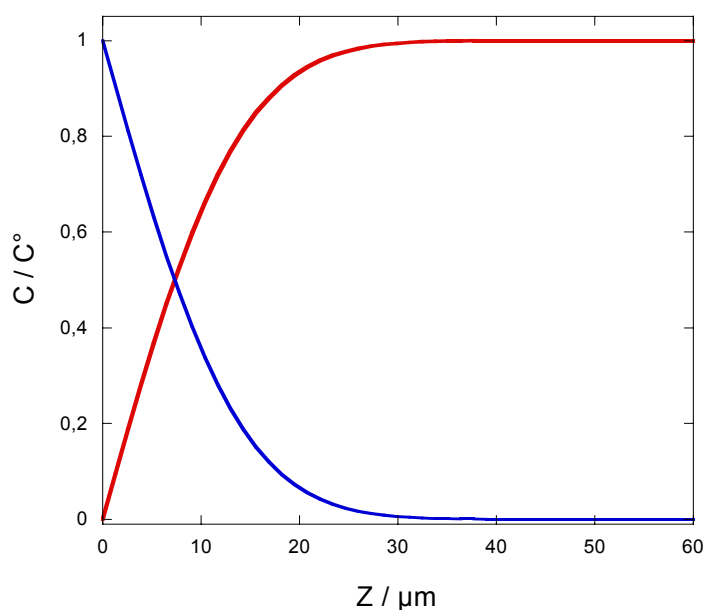


Figure 12 : Profils de concentrations de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (bleu) et de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (rouge) à $t = 100\text{ms}$ après le saut de potentiel. $D = 5,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

De ce fait, suite au saut de potentiel, l'absorbance locale de la solution diminue très fortement. La perturbation électrochimique induit donc une modification de l'absorbance en fonction de la distance à l'électrode Z . On obtient alors un « gradient d'absorbance ». La profondeur de pénétration de la lumière excitatrice près de l'électrode devient elle aussi

fonction de la distance à l'électrode. Elle augmente de façon très significative du bord du faisceau, c'est-à-dire pour les cœurs en contact avec la surface, vers le centre du faisceau. Cette augmentation de la profondeur d'illumination peut également conduire aux recouvrements entre cônes d'acceptance voisins, et donc être la cause de la perte de la résolution spatiale.

Cet effet intrinsèque à l'expérience peut être la cause de la distorsion qui affecte très significativement la résolution spatiale dans les dix premiers micromètres à l'électrode. Puisque l'absorbance locale est essentiellement liée à la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, la différence entre les points expérimentaux et théoriques devrait donc se produire, quelque soit le temps, pour une même valeur de concentration locale en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. De façon similaire à la figure précédente, la figure 13 représente donc l'évolution de la différence relative entre les points expérimentaux et les points théoriques en fonction de la concentration normalisée de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

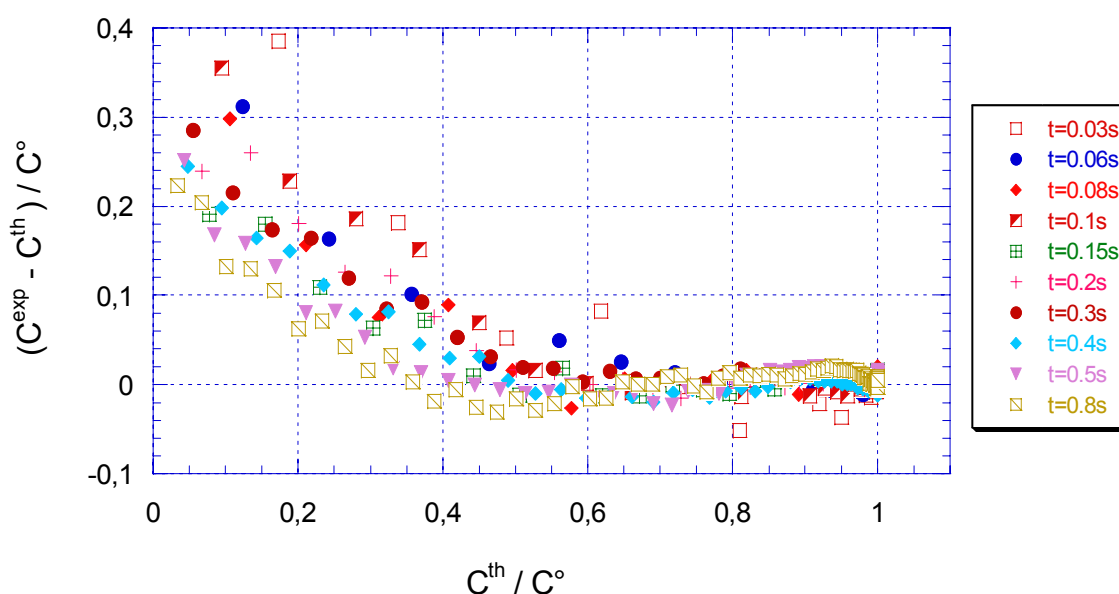


Figure 13 : Evolution de la divergence relative entre les données expérimentale et théoriques en fonction de la concentration de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

Ces courbes mettent en évidence que les écarts théorie/expérience aux différents temps semblent se produire pour une valeur donnée de la concentration (~12-15 mM). En effet, à part pour $t = 30$ ms, on peut voir que les courbes se superposent assez bien. La divergence se produit pour la même valeur de concentration pour toutes les courbes. En

conséquence, l'atténuation de l'effet de filtre interne primaire, lié à l'appauvrissement en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ de l'interface, semble induire les écarts observés près de la surface de l'électrode.

Ce phénomène limite donc la performance de notre protocole d'imagerie de couche de diffusion pour les distances très proches de la surface de l'électrode. Une explication qualitative de ce phénomène peut être donnée si l'on raisonne à partir du gradient d'absorbance exprimé sous la forme d'un gradient de profondeur d'illumination des cœurs. En effet, les cœurs les plus proches de l'électrode vont échantillonner la photoluminescence sur une distance nettement plus éloignée. L'augmentation de la profondeur de pénétration des cœurs proches de l'électrode peut alors causer un recouvrement entre les cônes voisins, provoquant une surestimation globale de la concentration locale par le signal spatialement résolu de photoluminescence. Le phénomène électrochimique est donc lui-même la cause de la perturbation de l'observation, puisque la résolution spatiale liée au confinement longitudinal des cônes optiques est altérée par les variations brutales des concentrations en espèce $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$.

A partir des données dynamiques, il est donc possible de proposer une explication sur l'origine des écarts mesurés près de la surface de l'électrode. L'effet d'un gradient de filtre interne primaire semble être le principal facteur de distorsion.

4. Conclusion

Nous avons développé une approche originale pour obtenir l'image globale des profils de concentration générés à une macroélectrode. Cette méthode repose sur l'imagerie à distance au moyen d'un faisceau cohérent de fibres optiques, en combinant ainsi plusieurs aspects provenant de l'optique et de l'électrochimie. Elle permet de réaliser la cartographie en temps réel d'une couche de diffusion plane lors de sa structuration. Les avantages de cette approche sont, d'une part, que la totalité de la couche de diffusion est visualisée avec une seule image. D'autre part, l'échelle de temps d'acquisition résolue à la dizaine de millisecondes est un avantage majeur, d'autant plus qu'elle permet un enregistrement de la dynamique du phénomène en temps réel.

La résolution spatiale du système d'imagerie est obtenue par confinement optique de la photoluminescence à l'échelle d'un cœur optique individuel. Elle ne dépend pas ainsi des seules propriétés du faisceau d'imagerie, mais aussi de la maîtrise des paramètres physico-chimiques de la solution. Nous avons étudié l'influence des paramètres expérimentaux qui jouent sur la résolution spatiale. Le premier facteur est relatif à l'ouverture numérique des fibres optiques, permettant de confiner transversalement les cônes d'illumination de chaque fibre optique. Le second est associé à l'utilisation d'une solution concentrée en espèces absorbantes, afin de minimiser la profondeur d'échantillonnage par confinement longitudinal. Une perspective intéressante pour travailler sur la résolution spatiale du système serait de parvenir à collimater la lumière émergeant de chaque cœur du faisceau. Ce système qui s'appuierait sur l'utilisation de microlentilles collées à l'extrémité du faisceau permettrait dans un premier temps de s'affranchir de la très forte concentration de la solution employée. Dans un second temps, ce nouveau système pourrait servir de support de connaissances pour étudier l'effet d'une propriété locale d'une solution sur la forme et la dimension des volumes d'échantillonnage d'un faisceau de fibres optiques. L'évaluation correcte et l'optimisation de la résolution spatiale de telles fibres d'imagerie sont essentielles pour des applications en tant que capteurs fluorimétriques adaptés à l'étude de phénomènes de flux chimique non homogènes dans des champs d'applications très variés.

Les profils de concentration dynamiques déduits des images de photoluminescence sont en très bon accord avec les profils théoriques. Cependant, dans la zone immédiatement adjacente à l'électrode, des écarts importants subsistent. Il semble que cette divergence soit liée à la formation d'un gradient d'absorbance qui dégrade la résolution spatiale. Cet effet de filtre interne primaire pourrait cependant être exploité à l'avenir pour cartographier un réactif non-fluorescent.^[171] Cette approche complémentaire serait alors basée sur la détection indirecte par fluorescence d'une espèce non fluorescente, mais qui absorbe différemment la lumière excitatrice selon son état rédox. Ce nouveau concept d'imagerie physico-chimique pour visualiser des phénomènes de transport de matière a été validé par l'étude de ce système modèle de diffusion plane. Une autre perspective de ce travail serait d'étudier la diffusion à des électrodes de géométries variées, comme par exemple la diffusion à une ultramicroélectrode bande. Dans ce cas, le potentiel d'imagerie de l'ensemble du faisceau de fibres optiques pourrait être exploité.

CHAPITRE 2 :

DEVELOPPEMENT D'UN RESEAU DE CAPTEURS OPTO-ELECTROCHIMIQUES : APPLICATION A L'IMAGERIE PAR ELECTROCHIMILUMINESCENCE

1. Introduction

L'électrochimiluminescence (ou chimiluminescence électrogénérée) est le phénomène d'émission de lumière qui est initié par un transfert électronique se produisant directement à la surface de l'électrode. La molécule luminescente impliquée dans le processus se retrouve *in fine* à l'état excité suite à une réaction initiale hétérogène de transfert d'électron. Les mécanismes électrochimiques qui aboutissent à créer un état excité radiatif en solution au voisinage de l'électrode sont divers et peuvent être classés arbitrairement selon 4 variétés de réactions.^[175, 176]

- L'initiation électrochimique d'une réaction chimiluminescente classique comme, par exemple, l'oxydation du luminol.
- La réaction en phase homogène entre un complexe luminescent redox et un co-réactif.
- Le transfert d'électron énergétique entre des espèces organiques ou inorganiques (hydrocarbures polycycliques ou complexes de métaux de transition) générés soit indépendamment à deux électrodes voisines soit par des sauts alternés de potentiel. Un état excité émetteur est alors créé par une réaction d'annihilation entre un oxydant et un réducteur forts. Un exemple classique est la réaction entre $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ et $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$.
- La luminescence cathodique de certains oxydes métalliques recouvrant une électrode.

Bien qu'observé auparavant dans les années 1920,^[177,178] le phénomène d'électrochimiluminescence fut pour la première fois étudiée méthodiquement à la fin des années 1960. Les premiers systèmes électrochimiluminescents découverts employaient des molécules aromatiques polycycliques comme le diphenylantracène ou le rubrène qui sont impliqués dans un mécanisme suffisant en énergie.^[179,180] Depuis, d'innombrables investigations ont porté sur l'électrochimiluminescence, essentiellement pour en comprendre les aspects mécanistiques fondamentaux, en particulier ceux impliquant les complexes de ruthénium.^[181] L'électrochimiluminescence constitue aujourd'hui une classe importante des techniques électroanalytiques et bioanalytiques.^[182,183] Dans ce domaine, le recours à l'électrochimiluminescence a fait l'objet de nombreux travaux en vue de réaliser des biocapteurs enzymatiques extrêmement sensibles^[184] ou comme marqueurs dans les domaines de l'immunologie et des biopuces à ADN.^[185] L'électrochimiluminescence offre de nombreux avantages intrinsèques par rapport à la chimiluminescence qui est plus conventionnelle. En effet, le réactif impliqué dans la réaction électrochimiluminescente est

généralisé à la demande et *in situ* à la surface de l'électrode. Le déclenchement, la durée, la position et la taille de l'émission lumineuse peuvent être manipulés électrochimiquement. De plus, il s'agit d'une technique particulièrement attractive en chimie bioanalytique étant donné la sensibilité, la large gamme de concentration mesurable, la sécurité d'utilisation, la simplicité de l'appareillage requis et son faible coût.

Comme son nom l'indique très justement, l'électrochimiluminescence associe intimement les aspects électrochimiques et photochimiques. Le phénomène est enclenché par une étape initiale électrochimique, mais les informations collectées sont de natures aussi bien électrochimiques que photochimiques. De plus, l'électrochimiluminescence donne accès à la détection de nombreux analytes, en offrant simultanément la mesure de deux signaux dépendant du potentiel : une intensité lumineuse et un courant faradique. Ce genre d'approches combinées est souvent pertinent, parfois primordiale pour extraire et corréler des informations de nature variée d'un environnement donné. Les ultramicroélectrodes et les fibres optiques sont à ce titre couramment employées pour réaliser des analyses sélectives de micro-environnements. Ces deux types de capteurs présentent, du fait de leur dimension, une résolution spatiale micrométrique, voire nanométrique. Les applications analytiques particulières des ultramicroélectrodes et des fibres optiques sont conditionnées par leurs caractéristiques intrinsèques, qui dépendent fortement de leur principe de fonctionnement. Des limitations dans l'usage de ces capteurs peuvent provenir de la sélectivité, de la sensibilité, du temps de réponse, de la résolution spatiale, de la reproductibilité, de la stabilité de la mesure, etc. L'obtention conjointe d'informations électrochimiques et optiques s'avère, dans de nombreuses situations expérimentales complexes, être un point clé pour améliorer essentiellement le facteur sélectivité d'une mesure,^[186,187] mais parfois aussi pour fournir un résultat qui resterait sinon inaccessible.

Dans cet ordre d'idées, de nombreuses voies de recherches se sont orientées vers le développement de méthodes d'analyses spectroélectrochimiques combinant fibres optiques et électrodes. Quelques exemples d'approches associant simultanément mesures électrochimique et optique, dans une même fenêtre de temps et au sein du même espace d'analyse, sont présentés au paragraphe 2 ci-dessous. Ces approches reposent principalement sur l'électrochimiluminescence et la fluorescence. Dans la suite, nous présentons la fabrication, la caractérisation et les applications d'un micro-système nanostructuré de détection combinant propriétés électrochimiques et propriétés d'imagerie à

distance. Notre démarche s'inspire de notions et de concepts de natures différentes, à la frontière de l'électrochimie, de l'optique et des microscopies à champ proche. Ce nouvel outil est constitué d'un réseau d'électrodes de taille submicrométrique conservant l'architecture du faisceau cohérent de fibres optiques qui est utilisé comme support pour sa fabrication. Il a été caractérisé par des techniques d'analyses de surface comme la cartographie Auger et la microscopie AFM. L'étude du comportement électrochimique du réseau est abordée en utilisant la voltammétrie cyclique ainsi que l'électrochimiluminescence. Les applications analytiques de cet outil sont ensuite détaillées en présentant les performances d'imagerie électrochimiluminescente à distance avec des systèmes modèles.

2. Développement d'un réseau de capteurs opto-électrochimiques

2.1 Ultramicroélectrodes, ensembles, réseaux

Les ultramicroélectrodes sont par définition des électrodes dont au moins une des dimensions caractéristiques est d'ordre micrométrique ou inférieur.^[4] Les ultramicroélectrodes sont devenue depuis une vingtaine d'années des outils analytiques d'une importance majeure. Leurs propriétés remarquables ont permis d'explorer de nouveaux domaines et champs disciplinaires inaccessibles jusqu'alors à l'électrochimie classique. Cette extension s'est accompagnée en parallèle d'un approfondissement des connaissances en sciences électrochimiques. Elles ont ainsi ouvert des voies d'analyses tout à fait originales vers des secteurs d'études comme, par exemple, la biologie ou la chimie environnementale. Elles se présentent sous diverses géométries et configurations : disque, hémisphère, cavité, cylindre, bande, etc.^[5, 6, 188-190] Les plus usuelles ont une forme de disque qui est la plus facile à fabriquer et qui permet un renouvellement de la surface par simple polissage.^[4, 191] La méthode de fabrication la plus répandue utilise des microfibres conductrices en platine, en or ou en carbone. Une fibre est introduite puis isolée jusqu'à son extrémité dans un capillaire en verre ou en plastique finement étiré par fusion locale.^[192, 193] La famille des électrodes à fibre de carbone est couramment employée pour répondre aux problématiques de la biologie. Leur impact est particulièrement important pour l'étude des mécanismes cellulaires fondamentaux^[14, 17, 194] ou pour la détection sélective d'exocytose de messagers chimiques comme les neurotransmetteurs ou les hormones.^[11, 13, 15] Du fait de leur

taille, elles permettent des analyses cellulaires avec une résolution de quelques milliers de molécules.^[14] Par ailleurs, dans cette géométrie disque, elles sont utilisées de façon courante comme sonde locale en microscopie électrochimique à balayage (cf. Chapitre 1) ou encore en tant que capteur et biocapteur pour l'identification et le dosage de biomolécules.^[195, 196] Ces utilisations exploitent grandement l'une des propriétés les plus importantes des ultramicroélectrodes : l'obtention de courant stationnaire. Nous reviendrons un peu plus tard sur les phénomènes qui gouvernent la diffusion au voisinage d'une ultramicroélectrode. Le transport par diffusion suit en effet un régime non linéaire, à l'origine de l'allure particulière des réponses ampérométriques des ultramicroélectrodes. D'autres facteurs qui déterminent les performances des ultramicroélectrodes sont exploités pour des applications bien ciblées. Par exemple, la chute ohmique, introduite par la résistance de cellule, est constante et de valeur très faible lorsque le régime stationnaire est atteint. Cette dissipation d'énergie faisant suite au passage du courant à travers un milieu résistif est ainsi minimisée, du fait du resserrement des lignes de courant à la surface de l'ultramicroélectrode.^[14] L'une des applications non conventionnelles de ce type d'électrode est donc l'électrochimie dans les milieux résistifs: milieux visqueux tels que les gels et polymères,^[197, 198] solvants organiques aprotiques^[199] et milieux non ioniques,^[200, 201] mélange gazeux,^[202] etc. De plus, le courant capacitif qui est proportionnel à la surface active de l'électrode est minimisé par rapport aux électrodes de taille conventionnelle. Comme, au contraire, la densité de courant faradique augmente du fait du régime de diffusion non linéaire, c'est le rapport signal sur bruit qui s'en trouve significativement amélioré. Cette propriété est exploitée pour l'analyse d'ultra-traces ($< 10^{-9}$ M) avec une haute sensibilité, du fait entre autre de la possibilité d'enregistrer des courants extrêmement faibles (inférieure au picoampère).^[13, 199] Par ailleurs, la capacité interfaciale engendre une constante de temps de cellule très faible, d'où résulte un temps de réponse extrêmement court. La voltammétrie à balayage de potentiel très rapide est ainsi une des utilisations remarquables des ultramicroélectrodes.^[203-207] Elle est utilisée, entre autre, pour l'analyse sélective de sécrétions biologiques, basée sur les différences de cinétiques de transferts d'électrons entre l'analyte et les espèces qui interfèrent.^[17, 208]

Les réseaux sont composés d'une collection d'ultramicroélectrodes disposées dans un plan commun selon un arrangement qui peut être désordonné ou aléatoire (on parlera alors d'« ensemble ») ou ordonné (on parlera formellement de « réseau »).^[209] Les ensembles sont relativement faciles à préparer, du fait que l'on ne cherche pas à obtenir un pavage régulier du plan. La méthode la plus répandue aujourd'hui est basée sur le procédé

« template synthesis »^[209-212] dont le principe a été historiquement introduit il y a plus de vingt ans.^[213] Il implique globalement deux étapes : d'abord la création de matrices (polycarbonates) mésoporeuses contenant des canaux cylindriques, suivi d'une étape de déposition électrochimique d'un métal,^[214] d'un semi-conducteur,^[212] ou encore d'un polymère conducteur.^[211] Le remplissage de ces pores artificiels par un matériel conducteur abouti à un ensemble d'électrodes de même taille relativement bien calibrée, micrométrique^[209] ou nanométrique.^[215] Dans un ensemble, les dimensions des électrodes et les distances inter-électrode varient aléatoirement à l'échelle de quelques microns, mais plus généralement les distances caractéristiques approchent le nanomètre. Les réseaux réguliers et périodiques sont en revanche fabriqués par des techniques plus lourdes, souvent par microlithographie.^[216-218] Le principe général de la microlithographie repose sur la déposition et la microgravure de couches successives de matériaux isolants et conducteurs. Ces technologies permettant de recouvrir des surfaces planes par des films fins de matériaux d'électrode tels que le platine, l'or, l'iridium^[219] ou le carbone,^[220] selon des architectures contrôlées et reproductibles. D'autres méthodes de fabrication, hybrides entre la photolithographie et la gravure par faisceau d'ions,^[221] ou encore par encre imprimable^[222] ont été élaborées. Les réseaux se présentent sous la forme de microdisques disposés en arrangement quadratique ou hexagonal,^[223] ou sous forme de microbandes identiques et parallèles.^[224, 225] Chaque électrode d'un réseau possède un rayon ou une largeur au plus de l'ordre de quelques micromètres. La distance régulière entre deux électrodes voisines d'un réseau, ou période, est en général de quelques microns. Cette valeur est limitée par le procédé de fabrication. La dimension globale des réseaux n'excède pas le millimètre. Les électrodes constituant les réseaux ordonnés et les ensembles sont usuellement connectées collectivement, c'est-à-dire que toutes les électrodes opèrent simultanément au même potentiel. Cependant, selon le procédé microlithographique employé, certains réseaux peuvent également être adressables, c'est-à-dire que le potentiel de chaque électrode est contrôlé indépendamment par un multipotentiostat.^[224] Ce n'est pas le cas pour les ensembles aléatoires, puisqu'il n'est pas possible avec les méthodes actuelles de préparation, d'adresser séparément les électrodes. Les ensembles ne fonctionnent donc que sous le mode interconnecté. En analyse électrochimique, sous certaines conditions liées essentiellement à l'arrangement géométrique des électrodes, les réseaux et les ensembles interconnectés préservent la principale propriété des microdisques individuels, c'est-à-dire l'obtention de courant stationnaire. Mais, du fait de l'amplification du signal faradique, ces outils jouissent d'un meilleur rapport signal/bruit et d'une plus grande sensibilité.^[210, 226] Les applications

actuelles des réseaux ordonnés et des ensembles interconnectés sont consacrées à l'analyse environnementale. La détection sélective de traces de métaux lourds, par exemple dans les eaux naturelles a fait l'objet de travaux utilisant des réseaux^[219, 223, 227, 228] ou des ensembles.^[229] Des réseaux ont également été utilisés comme capteur ampérométrique de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène dans des eaux de bassins.^[230, 231] Le développement de capteurs électrochimiques^[210] et de biocapteurs enzymatiques^[232] sont d'autres voies actuelles d'applications des ensembles. Les principales propriétés de ces outils analytiques sont la rapidité de la réponse et la limite de détection qui est bien meilleure par comparaison avec une macroélectrode de même aire géométrique.

Lorsque les techniques lithographiques ont été introduites en électrochimie, il est devenu possible de créer des réseaux d'ultramicroélectrodes adressables. Les premiers étaient constitués de deux ou plusieurs microbandes, espacées de quelques micromètres.^[233] Ce type de réseaux d'électrodes bandes a également été fabriqué commodément à partir de feuillets métalliques calibrés,^[201] ou par dépôt de films métalliques ultrafins sur des plaques de mica.^[234] Dans cette configuration, l'une des dimensions de l'électrode est alors millimétrique. Le courant généré par une bande n'atteint pas une valeur stationnaire mais il dépend au contraire du temps. Chaque bande est portée à un potentiel différent, permettant de les utiliser en mode générateur/collecteur.^[235, 236] Pour les couples rédox réversibles, la forme oxydée est générée à l'une des électrodes (anode). Du fait de la proximité des deux électrodes et du recouvrement entre les couches de diffusion de chaque bande voisine, celle-ci diffuse dans la couche de solution recouvrant l'espace inter-électrode et elle est reconvertie dans sa forme réduite par la seconde électrode adjacente portée à un potentiel suffisamment réducteur (cathode). Dans ce schéma, l'espèce régénérée diffuse en retour vers l'électrode génératrice, ce qui produit alors localement une quantité additionnelle de réactifs. La répétition des oxydations et réductions successives sur chaque électrode adressable conduit ainsi à une amplification des courants anodiques et cathodiques. Les applications électroanalytiques de ces réseaux exploitent cette propriété d'amplification par les cycles rédox, ce qui conduit à des limites de détection extrêmement faibles.^[237] L'efficacité de collection est définie comme le rapport du courant de l'électrode génératrice sur le courant de l'électrode collectrice. Elle est d'autant meilleure que la distance inter-électrode est petite. Dans la littérature, le système générateur /collecteur a été utilisé pour la détection femtomolaire de catécholamine,^[238] ou d'acétaminophène avec une limite de détection de 50 nM.^[220] L'une des premières exploitations technologiques de réseaux de bandes adressables

a été le développement de plateformes à micro-transistors moléculaires,^[239, 240] ou à microdiodes électrochimiques,^[241] par fonctionnalisation des microélectrodes avec des polymères conducteurs. Le concept de plateformes analytiques intégrant une photodiode sous-jacente à deux bandes adressables, est particulièrement intéressant en électrochimiluminescence.^[242] L'électrochimiluminescence, créée à la suite de l'annihilation des deux formes rédox d'un luminophore générées indépendamment à chacune des électrodes, est alors collectée par la photodiode au niveau de l'espace inter-bande.^[243] Les réseaux d'ultramicroélectrodes adressables employés dans d'autres types d'applications sont constitués de microdisques adressables.^[233] Les propriétés de ces réseaux démontrent des potentialités très importantes, notamment pour l'imagerie électrochimique et biochimique.^[244, 245] A la différence de la microscopie électrochimique à balayage, l'analyte peut être détecté à plusieurs endroits en même temps, permettant l'imagerie de profils de concentration en temps réel. Parmi les premiers exemples décrits avec des systèmes modèles, on peut citer l'imagerie ampérométrique de la distribution d'oxygène, de peroxyde d'hydrogène ou encore de glucose, réalisée au moyen d'un réseau de 400 microdisques adressables de platine.^[246] La durée moyenne pour obtenir l'image entière correspond au temps nécessaire pour interroger successivement les 400 électrodes. Ce fonctionnement est performant grâce aux systèmes de multiplexage électronique, permettant d'adresser avec une forte fréquence chacune des microélectrodes.^[247] La durée totale d'acquisition de l'image est alors dans la gamme des millisecondes. L'imagerie de l'activité neuronale avec des réseaux de neurones ou directement dans le cerveau sont des voies particulièrement prometteuses pour l'utilisation de réseaux multiplexés.^[248, 249] L'imagerie d'événements biologiques comme l'exocytose cellulaire est aussi un champ d'application important.^[250, 251] Une voie annexe de développement de réseaux adressables concerne la conception de supports électrochimiques destinés à la détection parallèle de plusieurs analytes. Elle a notamment été démontrée pour la détection simultanément de glucose, de lactate et d'acide urique.^[252] Les avancées récentes dans les procédés de nanofabrication permettent désormais de poursuivre la miniaturisation des réseaux adressables. Des exemples récents de développement de réseaux de bandes d'or ayant une largeur submicrométrique ont été décrits.^[253] Une autre architecture de réseaux électrochimiques se présente sous la forme de microcavités électrochimiques, où chaque cavité possédant deux microélectrodes enfouies et adressables.^[254] Récemment, ce type de structure a été utilisé comme support d'analyse ultraconfinée par voltammétrie cyclique à balayage très rapide de volumes de solution de l'ordre du picolitre.^[255]

2.2 Capteurs opto-électrochimiques

Dans certains dispositifs spectroélectrochimiques décrits dans la littérature, des fibres optiques sont incorporées afin d'assurer le guidage et la mesure à distance du signal spectroscopique généré au voisinage de l'électrode. La fibre optique est placée très près de l'électrode, mais elle est séparée physiquement de celle-ci. Des géométries de cellules ont ainsi été construites pour réaliser ce couplage, soit pour étudier des processus interfaciaux à l'électrode (par transmission ou réflexion),^[256] soit pour détecter des molécules électroactives dans une couche de diffusion avec un chemin optique parallèle à l'électrode.^[257] Afin de faciliter ce type d'expériences spectroélectrochimiques, toute une variété de capteurs a été développée, où les fibres optiques sont physiquement associées avec les matériaux d'électrode. L'une des premières configurations décrites est basée sur l'enrobage coaxial de fibres optiques dans une électrode constituée d'un composite de graphite et d'époxy.^[258] Le principe des mesures effectuées avec ce type d'outils était la modulation électrochimique de la fluorescence générée et collectée par la fibre optique. L'incorporation du matériel conducteur au niveau de la fibre optique assure un degré de sélectivité supplémentaire pour la mesure. En effet, le capteur est alors capable de détecter *in situ* le signal spectral d'une espèce rédox spécifiquement générée par la réaction électrochimique. Les progrès dans la miniaturisation de ce type de capteurs sont essentiellement dus à l'incorporation d'ultramicroélectrodes directement à l'extrémité d'une fibre optique.^[259] Le procédé consiste à déposer un revêtement d'or à l'extrémité d'une fibre optique, qui était ensuite tronquée de telle sorte que l'or forme un micro-anneau adjacent à la surface. L'anneau d'or y joue le rôle d'une ultramicroélectrode pour effectuer des réactions électrochimiques, tandis que le cœur de la fibre optique agit comme une source d'illumination locale ou comme collecteur de lumière. La première démonstration analytique de cet outil a été la détection du peroxyde d'hydrogène qui est généré photochimiquement par la fibre optique et ensuite détecté électrochimiquement avec l'ultramicroélectrode.^[260] Des applications en analyse *in vivo* ont également été reportées.^[261] L'évolution de ces dispositifs tend vers la miniaturisation et donc maintenant vers l'échelle nanométrique. Une électrode submicrométrique de forme anneau est alors réalisée autour de l'extrémité effilée d'une fibre optique.^[52] Dans ce cas, l'idée est essentiellement de combiner la microscopie électrochimique à balayage et la microscopie à champ proche optique. Les potentialités de telles sondes à champs proche ont été évaluées

théoriquement^[262] et expérimentalement.^[52,263,264] Cette extension de la microscopie électrochimique à balayage est par exemple destinée à l'imagerie par électrochimiluminescence. La lumière peut en effet être générée de façon stable et confinée à la pointe de l'opto-électrode submicrométrique. Le spot lumineux peut être déplacé à la surface d'un échantillon, afin de le visualiser et de le caractériser avec une résolution spatiale latérale atteignant celle de la microscopie à champ proche optique (entre 50 et 150 nm).^[52, 265, 266] Une autre application qui illustre l'intérêt pour ces sondes est la microscopie photoélectrochimique. Ainsi, l'analyse de l'activité électrochimique de la surface d'un disque composite en titane et oxyde de titane a été démontrée par l'acquisition simultanée en mode SECM et en cartographie photoélectrochimique.^[267, 268]

Les premiers exemples sont relatifs à l'ajustement d'une mini-grille d'or à la surface d'une fibre optique, qui a été caractérisée par électrochimiluminescence.^[269] Un faisceau désordonné de fibres optiques a également été utilisé, en l'introduisant de façon coaxiale dans une grille cylindrique de platine ainsi que dans une « mini-cage » de platine massif, et où le flux de solution circule perpendiculairement au faisceau.^[270] A côté de ces outils « hybrides », la surface d'une fibre optique peut être directement métallisée par dépôt d'une couche mince semi-transparente de platine ou d'or.^[174, 271] L'épaisseur de cette couche de métal déposée est très fine afin de conserver la semi-transparence de la surface et permettre le passage de la lumière à travers la fibre optique.^[272] D'autres développements sont basés sur l'utilisation plus récente d'oxydes semi-conducteurs. Le recouvrement de la surface d'une fibre optique par dépôt d'un oxyde d'indium dopé à l'étain, ou ITO, permet ainsi de créer une couche fine en même temps conductrice et totalement transparente.^[273] Ces fibres optiques à surface conductrice, ou « électroptodes », sont par exemple des supports adaptés à la création d'assemblages électro-affine de biomolécules (basés sur le système avidine/biotine) par électropolymérisation de polypyrrole. La préparation de tels immunocapteurs basés sur la chimiluminescence a aussi été décrite.^[274, 275]

Récemment, un ensemble désordonné de capteurs opto-électrochimiques a également été développé.^[276] Cet assemblage aléatoire d'opto-électrodes est fabriqué à partir d'un ensemble désordonné d'environ 600 fibres optiques, chacune de 25 μm de diamètre. L'extrémité de chacune des fibres est d'abord recouverte de nanoparticules d'or par dépôt « electroless », puis d'un revêtement isolant constitué d'une monocouche thiol auto-assemblée. L'ensemble est finalement enrobé dans de l'époxy. Les fibres optiques modifiées

sont alors disposées en parallèle formant, sur l'une des faces, un réseau d'ultramicroélectrodes de forme anneau. Cependant, du fait de son arrangement désordonné, ce dispositif ne possède aucune propriété d'imagerie. D'autres approches qui reposent sur les faisceaux cohérents de fibres optiques (ou fibre d'imagerie) ont été proposées. Ce domaine de développement est tout à fait nouveau et les exemples de la littérature sont peu nombreux. Une macroélectrode basée sur une fibre d'imagerie a été développée pour la détection du peroxyde d'hydrogène.^[271] La face polie d'un faisceau cohérent de fibres optiques a été recouverte d'une couche semi-transparente d'or, puis d'une couche polymérique contenant un fluorophore rédox sensible à H₂O₂. Le fluorophore consommé par réaction avec H₂O₂ pouvait être régénéré dans le film par une réaction électrochimique à la surface de l'or. Un dispositif similaire a été appliqué à la détection *in situ* de NADH par électrochimiluminescence.^[277] Ce coenzyme réagit de façon catalytique avec un médiateur rédox comme le complexe Ru(bpy)₃³⁺ au sein d'une couche polymérique. Le complexe est ensuite régénéré par application d'un potentiel oxydant imposé *via* le film d'or sous-jacent. Cependant, la possibilité d'imagerie à distance de ce type de réseaux n'a pas été démontrée. Les idées présentées ci-dessus permettent de situer le contexte de nos travaux et d'en orienter les applications possibles. Notre but est de fabriquer un réseau d'électrodes submicrométriques ayant une propriété de transmission optique. Dans l'idée directrice de ce projet, ce réseau ordonné doit non seulement être doué de propriétés électrochimiques mais aussi être capable de transmettre complètement une image chimique spatialement résolue.

2.3 Fabrication du réseau de capteurs opto-électrochimiques

Les différentes étapes de fabrication sont inspirées des techniques de fabrication des nanoélectrodes^[278,279] et des nanosondes optiques pour les microscopies à champs proches.^[280, 281] Dans notre approche, la surface polie d'un faisceau de 6000 fibres optiques est modelée en trois étapes afin de créer une architecture de surface présentant des propriétés originales d'imagerie chimique.

2.3.1 Fabrication d'une structure ordonnée de nanopointes

La première étape est la fabrication d'un réseau de nanopointes à partir de la face polie d'un faisceau cohérent de fibres optiques. La méthode que l'on emploie repose sur la dissolution chimique sélective (ou « etching »).^[282-284] La préparation d'une solution

d'attaque chimique convenable, à base d'acide fluorhydrique et de fluorure d'ammonium, solution extrêmement corrosive pour les verres de silice, est décrite dans la Section Expérimentale. Cette méthode par dissolution se distingue nettement des procédés les plus usités pour la fabrication de nanosondes optiques.^[285, 286] En effet, les fibres optiques sont plus généralement effilées sous l'effet conjugué d'une source de chaleur ponctuelle (filament incandescent ou laser) et d'une masse solidaire de la fibre support. La méthode consiste alors à chauffer la fibre jusqu'au point de fusion du matériau, et la rupture au niveau de la zone chauffée et étirée sous l'effet du poids appliqué crée alors deux segments de fibres dont l'extrémité est de dimension nanométrique. Le contrôle des divers paramètres physiques (température, pression, etc.) est bien sûr essentiel pour obtenir la dimension souhaitée de l'extrémité de la fibre. Cette technique, largement répandue dans le cas de sonde nanométrique unique, n'est pas applicable dans le cas d'un faisceau de fibres optiques pour obtenir un réseau de nanopointes. En effet, le faisceau entier serait alors effilé. Son diamètre global diminue, donc celui des cœurs également, mais ces derniers ne se sont pas effilés séparément l'un de l'autre. Ce procédé peut par contre s'avérer intéressant pour obtenir un faisceau de fibre optique à forte densité de cœurs.

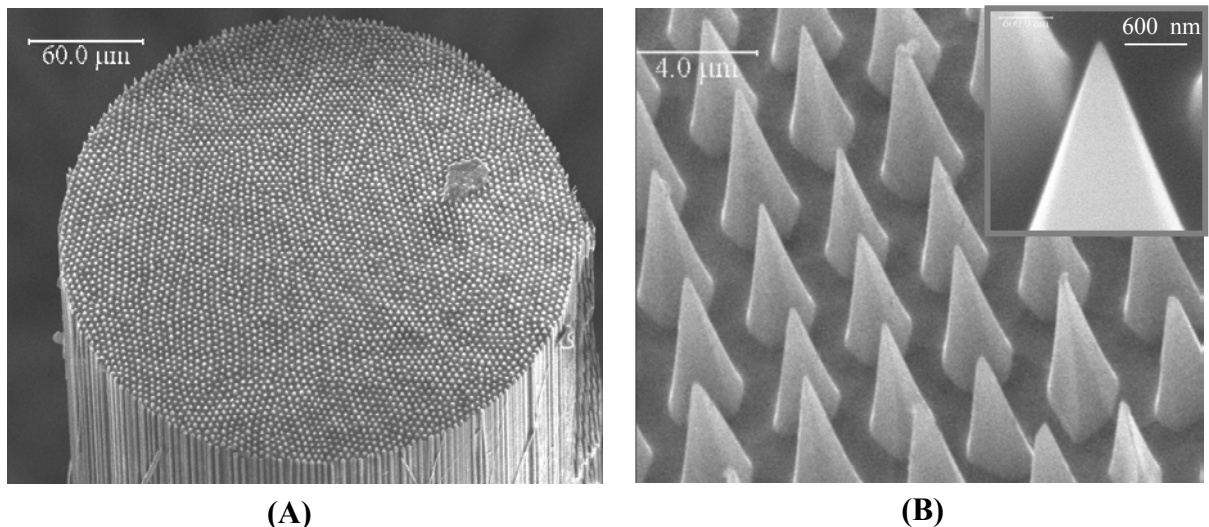
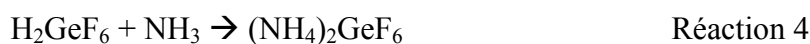
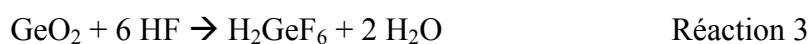
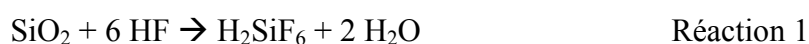


Figure 1. (A) Image de microscopie électronique de l'extrémité d'un faisceau d'imagerie de 6000 fibres optiques. (B) Région représentative de la surface après dissolution chimique sélective. Encadré : une seule nanopointe à fort grossissement.

La réalisation de cette première étape dérive d'une combinaison de procédés auparavant décrits dans la littérature.^[287-290] La figure 1 montre le résultat de la dissolution chimique sélective réalisée à l'une des faces planes d'un faisceau d'imagerie de 6000 fibres optiques individuelles.

Ces images de microscopie électronique à balayage fournissent directement la vision de la surface du faisceau après l'attaque acide. La figure 1A représente la totalité de l'aire de transmission optique, de diamètre égal à 270 μm . A fort grossissement (figure 1B), on peut clairement visualiser la structure ordonnée de pointes obtenue la surface du faisceau à la suite du traitement chimique. Pour cette surface structurée, la position de chaque pointe correspond exactement à celle d'un cœur optique du faisceau initial. Le traitement de la face du faisceau dans la solution remplit deux tâches. La première est de dissoudre la gaine entourant chaque coeur individuel sur plusieurs micromètres de profondeur. La seconde est d'effiler les cœurs optiques en cône extrêmement fins et réguliers. La hauteur de ces cônes varie de 3 à 5 micromètres. Les cœurs optiques individuels possèdent initialement un diamètre de 3 à 4 micromètres. Par conséquent, la dimension de la base des pointes est de diamètre similaire. La grandeur qui permet de caractériser la dimension d'une pointe est son rayon de courbure apparent, estimé par des images de microscopie électronique à très fort grossissement (image encadrée sur la figure 1B) comme étant de l'ordre de 50 nanomètres.

L'action de la solution d'attaque chimique sur le faisceau d'imagerie est basée sur la différence de constitution chimique des cœurs et de la gaine optique. Leur constituant commun est la silice ultrapure. L'avantage d'utiliser ce matériau pour fabriquer des faisceaux est qu'il permet d'obtenir des diamètres de fibre très petits (3-10 μm).^[291] Les cœurs sont constitués de silice dopée en germanium. Cela a pour effet d'augmenter l'indice de réfraction de la silice. La gaine optique est en silice dopée en fluor, ce qui décroît l'indice de réfraction du matériau ($n_{\text{coeur}} > n_{\text{gaine}}$). Les réactions chimiques intervenant dans la dissolution chimique sélective sont présentées ci-dessous :^[287, 288]



Les réactions 1 et 2 correspondent au processus d'attaque humide de la silice pure par l'action successive de HF et de NH_3 . Les réactions 3 et 4 représentent le même processus pour l'oxyde de germanium. La formation de nanopointes au niveau des cœurs résulte de la différence de vitesse de dissolution des cœurs par rapport à celle de la gaine. En effet, les cœurs dopés à l'oxyde de germanium se dissolvent plus lentement que la gaine dopée en

fluorure.^[292] En d'autre terme, la réaction 3 limite le processus de dissolution des coeurs par rapport à la gaine car elle est plus lente que la réaction 1. Le composé fluoré $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$ formé par la réaction 2 est plus soluble que la composé $(\text{NH}_4)_2\text{GeF}_6$ issu de la réaction 4. L'observation en microscopie électronique à balayage de la surface à l'issue de cette première étape est révélatrice de l'efficacité du procédé pour créer un réseau comprenant 6000 nanopointes. L'architecture de surface que l'on a obtenue par la méthode de dissolution sélective permet d'utiliser les nanopointes comme des capteurs optiques individualisés et adressables. Nous verrons au Chapitre 3 qu'à l'issue de cette première étape, nous possédons d'ores et déjà un réseau ordonné de sondes optiques potentiellement intéressant pour des applications en microscopie en champ proche optique (SNOM). Dans ce même chapitre, nous présenterons les propriétés optiques particulières de ce réseau.

Dans notre travail, les conditions expérimentales ont été optimisées (temps de traitement, proportions du mélange, vieillissement de la solution etc.), pour obtenir un résultat reproductible. On peut observer toutefois qu'il existe une certaine disparité dans la taille des nanopointes d'un même réseau. Le rayon de courbure varie d'une pointe à l'autre entre 30 et 60 nanomètres. Nous avons observé qu'en fonction du temps de dissolution et de la composition de la solution, le profil géométrique des pointes peut être modifié. Dans notre cas (NH_4F en excès), des temps de dissolution trop courts (inférieur à 20 minutes) conduisent à l'obtention de pointes où l'extrémité est aplaniée. C'est pourquoi la dissolution est réalisée suffisamment longtemps pour obtenir des pointes de profil parfaitement régulier jusqu'à l'extrémité. Par ailleurs, l'angle des cônes est d'autant plus petit que la concentration en NH_4F augmente. En revanche, lorsque HF est en excès, la dissolution conduit non pas à un réseau de nanopointes mais au contraire à un réseau de microcavités creusées au niveau des coeurs.^[293] Ce second type d'architectures structurée a été utilisée pour le développement de plateforme à détection optique orienté vers les réseaux de capteurs à ADN (www.illumina.com),^[294] les nez artificiels,^[295] les réseaux de biocapteurs utilisant des cellules vivantes,^[296] ou encore la détection multianalyte d'ions par des billes fluorescentes.^[297]

2.3.2 Dépôt d'un film d'ITO

Le réseau de nanopointes n'est, à ce stade de la préparation, qu'un outil de détection purement optique. Une structure similaire a été utilisée par exemple comme réseau de capteurs à pH par recouvrement des pointes avec un photopolymère contenant de la

fluorescéine.^[291] Dans d'autres travaux, la surface d'un réseau de nanopointes était recouverte d'une mince couche d'or.^[80, 143] Dans ce cas, l'opacité de la couche d'or empêchait la transmission de la lumière à travers le faisceau, ce qui par conséquent limite les applications d'imagerie à distance. Pour résoudre ce problème, il est essentiel de remplacer le film d'or par un dépôt conducteur qui soit également transparent. L'oxyde d'indium dopé à l'étain, ($\text{In}_2\text{O}_3/\text{SnO}_2$), ou ITO, est un matériau qui présente les caractéristiques voulues, étant à la fois conducteur et transparent à la lumière visible. L'idée de recouvrir une surface par une couche d'ITO pour en faire un conducteur transparent est maintenant un procédé technologique très développé notamment pour les dispositifs optoélectroniques (verres électrochromes, écrans plats, etc.),^[298] pour développer des cellules spectro-électrochimiques,^[299] ou des électrodes modifiées destinées à la détection d'ADN,^[300, 301] ou encore des biocapteurs ampérométriques.^[273, 302] L'exploitation des propriétés de l'ITO pour rendre conductrice une surface de fibre optique n'a été décrite que très récemment.^[274, 275]

L'ITO est un oxyde semi-conducteur extrinsèque de type n. L'élément dopant, l'étain tétravalent Sn^{4+} incorporé dans la matrice In_2O_3 , se comporte comme un donneur d'électrons, se qui crée un niveau d'occupation électronique accessible aux électrons de valence dans la bande interdite de In_2O_3 . Si cet oxyde est un très bon matériau d'électrode dans l'ensemble, ses propriétés électrochimiques dépendent fortement des paramètres de microstructure du film, c'est-à-dire de la composition et de l'arrangement atomique dans le film (degré de cristallinité, texture et rugosité de la surface, pourcentage d'étain, etc.). La microstructure est elle-même dépendante de la procédure de dépôt et du recuit. Les procédures classiques de dépôt sont la déposition chimique en solution ou en phase vapeur,^[303, 304] l'évaporation réactive,^[305] ou la pulvérisation cathodique d'un plasma en courant continu ou alternatif.^[306-308] L'influence de la microstructure de films ITO sur la réponse électrochimique en voltammétrie cyclique de systèmes rédox modèles a notamment été étudiée.^[307]

Les dépôts d'ITO réalisées sur les réseaux de nanopointes sont effectuées par pulvérisation cathodique en courant alternatif radiofréquence. Le détail de cette procédure de dépôt est reporté dans la Section Expérimentale. La méthode par pulvérisation offre deux avantages majeurs. En premier lieu, elle permet de contrôler très finement la stœchiométrie de l'oxyde. Ce point est essentiel pour les propriétés de transmission optique et de conductivité électrique. En second lieu, l'étape de recuit du film peut être évitée.^[308, 309]

La figure 2A présente une vue schématique montrant le réseau en coupe transverse avant et après le dépôt d'ITO. Comme on le remarque sur la figure 2B montrant l'image de microscopie électronique de la surface du réseau de nanopointes recouvertes d'ITO, la procédure de dépôt utilisée est tout à fait adaptée pour recouvrir l'ensemble de la surface avec un film mince d'ITO.

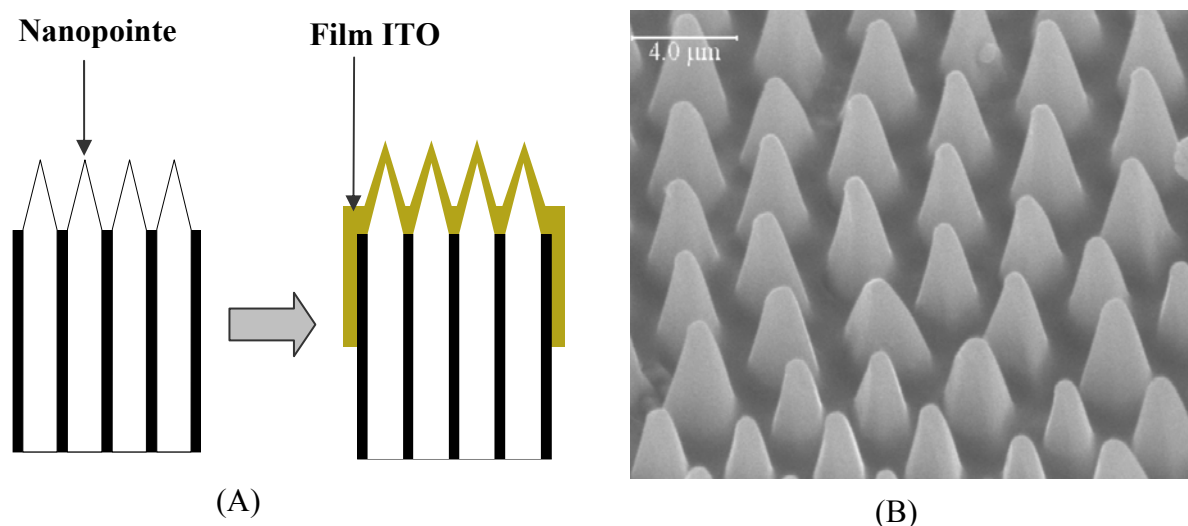


Figure 2 : (A) Représentation schématique d'une partie du réseau en coupe transverse, avant dépôt et après dépôt du film d'ITO. (B) Image de microscopie électronique à balayage d'une région représentative de la surface du réseau de nanopointe entièrement recouverte d'ITO.

Ce film respecte parfaitement l'architecture ordonnée du réseau de pointes obtenue à l'étape précédente. La mesure de la résistivité électrique du film est très délicate à réaliser au niveau de la surface du réseau. C'est pourquoi le dépôt d'ITO est réalisé en parallèle sur le réseau et sur une plaque de verre, ce dernier substrat permettant de vérifier la conductivité de l'ITO.^[308] L'épaisseur générale de ce film peut également être estimée par la microscopie électronique à balayage au niveau de la tranche de la plaque de verre. Pour nos expériences, l'épaisseur d'ITO varie de 300 à 500 nanomètres. Un des intérêts du film d'ITO est sa stabilité sur une large gamme de potentiel, notamment en oxydation. Cette caractéristique constitue un atout d'importance pour les applications en électrochimiluminescence (partie 3). Comme il est schématisé sur la figure 2A, le contour du faisceau d'imagerie est également recouvert d'ITO, ce qui permet une mise en contact électrique de la surface avec un fil conducteur. La connexion et le revêtement latéral d'ITO sont ensuite enduits de peinture isolante, ne laissant comme seule surface électroactive apparente que le réseau de nanopointes.

2.3.3 Isolation par dépôt d'une peinture électrophorétique

A partir de cette surface nanostructurée conductrice, la dernière étape de fabrication consiste à déposer un revêtement isolant. Une nouvelle procédure permettant d'isoler individuellement les nanopointes a été mise au point. Nous avons eu recours au protocole de dépôt électrophorétique, décrit dans la littérature auparavant pour préparer des électrodes submicrométriques.^[278, 310, 311] En général, deux procédures peuvent être différenciées. La première implique une seule étape, où le recouvrement de l'extrémité nanométrique d'une électrode conique est évité au cours du processus de dépôt. Ces méthodes utilisent des matériaux isolants déposés par fusion autour de l'extrémité effilée de l'électrode. C'est le cas des méthodes employant un capillaire en verre,^[312] ou des polymères. Ce procédé crée une électrode submicrométrique enfouie au sein du matériau isolant.^[278] La seconde méthode se fait en deux étapes, d'abord par une isolation complète de l'objet, puis par un décapage physique ou chimique de l'isolant qui est localisé à l'extrémité.^[279] Pour isoler notre réseau, la procédure employée se fait en deux étapes. La première est l'électrodéposition d'une peinture électrophorétique, procédé dérivé des cataphorèses industrielles. La seconde étape est la cuisson du film de peinture électrophorétique fraîchement déposé qui est thermorétractable.

La figure 3 illustre le résultat à l'issue de cette étape d'isolation. La figure 3A est la vue schématique en coupe transverse du réseau finalement obtenu. Cette architecture particulière est liée aux différentes étapes de fabrication. Successivement, on obtient la dissolution sélective des coeurs optiques donnant des nanopointes, le recouvrement par un film d'ITO conducteur et transparent, et enfin l'isolation de l'ensemble de la surface par la peinture, à l'exception de l'apex des nanopointes. La figure 3B est l'image de microscopie électronique de la surface du réseau après le dépôt de peinture. Clairement, on peut voir que les nanopointes ITO sont maintenant isolées, les unes des autres, par la couche de peinture déposée de façon très homogène. Seules les extrémités des pointes ne sont pas recouvertes. Cette observation semble ainsi démontrer que nous avons bien fabriqué un réseau d'électrodes submicrométriques, transparentes et régulièrement espacées. L'isolation contrôlée de la surface ordonnée des nanopointes ITO est l'étape la plus délicate de la fabrication. Dans les travaux antérieurs décrivant la fabrication d'un réseau de nanopointes d'or, une partie importante de la surface du réseau pouvait, en effet, être totalement recouverte par la peinture électrophorétique.^[80]

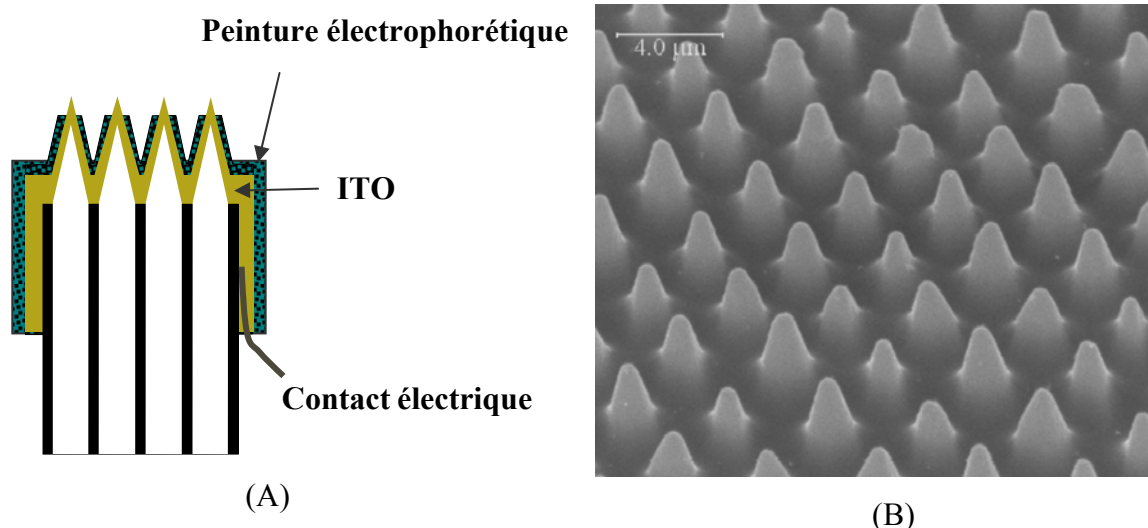


Figure 3 : (A) Représentation schématique du réseau obtenu après l'étape d'isolation (B) Image de microscopie électronique à balayage d'une région représentative de la surface du réseau isolé avec la peinture électrophorétique

Cette étape limitante de l'isolation du réseau a fait de l'objet de multiples tentatives visant à ajuster les nombreux paramètres intervenant dans le dépôt. La procédure optimisée au cours de ce travail permet maintenant d'obtenir une reproductibilité et une uniformité de dépôt très fiable (Section Expérimentale). Le réseau est placé dans une solution diluée d'une préparation aqueuse colloïdale commerciale dont nous ne connaissons pas la composition exacte. Cette peinture est une solution aqueuse contenant des micelles chargées constituées par des chaînes polymères portant des groupes pendants-NH₂.^[278] Le pH de la solution de peinture est acide de sorte que les groupes amine restent protonés et assurent ainsi la solubilité des micelles.^[278] Un balayage cathodique linéaire par rapport à une contre-électrode de platine induit, par réduction de l'eau, une augmentation du pH localisée à la surface du réseau. Ce changement de pH provoque alors la déstabilisation de la solution colloïdale et la précipitation de la peinture à la surface. Cela forme un film sur l'ensemble de la surface nanostructurée. Le dépôt s'effectue donc principalement suite au changement de pH et non par électrophorèse. A ce stade, toute la surface est donc recouverte par un film de peinture. L'étape suivante de traitement thermique du film a pour effet de faire réagir les groupes amine primaires des chaînes polymériques avec des fonctions diisocyanate également présents dans la formulation de la peinture.^[278] Le film est alors fortement réticulé. Suite à la cuisson, la peinture se rétracte, principalement au niveau de l'extrémité

des pointes qui sont les zones où la courbure est la plus accentuée. L'ensemble des étapes de fabrication aboutit donc à un réseau d'électrodes submicrométriques transparentes disposées dans la même géométrie ordonnée que le faisceau d'imagerie initial.

2.4 Caractérisations de surface du réseau

A l'issue des étapes de préparation, l'architecture particulière du réseau d'ultramicroélectrodes créée à la surface du faisceau cohérent de fibres optiques est caractérisée par différentes techniques. En plus des clichés de microscopie électronique à balayage déjà présentés, deux méthodes ont été utilisées pour obtenir des informations sur la nature et les propriétés de la surface hétérogène du réseau et ainsi valider la procédure de préparation.

2.4.1 Composition de la surface étudiée par microsonde Auger

Le réseau final a tout d'abord été caractérisé par une technique de microscopie électronique à balayage particulière appelée la microsonde d'électrons Auger.^[313] Elle s'appuie sur le couplage de la microscopie électronique à balayage avec la spectroscopie des électrons Auger (AES).^[314] Les électrons Auger sont les électrons éjectés à partir d'une couche électronique profonde d'un atome lorsque celui-ci subit un bombardement primaire ionisant provenant d'un canon électronique. Un certain nombre d'atomes sont très bien adaptés à ce type d'analyse qui est réalisée sous ultravide. Selon la nature de l'atome, ces électrons secondaires sont éjectés avec une énergie cinétique qui est caractéristique de l'atome étudié. La technique par microsonde Auger fonctionne en balayant une surface avec un faisceau collimaté d'électrons primaires à haute énergie (plusieurs keV). Les électrons Auger émis par les atomes présents dans la couche superficielle de la surface sondée sont ensuite recueillis et discriminés par élément en fonction de leur énergie cinétique. Cette technique est un outil de routine en science des matériaux, pour caractériser la distribution des éléments à la surface d'un échantillon hétérogène, latéralement ou avec une profondeur de champs de quelques nanomètres.

La figure 4 montre des images obtenues en microscopie électronique et avec la technique de microsonde Auger en balayant une région représentative d'un réseau de nanopointes ITO isolées avec la peinture électrophorétique. La figure 4A est une image de

microscopie électronique à balayage réalisé avant la cartographie Auger. Sur cet échantillon, on observe le dépôt de peinture présent entre les nanopointes, puis qui remontent le long de celles-ci jusqu'à l'extrémité.

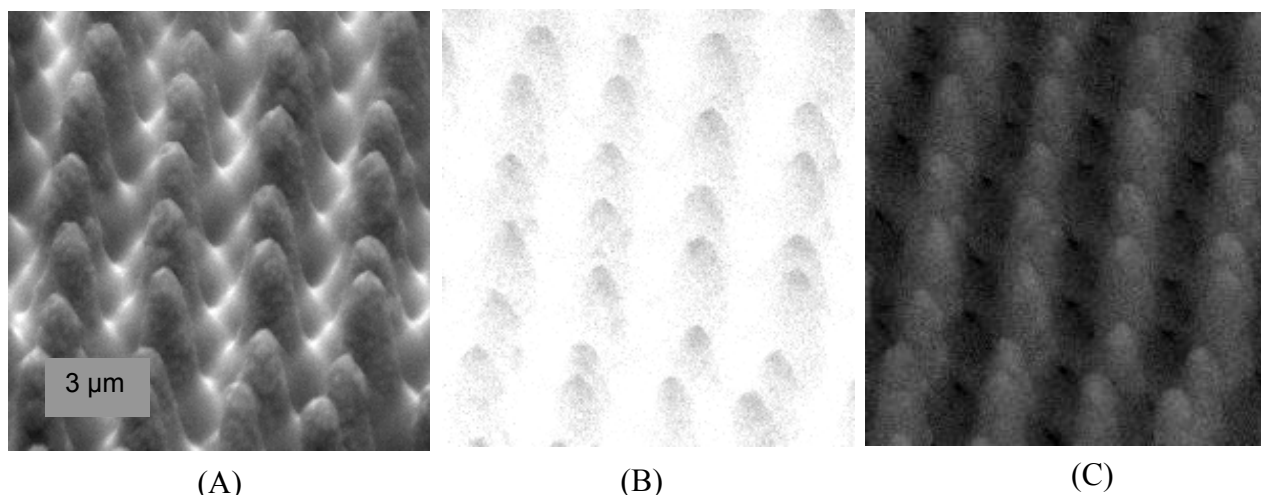


Figure 4 : (A) Image en microscopie électronique à balayage. (B) Cartographie superficielle en émission Auger de l'élément indium, et (C) en émission Auger de l'élément carbone. Les 3 images correspondent à la même région du réseau.

La figure 4B est la cartographie correspondant à la distribution à la surface du réseau des atomes d'indium. Cet élément est l'un des composants de l'ITO déposé sous forme d'un film sur la surface de silice du faisceau d'imagerie. Les zones qui apparaissent avec le plus fort contraste de gris correspondent à la présence majoritaire d'indium en surface. Les zones les plus claires sont celles où l'indium n'a pas été décelé.

En comparant cette image de l'analyse élémentaire caractéristique de l'ITO à celle de microscopie électronique (figure 4A), on s'aperçoit donc que le film d'ITO est principalement affleurant au niveau de l'extrémité des pointes. La figure 4C montre la répartition des atomes de carbone à la surface. Cet élément est l'un des principaux constituants de la peinture électrophorétique, mais pas de l'ITO. Cette image est donc en quelque sorte le négatif de la précédente. Les zones en noir indiquent la présence majoritaire de carbone. L'image C démontre clairement *de visu* que la peinture électrophorétique recouvre l'ensemble de la surface à l'exception de l'extrémité des pointes. Ces images apportent donc directement une preuve spectroscopique de la nanostructuration de la surface du réseau obtenue à partir des différentes étapes de fabrication

Avant chaque expérience, la surface de sondage est décapée par le passage d'un faisceau d'ions d'argon, permettant ainsi de nettoyer la surface d'analyse au préalable. Le nettoyage est une étape importante pour cette analyse de surface assez sensible, en particulier pour éviter la présence éventuelle de composés de contamination dispersés à la surface lors de la création de l'ultravide. Les forts contrastes de niveaux de gris sur les images résultent de la quantité d'atomes émetteurs d'électrons Auger présents dans la couche superficielle du réseau. La résolution spatiale de cette méthode d'imagerie est en général relativement bonne (de l'ordre de la dizaine de nanomètre), dépendant du diamètre du faisceau d'électrons et de son inclinaison. Cependant, la structure très accidentée de la surface perturbe l'obtention de données quantitatives précises sur les pointes. En effet, celles-ci s'écrantent l'une vis-à-vis de l'autre par rapport à l'angle d'attaque du faisceau d'électrons primaire, ce qui limite l'analyse rigoureuse de l'image. Par ailleurs, il est très difficile d'estimer la variation d'épaisseur de la couche de peinture entre l'espace interélectrode (certainement plusieurs centaines de nanomètres) et la partie supérieure des pointes. Du fait que la microsonde Auger analyse une profondeur de quelques nanomètres, il est difficile d'estimer précisément la taille de la zone où l'ITO est décelé en bout des pointes, c'est-à-dire la zone réellement électroactive d'une nanopointe. Cette cartographie spectroscopique présente toutefois un résultat qualitatif intéressant, en bon accord avec les images obtenues par microscopie électronique à balayage. La composition chimique et la topographie de la surface sont conformes aux résultats attendus suite aux différentes étapes de fabrication. Cette technique confirme, en outre, l'absence de défauts ponctuels dans le revêtement électrophorétique entre les électrodes coniques submicrométriques.

2.4.2 Caractérisation par AFM à pointe conductrice

Les procédures de caractérisation de réseaux d'ultramicroélectrodes ont très souvent recours aux méthodes d'imagerie très sensible par microscopies à champs proche (microscopie à force atomique,^[217, 253] microscopie à effet tunnel,^[167, 315] ou microscopie électrochimique à balayage,^[7, 41] etc.). Dans notre travail, nous avons utilisé un dispositif appelé « résiscope », qui est une extension de la microscopie AFM. En effet, la pointe AFM ainsi que le bras de levier sont rendus conducteurs. Cette technique qui travaille en mode contact permet d'acquérir l'image topographique classique d'une surface hétérogène obtenue avec un AFM et, simultanément l'image de la résistance électrique locale de cette même surface.^[316, 317] Pour caractériser par AFM/résiscope le réseau de capteurs

submicrométriques, le fil de connexion du réseau est placé en contact électrique avec le porte-échantillon. Lorsque le contact entre la pointe et la surface du réseau est réalisé avec une force d'appui déterminée, la pointe AFM conductrice est alors polarisée par rapport à l'échantillon. Le courant qui est alors mesuré traduit la valeur de la résistance du chemin conducteur local mesurée entre la pointe AFM et le porte-échantillon. Cette mesure électrique est réalisée en chaque point de la surface, conjointement au relevé topographique. Ainsi, une cartographie de la topographie et une cartographie de la résistance électrique locale de surface sont effectuées simultanément (Figure 5). La figure 5A représente l'image de la topographie d'une partie du réseau de capteurs tridimensionnels, obtenue par AFM. La dimension de l'image est de 80x80 μm . L'image décrit très bien la structure régulière du réseau d'électrodes coniques, tout à fait similaire à l'image observée en microscopie électronique à balayage (Figure 3B). La figure 5B montre la même surface, mais enregistré en mode résiscope. Elle se présente sous la forme d'une image électrique, pour lequel les niveaux de couleurs caractérisent la résistance locale dans un domaine de valeurs relatives comprise entre 100 Ω et 10^{11} Ω . Cette valeur de résistance représente une valeur locale et elle ne correspond pas à la grandeur macroscopique.

La distribution spatiale des zones électroactives du réseau est clairement visible. La couleur bleue correspond aux zones de plus faible résistance, c'est-à-dire aux sites électroactifs. De l'observation précise de ces images, le premier point est que la répartition spatiale des sites électroactifs correspond parfaitement aux positions des nanopointes sur le réseau observé sur l'image topographique. Le second point important à noter est que la totalité des pointes est conductrice. Les zones comprises entre les capteurs sont bien isolantes. Sur ces images, il apparaît difficile d'estimer véritablement la taille des capteurs par cette méthode. Ce manque de précision provient tout d'abord de la dimension de la pointe AFM conductrice. Si une pointe AFM possède un rayon inférieur à la dizaine de nanomètres, son revêtement conducteur est d'une épaisseur qui n'est plus négligeable et rend la forme de la pointe assez critique pour cette expérience. Celle-ci approche en effet une dimension qui est de l'ordre de grandeur des pointes du réseau. La cartographie de la résistance locale est donc la convolution du contact entre deux pointes de dimension et de géométrie quasi-identiques.

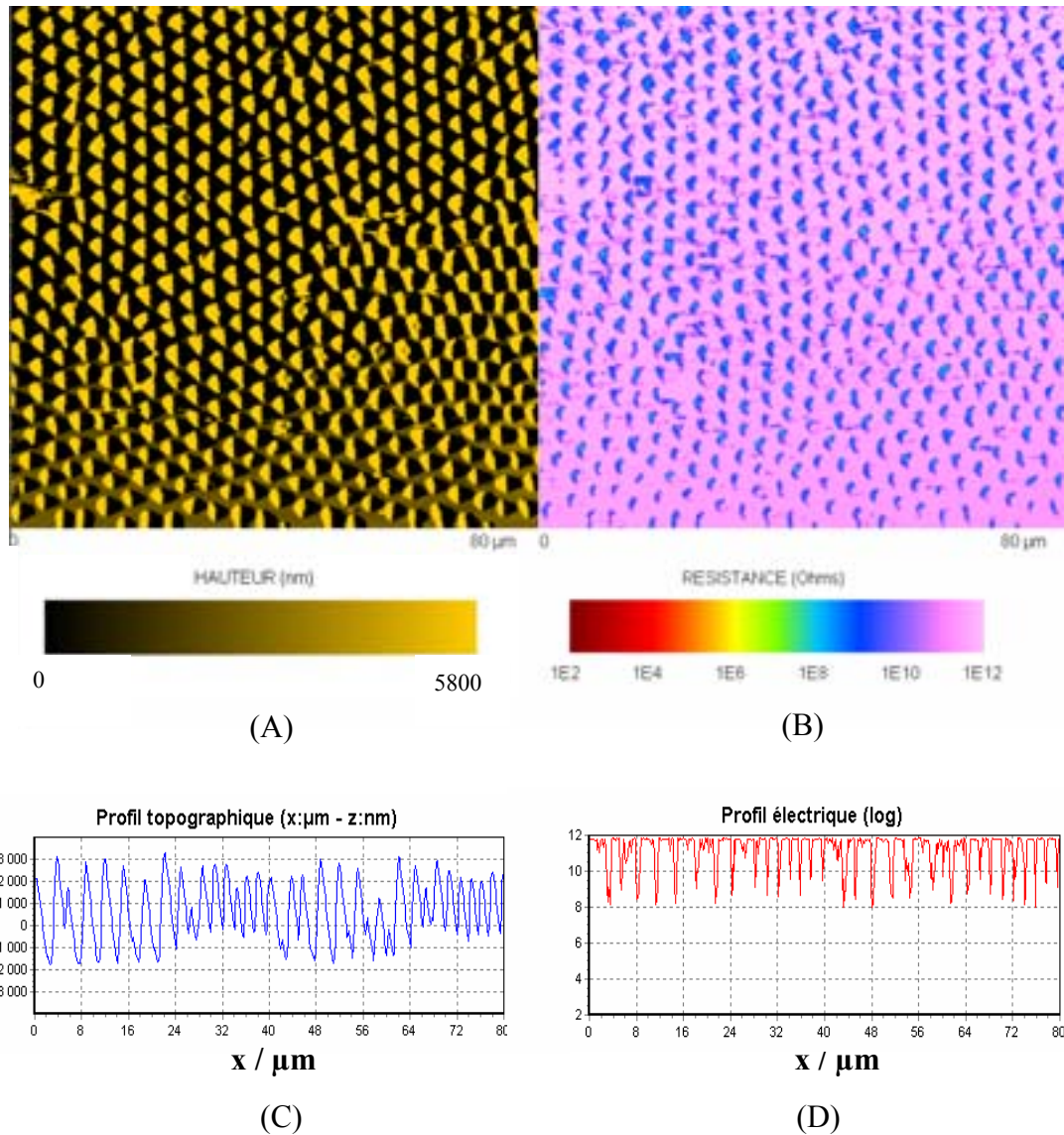


Figure 5 : (A) Images topographique et (B) électrique réalisées sur la même surface du réseau de capteurs. (C) Profils topographique et (D) électrique tracés en suivant respectivement le relief et la résistance électrique d'une ligne horizontale représentative de la surface à partir respectivement des images A et B.

Cet effet a pour résultat la forme triangulaire mal définie des spots conducteurs. Par exemple, lorsque le sens de balayage de la pointe est inversé, on inverse également l'orientation des « traces » de forme triangulaire de la figure 5B. Une autre limitation intuitive de cette technique est liée à la nature très abrupte de notre surface. Les capteurs ont une forme conique très marquée et une hauteur de quelques microns. Le système d'asservissement de la pointe AFM par mécanisme piézo-électrique suit difficilement un tel relief. D'autres remarques limitatives peuvent aussi être faites sur la rugosité de la pointe

AFM conductrice, ainsi qu'à son usure ou son érosion progressive due au contact permanent avec l'échantillon. Une expérience en mode « tapping » serait plus appropriée pour la cartographie du réseau. Cependant, dans ce mode, une mesure de résistance locale ne peut être effectuée. L'ensemble de ces considérations limite les performances de résolution spatiale de cette technique, qui reste très intéressante pour démontrer que la totalité des capteurs du réseau est fonctionnelle.

Une autre façon d'observer la correspondance relief/conductivité est de tracer un profil topographique (figure 5C) et un profil électrique suivant la même ligne (Figure 5D). Ces profils sont obtenus en sélectionnant une droite horizontale sur les images A et B. Le relief et la résistance le long de cette ligne sont reportés en fonction de la distance. Sur les figures, on observe que les positions des sommets des capteurs (figure 5C) correspondent aux positions où la résistance chute brutalement (pics de la figure 5D), c'est-à-dire aux zones où le réseau est conducteur. En effet, à chaque apex des pointes correspondent des zones conductrices. Les petits artefacts qui apparaissent sur les profils sont dus à plusieurs effets. D'abord, les pointes ne sont pas parfaitement alignées dans la direction définie par la ligne de mesure choisie. Ainsi, lors du balayage, certaines ne seront en contact avec la sonde que sur une partie montante, donc isolante, du cône et non pas à l'apex conducteur. C'est en partie pour cette raison que certains pics du profil topographique sont de hauteur moins importante que d'autres, et que précisément le pic de conduction correspondant à ce capteur est mal représenté. Malgré une mise en oeuvre délicate et l'ensemble des limitations évoquées ci-dessus, cette expérience nous permet de valider la procédure de fabrication du réseau de capteurs submicrométriques discrets. De même elle confirme les résultats de l'analyse par microsonde Auger sur la nature de la surface, mais aussi l'analyse des propriétés électrochimiques du réseau (voir ci-dessous).

2.5 Propriétés électrochimiques

2.5.1 Caractérisation par voltampérométrie cyclique

Pour aborder les propriétés électrochimiques d'un réseau, il est utile de rappeler, dans un premier temps, celles d'une ultramicroélectrode unique. Les ultramicroélectrodes se caractérisent par une réponse électrochimique qui est peu conventionnelle par comparaison avec les électrodes millimétriques.^[4,311] Il est essentiel de s'intéresser à l'origine des

phénomènes qui gouvernent la diffusion à leur voisinage. La géométrie de la couche de diffusion détermine l'allure de la réponse voltammétrique. Aux temps très courts ($t \ll a^2/D$, où D est le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive, et a le rayon d'une ultramicroélectrode disque), la diffusion se limite à la couche de solution immédiatement adjacente au voisinage de l'électrode. La couche de diffusion est plane. En mode ampérométrique, ceci conduit à un régime transitoire où l'évolution du courant est défini par la loi de Cottrell ($i \propto 1/t^{1/2}$).^[165, 192] En réalité, l'accès de la matière à l'électrode est très vite beaucoup plus facile sur les bords de l'électrode, ce qui « écrante » la diffusion au centre.^[311] Aux temps longs ($t \gg a^2/D$), une couche de diffusion hémisphérique se crée. Dans ce cas, les variations de concentration restent limitées à des distances équivalentes à quelques fois le rayon de l'ultramicroélectrode. Cette composante radiale de la diffusion induit une augmentation du transfert de masse en comparaison à une macroélectrode. Le courant faradique tend alors vers une valeur stationnaire (courant limite) proportionnelle à la concentration de l'espèce en solution (Equation 1).

$$i_{lim} = 4.n.F.D. C^*.a \quad \text{Equation 1}$$

D le coefficient de diffusion de l'espèce, n le nombre d'électrons échangés au cours du processus faradique, C^* est la concentration de l'espèce électroactive au sein de la solution et F la constante de Faraday. L'équation du courant stationnaire ci-dessus est applicable dans le cas simple d'un microdisque isolé dans un plan considéré infini par rapport au rayon du disque. Une correction empirique a été introduite dans le cas de microdisque présentant une épaisseur de couche isolante de dimension finie, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que la surface électroactive.^[318] Cette situation que l'on rencontre lorsque l'on étudie les réseaux de microdisques.^[319, 320] Récemment, un modèle théorique prenant en compte la géométrie conique (dimensions du cône et épaisseur de l'isolant), a été proposé.^[321]

Le réseau développé dans ce travail est formé de 6000 électrodes submicrométriques de forme conique. Son arrangement est régulier et les cônes sont identiques. La voltammétrie cyclique est généralement une méthode très efficace pour obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur les propriétés des réseaux. Le comportement électrochimique du réseau au cours des différentes étapes de sa préparation a ainsi été étudié. La figure 6 montre les voltamogrammes cycliques enregistrés dans une solution

aqueuse d'hexaamineruthénium(III) en présence d'un excès d'électrolyte support. Cette espèce rédox est choisie car elle est connue pour ne pas s'adsorber à la surface des électrodes. De plus, il s'agit d'un système rédox rapide.^[311] Le voltamogramme (A) est réalisé avant le dépôt de peinture isolante. Le voltamogramme (B) présente lui la réponse du réseau après l'étape d'isolation par le film. Le comportement électrochimique du réseau de nanopointes ITO non isolées (Figure 6A) montre une réponse classique transitoire caractéristique d'une macroélectrode. Le profil obtenu est lié au régime de diffusion plane. L'intensité faradique décroît dès que le potentiel appliqué s'approche du potentiel rédox de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. La séparation entre le pic anodique et le pic cathodique (~ 60 mV) témoigne d'une bonne réversibilité du transfert d'électrons, ainsi que du bon niveau de dopage du semi-conducteur.^[322] La voltamétrie cyclique montre donc que le film d'ITO déposé par la méthode de pulvérisation cathodique possède d'excellentes propriétés électrochimiques.

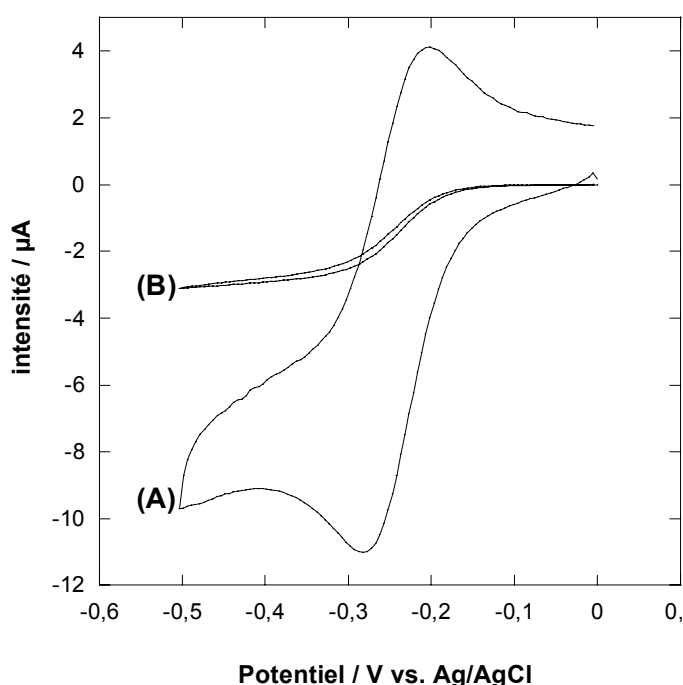


Figure 6 : Voltamogrammes cycliques obtenus (A) avant et (B) après le dépôt de peinture isolante. La solution contient 5 mM de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ et 1M de Na_2SO_4 . $v =$ (A) 50 mV/s et (B) 10 mV/s

Après le dépôt de peinture électrophorétique (Figure 6B), l'allure et l'amplitude du signal voltamétrique sont modifiées. La forme sigmoïdale du voltamogramme cyclique obtenue indique que le régime de diffusion au niveau du réseau d'ultramicroélectrodes est quasi-stationnaire. Pour interpréter ce changement de réponse voltamétrique, il faut comprendre le comportement diffusionnel d'un réseau d'ultramicroélectrodes fonctionnant

toutes au même potentiel. Trois régimes limites de diffusion peuvent être distingués à un réseau de microdisques. Ils sont illustrés sur la figure 7 où est représenté un réseau d'ultramicroélectrodes disque de rayon a .^[4, 323] Les régimes de diffusion dépendent de l'échelle de temps de la perturbation électrochimique (pour la voltamétrie cyclique, c'est la vitesse de balayage) et de l'espacement d entre les électrodes. Dans la configuration de la figure 7A, pour des temps courts ($t \ll a^2/D$), on observe une diffusion plane qui s'établit au niveau de chaque électrode individuelle. On rencontre cette situation pour des vitesses de balayage rapides. L'allure du voltamogramme, gouvernée par le régime de diffusion plane, est alors un profil transitoire de type nernstien. La diffusion est le phénomène limitant et le courant de pic s'exprime en fonction de l'aire électroactive réelle du réseau.^[210] Cette diffusion tend par la suite vers un régime stationnaire. La figure 7B illustre ce comportement qui se produit pour des valeurs de temps intermédiaires ($a^2/D \ll t \ll d^2/D$). La réponse en courant est maintenant dominée par la diffusion purement hémisphérique qui prend place à chaque électrode. Les couches de diffusion individuelles ne se recouvrent pas et donc n'interfèrent pas. En effet, l'épaisseur des couches de diffusion individuelles est encore faible. Elle est de taille comparable au rayon des électrodes du réseau.

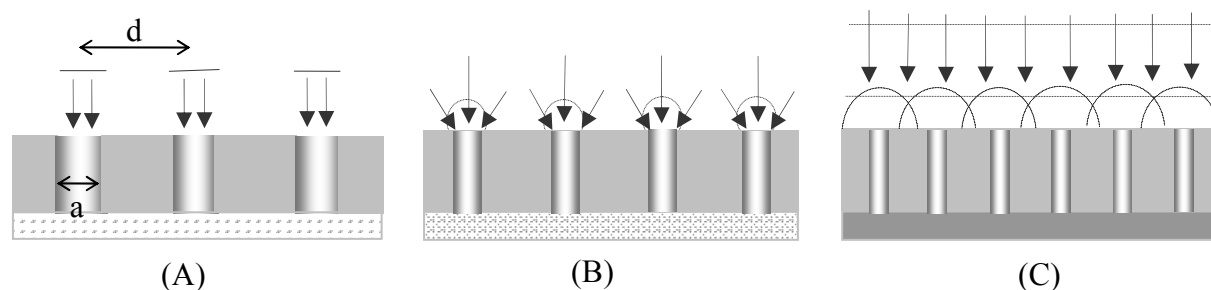


Figure 7 : Différents régimes de diffusion s'établissant à un réseau d'ultramicroélectrodes disque interconnectées, de rayon a et d'espacement d . (A) diffusion plane « microscopique » à temps très courts ; (B) diffusion hémisphérique pour des électrodes suffisamment espacées pour des temps intermédiaires ; (C) diffusion plane « macroscopique » à temps long liée au recouvrement des couches de diffusion individuelles d'électrodes peu espacées les unes des autres

Cette situation sans recouvrement diffusionnel se présente en voltammétrie pour des vitesses de balayage intermédiaires.^[223, 320] Le réseau préserve dans ce cas les caractéristiques d'une électrode microdisque unique, c'est-à-dire l'obtention d'un courant limite de plateau (profil sigmoïdal). Ce courant limite est alors idéalement égal à la somme

algébrique des courants quasi-stationnaires individuels.^[320, 324, 325] Lorsque la fenêtre de temps de la perturbation devient plus longue (vitesse de balayage plus faible), les couches de diffusion hémisphérique de chaque électrode se recouvrent (figure 7C). En effet, la taille d'une couche de diffusion individuelle est devenue grande en comparaison de la distance interélectrode ($d^2/D \ll t$). Ce phénomène crée à temps longs une couche de diffusion apparente globale (« macroscopique »), assimilée à une couche de diffusion plane.^[4] Le réseau se comporte alors comme une macroélectrode. Le courant de pic s'exprime en fonction d'une surface électroactive correspondant à une macroélectrode de même aire géométrique.^[210] La démarche est similaire si l'on raisonne non plus par rapport à l'échelle de temps de la perturbation électrochimique mais par rapport à la distance inter-électrode, l'un des paramètres important de la fabrication des réseaux.^[326] Dans la pratique, la séparation entre ces trois régimes n'est pas distincte, du fait que le rayon a et la distance inter-électrode d sont généralement du même ordre de grandeur.^[323] Des traitements théoriques ont été élaborés pour la réponse ampérométrique^[327, 328] ou voltamétrique^[320] d'un réseau en tenant compte de la densité et de l'arrangement des ultramicroélectrodes. Dans ce cas, le réseau conserve les bénéfices inhérents à une ultramicroélectrode unique, car il n'y a pas de recouvrement diffusionnel. On rencontre cette configuration pour des réseaux peu denses, c'est-à-dire avec un espacement suffisant entre les ultramicroélectrodes (au moins 12 fois le rayon d'une ultramicroélectrode disque).^[217, 320, 325] Ce type de réseaux permet par exemple de conserver la rapidité de réponse voltammétrique pour des expériences de voltammétrie à balayage très rapide^[329] ou de minimiser les interférences due à la convection.^[326] Par contre, lorsque la distance interélectrode devient inférieure à 2 fois le rayon du disque, le réseau est dit à forte densité.^[324] Le comportement en régime stationnaire se rapproche alors de celui de la macroélectrode de même aire géométrique totale (figure 7C). La dynamique diffusionnelle qui s'établit peut être rigoureusement décrite dans le cas des réseaux ordonnés. En revanche, les théories deviennent plus approximatives lorsque la taille des électrodes devient nanométrique^[167] ou pour les ensembles aléatoires.^[4] Certaines de ces théories ont été initiées dès les années 1980, pour quantifier la réponse d'ensembles aléatoires. En effet, ils s'agissait d'évaluer les distorsions voltammétriques entraînées par un mauvais polissage d'électrode, par le recouvrement seulement partiel d'une surface d'électrode avec un film isolant,^[330, 331] par le blocage partiel de la surface par adsorption d'un produit de réaction,^[332] ou encore par l'utilisation de matériaux d'électrodes composites.^[333, 334] Les transitions entre les différents régimes critiques dépendent des distributions statistiques des temps caractéristiques et des

espacements moyens entre les électrodes de l'ensemble. Le passage entre le régime de diffusion hémisphérique discret et le régime de recouvrement a par exemple été démontrée expérimentalement pour des ensembles d'ultramicroélectrodes,^[335] de nanoélectrodes^[215, 336] ou d'opto-électrodes.^[276]

L'allure du voltamogramme sigmoïdal obtenu après le dépôt de peinture électrophorétique (figure 6B) est donc gouvernée par un régime de diffusion purement hémisphérique au niveau de chaque ultramicroélectrodes conique (figure 7B). Cette caractéristique indique que les électrodes ont une dimension suffisamment petite et sont suffisamment espacées les unes des autres pour que le recouvrement des couches de diffusion individuelles puisse être considéré comme négligeable.^[320] On peut donc considérer que ces capteurs ITO submicrométrique sont diffusionnellement indépendantes.^[80] L'amplitude du courant faradique chute suite au dépôt de peinture électrophorétique, du fait que la surface électroactive diminue. Il est courant d'utiliser l'approximation assimilant la géométrie conique à une géométrie hémisphérique.^[310, 321, 337] Les microsphères sont une géométrie que l'on peut obtenir généralement par suspension de gouttes ou de particules à l'extrémité d'une fibre ou d'une micropipettes.^[188, 189] Dans cette approximation, le courant de plateau est idéalement égal à la somme algébrique des courants stationnaires générés par chacune des 6000 ultramicroélectrodes discrètes formant le réseau. Le courant total peut donc être directement relié à la valeur moyenne du rayon apparent r_{apparent} d'une seule de ces ultramicroélectrodes.^[326] L'équation 2 exprime la valeur du courant de plateau pour un réseau d'hémisphères submicrométriques :

$$i_{\text{lim}} = 2\pi n.F.D.C^* a_{\text{apparent}} N_{\text{capteurs}} \quad \text{Equation 2}$$

F la constante de Faraday, n le nombre d'électrons échangés lors du processus faradique ($n = 1$), D le coefficient de diffusion de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ($D = 7,1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)^[167], N_{capteurs} le nombre d'ultramicroélectrodes actives dans le réseau ($N_{\text{capteurs}} = 6000$). D'après la valeur du courant de plateau du voltamogramme stationnaire (Figure 6B), la valeur moyenne du rayon apparent d'un capteur est de 300 nanomètres.

Une expression théorique adaptée à la géométrie particulière conique a été proposée pour la détermination du rayon apparent d'une telle électrode.^[321] En appliquant ce modèle à notre système, la valeur du rayon apparent obtenu en considérant la géométrie hémisphérique est sous-estimée de 17%. Malgré tout, ce rayon moyen corrigé est compatible

avec le comportement d'indépendance diffusionnelle du réseau discuté ci-dessus, car la distance interélectrode est elle d'environ 5 μm (en partant de la distance cœur à cœur du faisceau optique initial). Le recouvrement diffusionnel entre les couches de diffusion individuelles est minimisé dans cet arrangement ordonné d'électrodes submicrométriques.

Enfin, la peinture électrophorétique que l'on a utilisée pour isoler le réseau présente une très bonne stabilité dans une large gamme de potentiel, en particulier pour les potentiels cathodiques.^[278] Lors de la caractérisation électrochimique, des cycles répétés dans la gamme des potentiels négatifs n'affectent pas la forme et l'intensité de la réponse voltampérométrique. Le film isolant ne subit pas de dégradation ou de redissolution, qui serait alors la cause d'une exposition progressive des zones isolées de la surface du réseau de nanopointes conductrice.

2.5.2 Caractérisation par électrochimiluminescence de surface

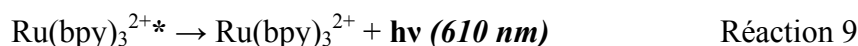
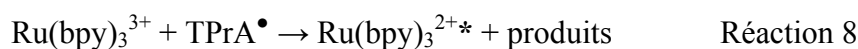
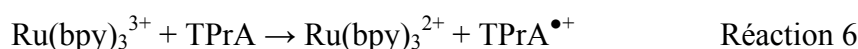
Les propriétés électrochimiques du réseau sont caractérisées au niveau de l'extrémité des électrodes submicrométriques par imagerie électrochimiluminescente. L'électrochimiluminescence et la fluorescence sont des méthodes luminescentes particulièrement intéressantes pour la caractérisation spatialement résolue de l'activité électrochimique d'une surface d'électrode ou le suivi visuel d'un processus rédox à l'électrode. Certains procédés utilisant la fluorescence sont décrits dans la littérature.^[153, 157, 160] Les méthodes employant l'électrochimiluminescence sont les plus courantes, car contrairement à la fluorescence, elle n'exige pas d'instrumentation d'analyse spectroscopique. Les premières approches ont été développées pour la plupart à la fin des années 1980.^[132-134, 136] L'intensité de la lumière électrogénérée à l'électrode est proportionnelle à la densité de courant. Cette caractéristique offre une voie très efficace pour visualiser et corrélérer la microstructure de l'électrode avec ses caractéristiques électrochimiques locales.

Par ailleurs, l'électrochimiluminescence générée à l'extrémité d'une ultramicroélectrode a été le sujet d'un nouveau type de développement visant à étendre le potentiel de la microscopie électrochimique à balayage. En effet, l'électrochimiluminescence créée à la pointe d'une électrode submicrométrique devient une nanosource de lumière très localisée permettant de visualiser la surface d'un échantillon par balayage. Conceptuellement, l'idée est de former une source lumineuse de taille largement inférieure à la longueur d'onde et qui

puisse être appliquée pour la microscopie à champ proche optique. Ce type d'approche a été démontrée pour l'imagerie spatialement résolue de substrats métalliques semi-transparents présentant une forte hétérogénéité de surface, avec une résolution spatiale latérale atteignant celle de la microscopie à champ proche optique (50/150 nm).^[52, 265, 266] Récemment, des travaux ont démontré que l'imagerie électrochimiluminescence est une voie particulièrement intéressante pour caractériser les propriétés d'une microstructure d'or.^[143] Cette structure se compose d'un assemblage régulier de pointes d'or créées à la surface d'une fibre d'imagerie métallisée. Le potentiel appliqué à la surface est pulsé, ce qui génère des séquences de couches de diffusion préférentiellement au niveau des pointes sur un temps très court. L'électrochimiluminescence est ainsi initiée à chaque pointe séparément et observée par une caméra CCD en accumulant plusieurs images du phénomène répétée séquentiellement.

Pour caractériser le réseau développé dans ce travail, nous avons sélectionné un système électrochimiluminescent modèle. Il s'agit du tris(2,2'-bipyridine)ruthénium(II) et d'un co-réactif, une amine aliphatique, la tri-*n*-propylamine (TPrA). Ce système génère une intensité lumineuse stable et intense en milieu aqueux.^[338, 339] L'espèce qui possède des propriétés luminescentes est $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. En photoluminescence, l'émission résulte de la formation d'un état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ par absorption d'un photon, avec un rendement de luminescence de 5%.^[340] L'énergie absorbée provoque alors un transfert métal-ligand (MLCT), c'est-à-dire qu'un électron passe d'une orbitale d du ruthénium à une orbitale π^* d'un des ligands. Il est admis que cet électron est localisé sur l'une des bipyridines et non pas délocalisé.^[341] La durée de vie de l'état excité est relativement longue, plusieurs centaines de microsecondes, du fait du fort caractère triplet de l'état excité émetteur (cf. Annexe 2).^[342] Dans le système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$, le potentiel doit être suffisamment positif pour oxyder $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Le mécanisme électrochimique implique ensuite l'oxydation directe ou indirecte du co-réactif, ce qui crée une espèce très réductrice supposée être TPrA^\bullet . Cette espèce transfère un électron sur une orbitale π^* d'un ligand du complexe oxydé pour aboutir à la formation de l'état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$. L'intensité lumineuse est proportionnelle aux concentrations respectives du complexe de ruthénium et du co-réactif, mais dépend aussi du matériau d'électrode, du potentiel de l'électrode et du pH de la solution.^[343] Cependant, le mécanisme exact est encore discuté par différents auteurs afin de clarifier les réactions et les intermédiaires mis en jeu (cf. Annexe 2).^[344-346] Dans notre cas, nous utilisons une concentration relativement élevée de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (1 mM). Il est alors admis que le mécanisme réactionnel suit majoritairement la « voie catalytique ». Un saut de potentiel

provoque l'oxydation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (Réaction 5) Cet oxydant fort réagit alors avec les molécules du co-réactif TPrA, selon une réaction d'oxydation homogène (Réaction 6). L'agent très réducteur TPrA^{\bullet} , issu de la déprotonation de l'intermédiaire $\text{TPrA}^{\bullet+}$ qui a une durée de vie très courte, réagit ensuite avec l'espèce oxydée $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Cette réaction forme suite au transfert électronique l'état excité luminescent $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ (Réaction 8). La bande d'émission de l'état émetteur $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ a pour maximum 610 nm (couleur rouge-orange). Après cette relaxation et le retour à l'état fondamental (Réaction 9), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est donc régénéré à proximité de l'électrode. La régénération catalytique (mécanisme EC')^[165] permet ainsi à une même molécule du complexe d'émettre des photons à plusieurs reprises au cours du processus.



Dans cette partie du travail, le but est de visualiser la luminescence électrogénérée par le réseau en observant directement sa surface. Le dispositif expérimental est schématisé sur la figure 8.

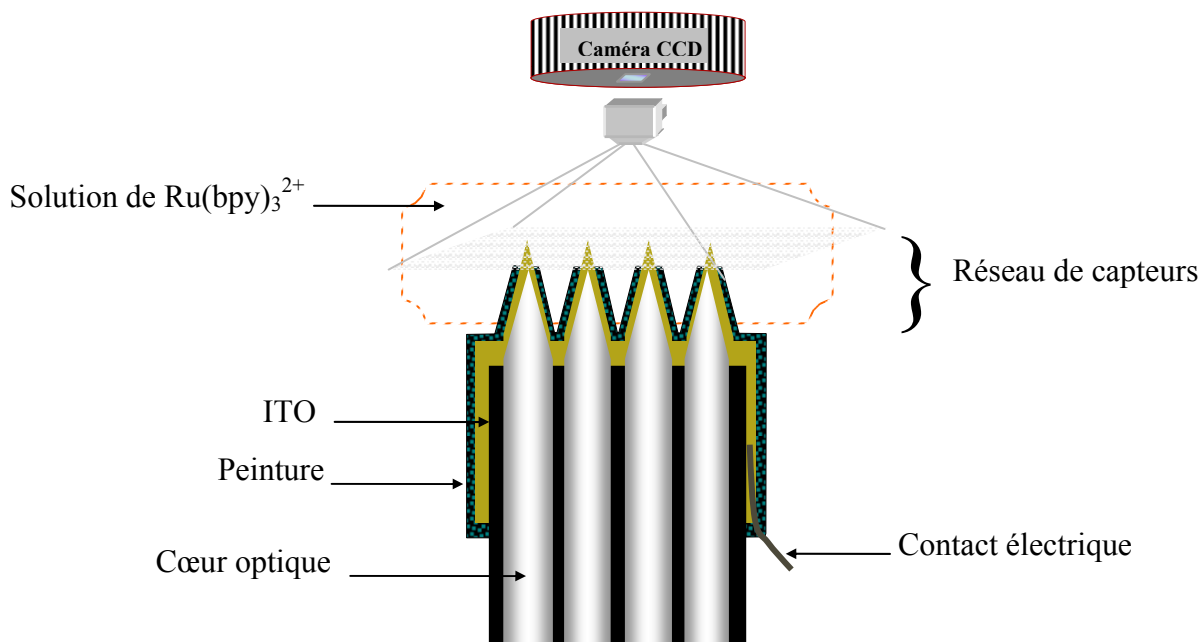


Figure 8 : Schéma montrant le principe de la visualisation directe de l'électrochimiluminescence générée par le réseau d'ultramicroélectrodes. Le réseau est plongé dans une solution contenant $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et TPrA.

Le réseau est immergé dans une solution contenant le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et le co-réactif TPrA. Il est disposé face à un dispositif d'imagerie comprenant un microscope couplé à une caméra CCD. Avec ce dispositif expérimental, la visualisation de la surface est réalisée à travers une couche de solution de quelques millimètres d'épaisseur recouvrant le réseau et la paroi de verre d'une cellule électrochimique. Dans cette cellule, sont également incorporées parallèlement au réseau une contre-électrode en platine et une pseudo-électrode de référence en argent. La figure 9 montre les images d'une partie représentative de la surface du réseau lorsque le réseau est exactement dans le plan focal de l'objectif. Aucun potentiel oxydant n'est appliqué au réseau. La figure 9A est l'image obtenue en réflexion sous éclairage par une lumière blanche. On peut y distinguer environ 280 spots lumineux (en bleu) qui correspondent aux positions des nanopointes ITO qui ne sont pas couvertes par le film isolant. Avec cette image en fausses couleurs, la distribution spatiale des capteurs peut ainsi être observée, le relief de la surface permettant d'obtenir un contraste de couleur entre les zones d'emplacement des pointes et les zones entre les pointes recouvertes par la peinture électrophorétique. La figure 9B est obtenue dans l'obscurité en appliquant un potentiel de 1,2V /Ag. Ce saut de potentiel déclenche l'apparition de spots électrochimiluminescents localisés au niveau de chaque capteur.

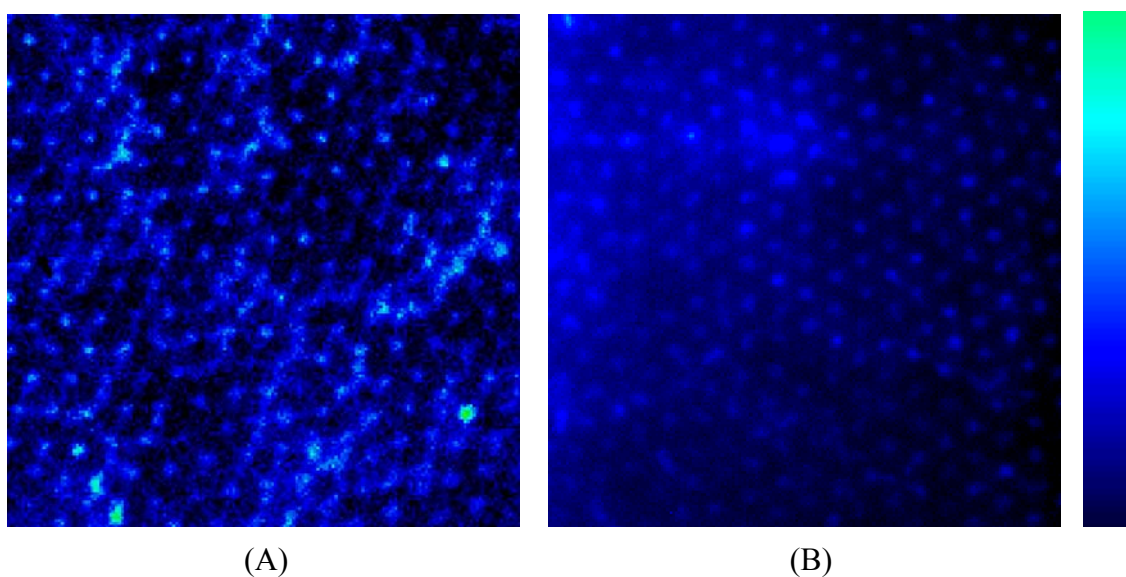


Figure 9 : (A) Image enregistrée en réflexion par éclairage en lumière blanche avant l'application du potentiel. (B) Image électrochimiluminescente de la même zone représentative après l'application de 1,2V/Ag. La couleur noire représente les faibles intensités lumineuses. La solution où le réseau est immergé est un tampon phosphate 0,15 M (pH = 7,5) contenant 1 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et 100 mM TPrA.

Ces spots de taille micrométrique sont clairement séparés les uns des autres, reflétant la distribution spatiale des capteurs électroactifs dans l'arrangement ordonné du réseau. L'image 9B confirme que les zones électroactives sont bien localisées seulement au niveau des pointes ITO, corroborant la cartographie électrique obtenue en microscopie AFM/résiscope (Figure 5). On dénombre de façon claire environ 270 spots électrochimiluminescents sur cette image. La légère différence entre les nombres de spots observés en réflexion de la lumière blanche et en électrochimiluminescence peut être expliquée par un problème lié à la focalisation du microscope. En effet, la principale difficulté de cette expérience est de pouvoir positionner la surface du réseau parfaitement dans le plan focal de l'objectif à très fort grossissement. Une légère inclinaison perturbe grandement l'observation des spots sur la totalité de l'image. Par ailleurs, il est possible que l'extrémité de certaines nanopointes ne se trouve pas parfaitement dans le plan focal.

Le diamètre moyen des spots individuels est d'environ 1 à 1,5 μm (Figure 9B). Or, le diamètre apparent estimé par voltamétrie cyclique de chaque capteur est d'environ 600 nm. Pour expliquer cet écart, il est nécessaire de prendre en compte différents effets qui peuvent influencer sur l'observation de la distribution spatiale de spots discrets au niveau des sites d'émission de photons. D'abord, du point de vue de la résolution optique du dispositif, plusieurs effets peuvent intervenir. La limite de diffraction de la lumière, principal obstacle à la résolution spatiale des méthodes de microscopie classique,^[285] limite la résolution à une valeur théorique égale à la demi-longueur d'onde, donc approximativement autour de 300 nm. Il faut considérer également la taille des pixels de la caméra CCD et le grossissement de l'objectif. La résolution optique expérimentale est ainsi également d'environ 300 nm. Ensuite, du point de vue électrochimique, la taille des spots générés par les sites électroactifs dépend de deux paramètres : l'épaisseur de la couche de réaction catalytique et la diffusion de l'état excité émetteur. En effet, ces deux phénomènes peuvent contribuer à étendre significativement la zone lumineuse autour de chaque capteur. Il faut donc tenir compte du mécanisme catalytique qui génère l'état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$. L'épaisseur μ de la couche de réaction catalytique autour d'une électrode submicrométrique a été calculée en considérant une géométrie hémisphérique.^[143, 265] Son expression est reportée ci-dessous dans le cas d'une réaction EC' où le co-réactif est présent en excès :

$$\mu = \left[\frac{1}{r_{\text{moy}}} + \left(\frac{2 k_6 [\text{TPrA}]}{D} \right)^{1/2} \right]^{-1} \quad \text{Equation 7}$$

D est le coefficient de diffusion de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ($D = 5,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$),^[166] r_{moy} le rayon moyen apparent d'une pointe, et k_6 la constante de vitesse apparente de la réaction d'oxydation homogène de TPrA par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (Réaction 6). Comme TPrA a des propriétés acido-basiques, k_6 dépend de la valeur du pH selon l'équation $k_6 = k/(1 + 10^{-\text{pH} + \text{pKa}})$, où k est la valeur intrinsèque de la constante de vitesse. Les valeurs de k et du pKa sont, respectivement, $1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et 10,4.^[166] A $\text{pH} = 7,5$, correspondant à celui de la solution tampon que l'on utilise, la valeur de k_6 est donc $1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En prenant la valeur moyenne du rayon apparent d'un seul capteur ($r_{\text{moy}} = 300 \text{ nm}$), on en déduit l'épaisseur de la couche réactionnelle qui est alors d'environ 200 nm. Ainsi, en présence d'un excès de TPrA, la cinétique des réactions mises en jeu confine bien la région électrochimiluminescente au très proche voisinage de la surface des pointes électroactives. Le second facteur qui peut affecter la dimension de la zone émettrice est de nature diffusionnel. En effet, l'état excité peut diffuser sur une certaine distance à partir de l'électrode avant d'émettre un photon. Cette distance dépend de la valeur de sa durée de vie dans le milieu considéré. Dans les solutions aqueuse et en absence d'oxygène, la durée de vie de l'état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ est relativement longue ($\tau = 0,6 \mu\text{s}$ à 25°C). En supposant que la valeur du coefficient de diffusion à l'état excité est la même qu'à l'état fondamental, la distance diffusionnelle ($\sqrt{D\tau}$) de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ est estimé à environ 20 nm. L'émission a lieu plus rapidement que le temps d'éloignement par diffusion de l'ultramicroélectrode. Autrement dit, avant de libérer le photon, la molécule parcourt une distance peu importante par rapport à la dimension de l'ultramicroélectrode et par rapport à l'épaisseur de la couche catalytique (valeur de μ). Par ces estimations, l'électrochimiluminescente observée est donc confinée à une distance égale à 2μ (c'est-à-dire environ 400nm) autour d'une pointe isolée indépendante diffusionnellement. Malgré la limitation optique théorique et expérimentale du système d'imagerie, la taille des spots électrochimiluminescents (1 - 1,5 μm) est donc en très bon accord avec la valeur moyenne du diamètre de la partie conductrice des pointes, calculée à partir de la voltamétrie stationnaire (environ 600 nm). Pour une couche de solution émettrice locale, l'épaisseur μ est suffisamment petite en comparaison de la distance interélectrode. De ce fait aucun recouvrement entre les spots électrochimiluminescents n'est observé, même après plusieurs minutes d'application du potentiel. La figure 9B montre ainsi de façon très correcte la cartographie spatialement résolue des couches réactionnelles individuelles issues de chacune des ultramicroélectrodes du réseau. Les sites d'émission de photons coïncident très bien avec les sites de transfert d'électron. Comme les intensités des spots sont assez similaires, l'image 9B montre que les tailles des capteurs électrochimiluminescents du

réseau sont relativement proches. Ce résultat constitue, de plus, une preuve complémentaire aux expériences menées précédemment (AFM/résiscopes et microsonde Auger). Elle démontre que la répartition de la peinture électrophorétique entre les pointes est uniforme et ne présente pas de défauts ponctuels.

3. Applications à l'imagerie électrochimiluminescente à distance

Dans des approches antérieures, les faisceaux cohérents de fibres optiques ont été utilisés pour développer un nouveau concept de méthodes combinant l'analyse chimique et l'imagerie.^[72, 163, 347] Le principe était de réaliser simultanément l'image d'un échantillon et la cartographie *in situ* de la fluorescence issue de ce même échantillon *via* le faisceau cohérent. Différents capteurs optiques possédant cette double capacité ont été développés, par recouvrement de la surface de fibres d'imagerie avec des membranes polymériques contenant des indicateurs fluorescents.^[163, 348] Ces couches sensibles déposées à la surface permettaient de conserver la transmission optique, et, de ce fait, la propriété d'imagerie du faisceau. Les phénomènes de corrosions de surface^[348, 349] ou des événements locaux au niveau de cellules biologiques^[163, 291, 350] ont ainsi été étudiés par fluorescence. Le développement de notre réseau opto-électrochimique a été conçu pour conserver la propriété d'imagerie du faisceau cohérent initial ainsi que la transparence de la surface. Il est orienté vers l'imagerie et la détection chimique à distance. Du fait que le réseau soit électroactif, les applications envisagées sont principalement tournées vers l'électrochimiluminescence.

Le principe de la détection est décrit sur le schéma d'acquisition représenté sur la figure 10. La face distale nanostructurée du faisceau d'imagerie est placée dans la solution contenant le système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$. La face proximale est disposée en face de l'objectif du microscope qui est équipé avec une caméra CCD. La réaction électrochimiluminescente est d'abord générée au niveau de l'apex de chacun des capteurs par application d'un potentiel de 1,2 V/Ag/AgCl. Les signaux de luminescence restent confinés à la surface et il n'y a donc pas de recouvrement spatial entre eux. Au niveau d'un capteur, une fraction de l'émission électrogénérée traverse ensuite le matériau d'électrode transparent, puis est collectée par le cœur optique correspondant. Ce dernier transmet le signal par réflexion totale interne jusqu'à la face proximale du faisceau cohérent. L'intensité du spot lumineux est finalement mesurée avec la caméra CCD. L'image électrochimiluminescente ainsi obtenue est transmise *via* le faisceau de fibres optiques, et non avec le réseau positionné en

face de la caméra comme dans l'expérience précédente (figure 8). Ce principe met en jeu la propriété de transparence de l'ITO, mais aussi les caractéristiques de guidage de la lumière par un cœur optique dont l'extrémité est de forme conique. Cet aspect est l'un des paramètres de la résolution du système faisceau/réseau, qui sera présentée dans cette partie.

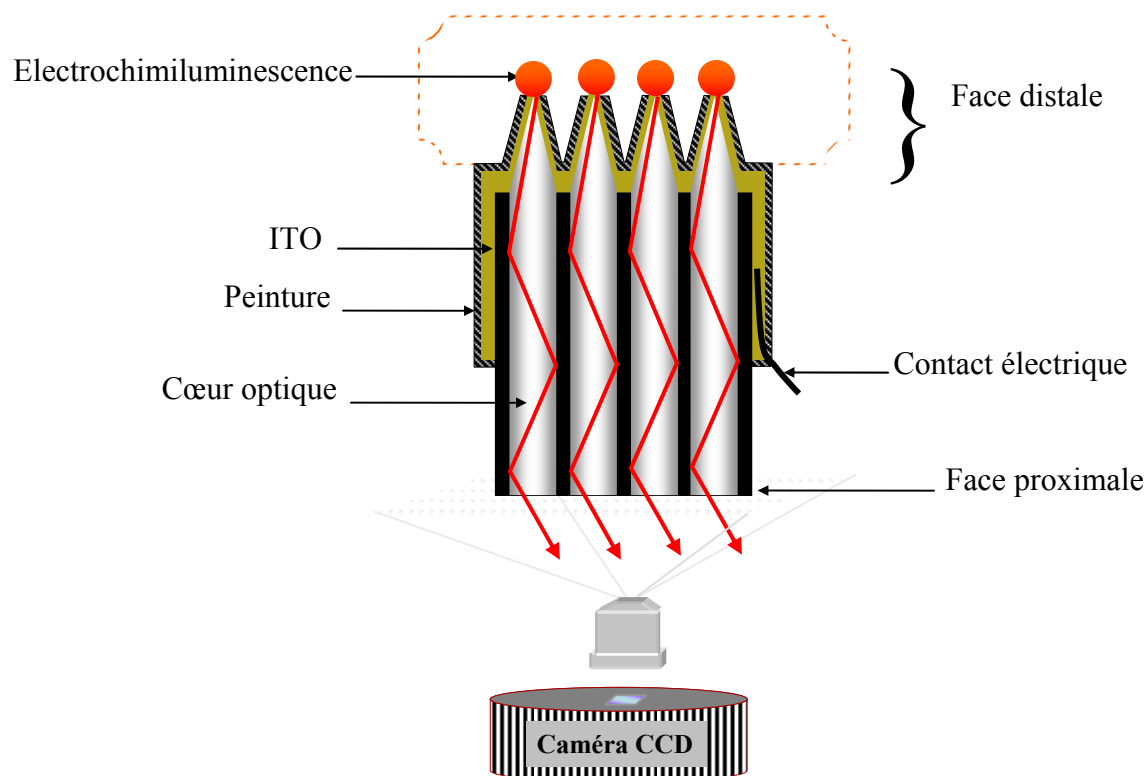


Figure 10 : Schéma montrant le principe de l'imagerie d'électro-chimiluminescence à distance. Le réseau est plongé dans une solution contenant des réactifs impliqués dans la réaction électro-chimiluminescente. La face proximale est placée en face du système microscope/caméra CCD.

La faisabilité de l'imagerie électrochimiluminescente à distance est démontrée pour des systèmes d'intérêt biologique. Le choix de réactions électrochimiluminescentes qui mettent en jeu une molécule luminophore (sonde) et un co-réactif biochimique ou biologique est très varié.^[340] Notre choix s'est focalisé sur deux systèmes modèles basés sur deux luminophores impliqués dans des mécanismes électrochimiluminescents différents : $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et luminol. Ces deux séries d'expériences montrent ainsi que le principe de l'imagerie électrochimiluminescente est adapté à des systèmes de nature très variée.

3.1 Réaction électrochimiluminescente modèle : $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /tri-*n*-propylamine

La première application analytique du réseau concerne le système modèle $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /tri-*n*-propylamine,^[338] présenté précédemment dans ce mémoire pour caractériser les propriétés du réseau. Ce système est peut-être celui qui offre le plus grand nombre d'avantages analytiques : solubilité dans l'eau et dans des solvants organiques, très forte efficacité d'électrochimiluminescence, grande stabilité du phénomène à pH physiologique et à température ambiante, limite de détection extrêmement faible.^[339, 340]

3.1.1 Applications bioanalytiques

Le couple $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /tri-*n*-propylamine trouve de nombreuses applications analytiques et biotechnologiques. Basés sur la robustesse et la sensibilité de ce système, les exemples majeurs d'applications sont les puces ADN et les immunocapteurs.^[340, 351] Dans les deux cas, le principe est relativement simple. Le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ joue le rôle d'un marqueur électrochimiluminescent sur l'une des espèces qui est impliquée dans un assemblage possédant des propriétés de reconnaissance biomoléculaire. Ce rôle est relativement similaire à celui des marqueurs fluorescents. Cependant, l'équipement est simple et peu onéreux. Dans le premier cas, des brins d'ADN (sonde) sont d'abord immobilisés à la surface de l'électrode.^[351, 352] Sur chaque brin complémentaire à détecter (cible) est greffée, par liaison covalente, une molécule luminescente de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ modifiée par un bras au niveau d'un des résidus bipyridine (cf. www.bioveris.com). Après hybridation de ces brins marqués sur les brins confinés à la surface, la détection se fait finalement de manière indirecte en portant l'électrode dans une solution contenant une concentration en excès de co-réactif TPrA. L'électrode est portée à un potentiel suffisamment oxydant et l'intensité d'électrochimiluminescence est détectée avec un photomultiplicateur. La quantité de luminescence dépend de la concentration en molécules émettrices récoltées par le processus de bioassemblage, et donc elle est corrélée à la concentration en analyte. Dans le second cas, l'électrode est modifiée par des anticorps qui vont complexer un analyte antigénique. Le taux de complexation dépend de la concentration de l'antigène. Des anticorps spécifiquement marqués par un dérivé de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ viennent finalement se conjuguer en « sandwich » uniquement sur les bioassemblages constitués. La détection de l'électrochimiluminescence de l'électrode modifiée est indirecte, par immersion

dans la solution contenant TPrA en excès. Le nombre de photons généré est alors proportionnel à la concentration en analyte récolté à la surface. La plupart des systèmes commerciaux pour le diagnostic clinique, bactériologique ou environnemental utilisent essentiellement la technologie de séparation de billes paramagnétiques (particule cœur/écorce de type magnétite/polystyrène). Les billes sont préfonctionnalisées pour servir de support d'immobilisation d'ADN ou de protéines, par exemple avec des partenaires de liaison avidine/biotine.^[353,354] Un microsystème fluide achemine les réactifs de reconnaissance biotique et les luminophores dans une chambre contenant les billes magnétiques. Après fixation à la surface des billes de l'analyte au sein d'assemblages marqués, un aimant permet de collecter les billes sur une surface d'électrode et de mesurer l'intensité électrochimiluminescente correspondante. Finalement, les billes sont évacuées et une nouvelle mesure peut avoir lieu (cf. www.bioveris.com et www.dynalbiotech.com). Les améliorations visant à améliorer la sensibilité de ce procédé implique un processus l'amplification du signal d'électrochimiluminescence. Notamment, chaque composé cible peut être marquée, non plus avec une seule molécule de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ mais une grande quantité de molécules contenues dans une microsphère.^[355, 356]

La tri-*n*-propylamine est l'amine aliphatique la plus couramment utilisée comme co-réactif avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, car elle procure des conditions d'électrochimiluminescence optimales.^[183, 338] La famille des composés aminés regroupe néanmoins un grand nombre de co-réactifs biologiques et pharmacologiques très importants (antibiotiques, NADH, antihistamines, inhibiteurs neurologique, acides aminés, peptides et protéines, etc.). Le co-réactif est alors dans ce cas lui-même l'analyte que l'on cherche à détecter en électrochimiluminescence. L'ensemble des exemples de composés possédant des groupes aminés, mais aussi d'autres réactifs d'intérêt biologique (oxalate, citrate, vitamines, etc.) est répertorié dans plusieurs revues.^[175, 182, 340] Récemment, l'électrochimiluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en présence d'un autre co-réactif de grande importance biologique, le peroxyde d'hydrogène, a été décrite.^[357] L'une des stratégies employée pour la détection des ces analytes par électrochimiluminescence repose directement sur le principe du biocapteur. Dans cette voie, la concentration en molécules émettrices est constante et prédéterminée, à la différence des voies ayant recours à un marquage moléculaire et une détection indirecte dans une solution de concentration fixe en co-réactif. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est maintenant immobilisé à la surface de l'électrode en même temps que des entités de biorecognition, comme les enzymes. Dans ce dernier cas, l'électrochimiluminescence est utilisée pour transcrire la

réaction enzymatique générant ou consommant le co-réactif. Un exemple représentatif des biocapteurs basés sur l'électrochimiluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est l'utilisation du co-enzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NADH).^[358] Ce dernier est impliqué dans des réactions catalysées par la famille des enzymes déshydrogénases. La détection d'analytes modèles comme le glucose, l'éthanol, ou le lactate a été réalisée par cette stratégie.^[184, 359] Un autre type d'applications de l'électrochimiluminescence est le suivi de l'activité catalytique d'enzymes estérases ou aminopeptidases de façon extrêmement sensible.^[360] Dans cette méthode, les enzymes sont sélectivement détectées si elles peuvent catalytiquement altérer la capacité de leurs substrats directement marqués par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ à générer de l'électrochimiluminescence, comme par exemple l'antibiotique pénicilline.^[361]

3.1.2 Imagerie quantitative à travers le réseau de capteurs submicrométriques

Dans notre travail, le système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ est utilisé afin de démontrer la faisabilité de l'imagerie électrochimiluminescente à travers le réseau capteurs opto-électrochimiques. La figure 11 présente les images d'électrochimiluminescence, codées en fausses couleurs, obtenues lorsque le réseau de capteurs opto-électrochimiques est placé dans une solution contenant le système électrochimiluminescent (figure 10). Les signaux de luminescence générés à la face distale par chaque capteur indépendant sont transmis par le faisceau cohérent et observés du côté de la face proximale. L'image 11A est obtenue lorsque le réseau est placé dans une solution contenant 1 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et 10mM de TPrA, suite à l'application d'un potentiel de 0V/Ag/AgCl. A ce potentiel, aucune luminescence n'est générée car l'oxydation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ou de TPrA n'a pas lieu (réaction 5). De ce fait, l'image obtenue en transmission ne correspond qu'au bruit de fond de la caméra CCD. L'image 11B est obtenue dans les mêmes conditions de concentration, mais le potentiel appliqué est de 1,2V/Ag/AgCl. On observe alors que la lumière électrogénérée est bien transmise à travers le faisceau cohérent. Tous les spots ont la même dimension, celle d'un cœur optique de 3 μm . L'image 11C est obtenue lorsque la concentration en co-réactif TPrA est de 100 mM. L'intensité des spots détectée dans ce cas est nettement plus importante. La séparation spatiale des spots est moins nette sur cette image. Mais il s'agit d'un simple effet de contraste de l'image étant donné que la même échelle de couleurs est utilisée pour les 3 images.

Sur les images 11B et 11C, l'intensité lumineuse transmise par les spots individuels est uniforme. Chaque capteur transmet de la lumière donc l'ensemble des capteurs submicrométriques est électrochimiluminescent. Par ailleurs, tous les spots lumineux présentent relativement la même intensité de luminescence. Cette observation indique que les capteurs (ou ultramicroélectrodes) ont approximativement une dimension semblable. En effet, si une disparité importante existait à ce niveau, certains capteurs électro généreraient plus de lumière, en transmettraient plus et ils seraient donc plus lumineux. Ce résultat est corroboré par l'image de microscopie à balayage (Figure 3B) et par l'image obtenue de face (figure 9B). Il valide l'approximation faite dans l'équation 2, où on avait considéré que toutes les électrodes avaient la même dimension.

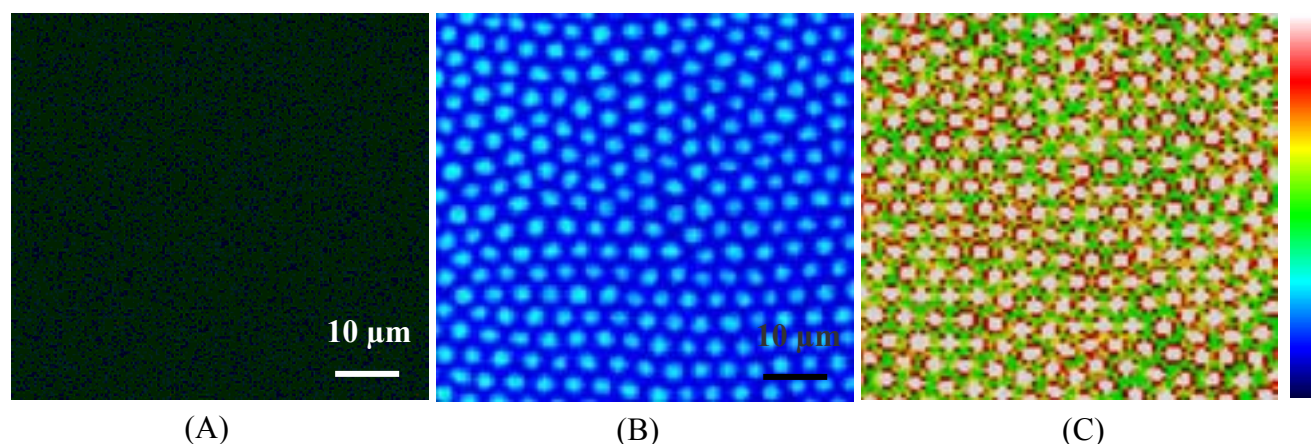


Figure 11 : Images enregistrées à travers le réseau de capteurs. (A-B) Le réseau plonge dans une solution contenant 1mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et 10 mM de TPrA. Le potentiel appliqué est (A) 0 et (B) 1,2V/Ag/AgCl. (C) Le réseau plonge dans une solution contenant 1mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et 100 mM de TPrA. $E = 1,2 \text{ V/Ag/AgCl}$. Les images sont enregistrées dans la même région d'intérêt, avec la même échelle de couleurs. La couleur noire symbolise les intensités lumineuses faibles. Le temps d'exposition est de 1s.

Plusieurs paramètres peuvent influencer sur la capacité du système réseau/faisceau à transmettre la lumière électrochimiluminescente : la transparence du film ITO et la fraction de luminescence qui est collectée et transmise par un capteur. La transparence des capteurs ITO a été évaluée à la longueur d'onde d'émission du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Une expérience a été réalisée afin de comparer l'intensité lumineuse transmise par le faisceau recouvert d'ITO avec celle transmise par un faisceau de fibres optiques polie (sans ITO). Il s'agit de mesurer tout simplement la transmission du film d'ITO. Un rayon de lumière provenant d'un laser

He/Ne ($\lambda = 632,8$ nm) est focalisé sur la surface ITO et ensuite sur la surface polie d'un faisceau. L'intensité lumineuse est mesurée à l'autre extrémité, au niveau de la face proximale, avec un photomultiplicateur. Le résultat montre que moins de 10% de l'intensité lumineuse transmise est perdu. La transmission du film d'ITO déposé est donc bonne. Le couplage optique entre le capteur quasi-transparent de forme conique et le cœur correspondant est évalué en tenant compte de l'ouverture numérique. Une expérience a été conçue afin d'évaluer « l'angle d'acceptance » des capteurs. Cette méthode de caractérisation des propriétés optiques d'un réseau sera présentée plus en détails dans le chapitre 3. Brièvement, le rayon laser est maintenant orienté sur la surface du réseau à différent angle d'incidence. L'intensité lumineuse transmise est mesurée à la face proximale en fonction de l'angle d'incidence. Les distributions angulaires de la lumière à travers un réseau et un simple faisceau polie sont présentées sur la figure 12. La courbe 12A représente cette distribution obtenue en transmission à travers le faisceau cohérent de 6000 fibres optiques. Pour une incidence normale, l'intensité transmise est la plus forte. A partir d'un angle d'incidence supérieure à 20° par rapport à la normale, la lumière n'est plus transportée dans les cœurs optiques. La largeur à mi-hauteur du profil correspond à la valeur de l'angle d'acceptance des cœurs optiques. Cette donnée expérimentale confirme la valeur d'ouverture numérique 0,35 théorique, définissant un angle d'acceptance de 18° . En revanche, dans le cas de la lumière transmise à travers le réseau (courbe 12B), le profil angulaire n'est plus de forme gaussienne.

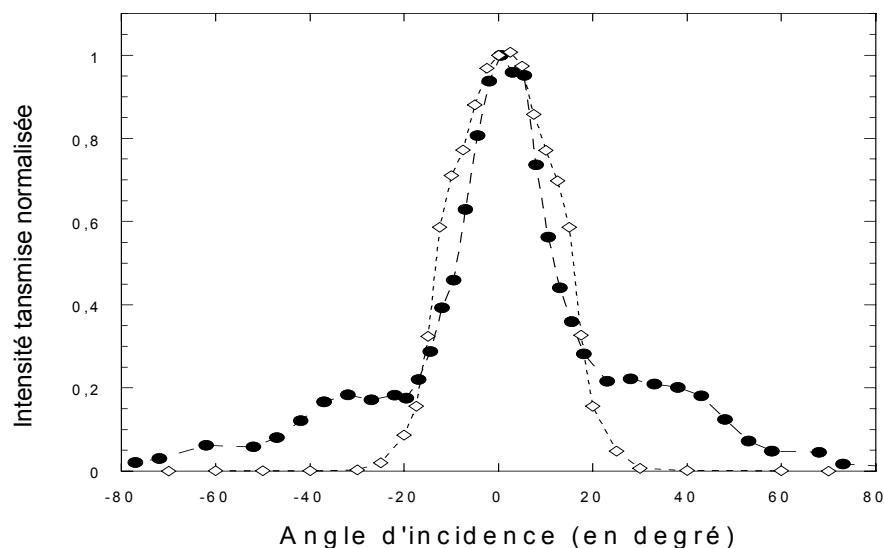


Figure 12 : Profil angulaire de l'intensité lumineuse transmise en fonction de l'angle d'incidence de la lumière d'un laser He-Ne. Profil pour le faisceau poli de fibres optiques (losange) et pour le réseau de capteurs (rond)

Comme pour le faisceau poli, le maximum de l'intensité transmise correspond à une incidence normale. Cependant, la distribution angulaire est plus fine ce qui indique une diminution de l'ouverture numérique du système. En effet, la majeure partie des photons qui sont transmis par la fibre correspond à une incidence inférieure à 15° . Par contre, pour les photons arrivant avec une incidence comprise entre 20 et 40° , seule une fraction d'entre eux contribue à l'intensité transmise (20%). Ce phénomène d'épaulement du profil pour ces incidences est probablement lié à la géométrie conique du capteur.

Le couplage optique à l'interface du film d'ITO et des nanopointes ne semble donc pas altérer la transmission et le guidage du signal à travers le cœur. Le profil de la courbe 12B est très utile pour caractériser la propriété de capture et de transmission à distance des signaux électrochimiluminescents. Cette démonstration qualitative s'appuie sur la figure 10, représentant des spots électrochimiluminescents discrets induits à l'extrémité de chaque capteur, ainsi que sur les propriétés du système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$. L'émission de luminescence depuis les couches réactionnelles individuelles génère des photons se propageant dans toutes les directions de l'espace (selon un angle solide 4π stéradians). Seule une fraction des photons générés par un capteur est collectée et transmise par le cœur optique correspondant. Une partie de la luminescence collectée par un capteur peut également provenir des couches réactionnelles créées par les capteurs voisins. Quelle est la fraction de lumière transmise par un capteur alors qu'elle a été électrogénérée par des capteurs adjacents ? En d'autres termes, les capteurs sont-ils optiquement indépendants dans le réseau ?

Une étude de la résolution spatiale, assez éloignée de notre configuration, a été effectuée sur un réseau de microcavités accueillant des billes fluorescentes. Les microcavités ont été fabriquées sur la face d'un faisceau cohérent.^[362] Une fraction de la fluorescence de la bille est transmise par la microcavité la contenant. La contribution des billes voisines au signal fluorescent a été démontrée comme étant négligeable (rapport de 1:800).^[362] Dans notre système, la possibilité d'interférence entre les capteurs dépend de leur angle d'acceptance, de la dimension de la zone d'émission, de la distance inter-capteurs et d'un terme inversement proportionnel au carré de la distance. Ce dernier facteur est relatif à la sphère d'expansion isotrope de la lumière émise par un point source. La taille de la zone électrochimiluminescente a été estimée ci-dessus (cf. calcul de μ). L'épaisseur de la couche réactionnelle est d'environ $\sim 2\mu$ (400 nm). La figure 9B montre ainsi qu'il n'y a pas de

recouvrement entre les zones émettrices. Par ailleurs, l'angle d'acceptance des capteurs a été évalué expérimentalement (Figure 12). Il montre que les photons qui sont émis au niveau d'un capteur du voisinage, à une distance minimale d'environ $4\ \mu\text{m}$, (exactement la distance entre les cœurs optiques du faisceau) vont arriver avec une forte incidence. Ils ne seront donc quasiment pas transmis par un autre capteur. Cette considération purement géométrique s'accompagne des effets d'absorption de la solution et de l'atténuation due au trajet optique. D'après l'estimation de l'ensemble des paramètres précédents énumérés, l'électrochimiluminescence qui est générée par un capteur particulier ne peut pas interférer significativement sur le signal des autres capteurs présents dans son voisinage. Le réseau présente donc la capacité à générer et transmettre l'électrochimiluminescence de chaque capteur transparent de façon indépendante. La distribution spatiale des spots électrochimiluminescent détectée à distance (figure 11) provient d'un réseau de capteurs optiquement indépendants.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les différentes étapes de fabrication du réseau respectent l'architecture du faisceau initial de fibres optiques. Comme la structure cohérente du faisceau de fibres optiques permet de transmettre une image, la lumière électrogénérée par un capteur est transmise par réflexion totale interne dans le cœur de la fibre correspondante. Comme l'électrochimiluminescence est optiquement liée au cœur optique et que le faisceau est cohérent, les capteurs sont lisibles individuellement et chacun d'entre eux sonde un micro-environnement différent. En conclusion, bien que n'étant pas adressables séparément, une image permet de lire simultanément à distance l'ensemble des capteurs de façon individuelle.

Afin de vérifier si notre méthode d'imagerie électrochimiluminescente à distance est quantitative, nous avons tracé l'évolution de l'intensité mesurée à distance en fonction des concentrations en TPrA ou en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. La Figure 13A montre la courbe d'intensité collectée en fonction de la concentration en TPrA, pour une concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ fixée à 1mM. Le potentiel appliqué est de 1,2V/ Ag/AgCl. Chacun des points reportés sur la courbe résulte de la moyenne des intensités de tous les pixels contenus dans la région d'intérêt définie sur les images de la Figure 11. Cette courbe de calibration présente un domaine linéaire sur 3 ordres de grandeur entre l'intensité électrochimiluminescente et la concentration en co-réactif. Dans le domaine compris entre 100 mM et 100 μM , la droite d'ajustement de points expérimentaux suit une régression linéaire avec un coefficient

$r^2= 0,998$. Ce résultat montre que l'intensité lumineuse est proportionnelle à la concentration en TPrA et permet de valider quantitativement le procédé d'imagerie à travers le réseau même. Dans les conditions de l'expérience, la limite de détection est 100 μM . Cette valeur est relativement élevée. Elle correspond à l'acquisition des images avec un temps d'exposition de la caméra choisi à 1 seconde, temps fixe pour toutes les concentrations en TPrA. En augmentant le temps d'exposition ou en utilisant une caméra CCD plus sensible, la limite de détection peut être grandement améliorée.

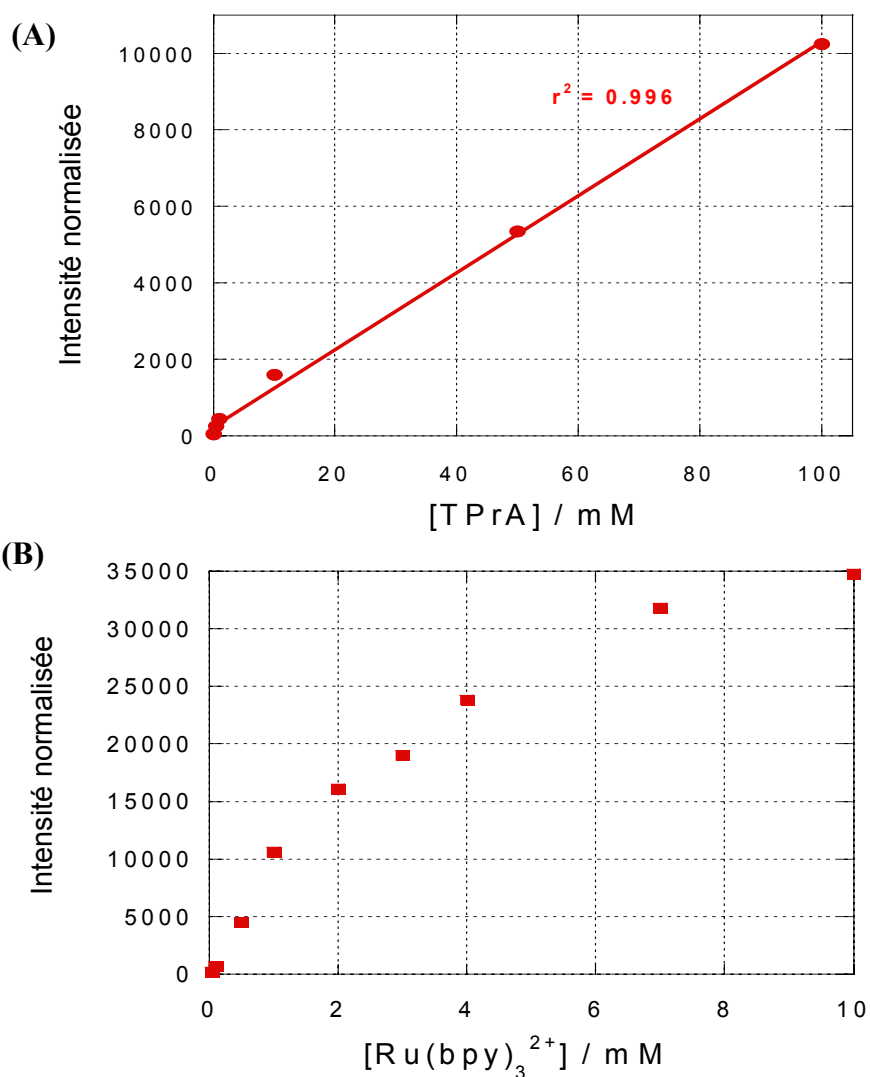
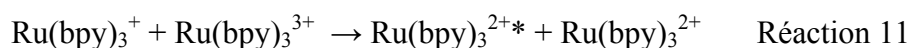
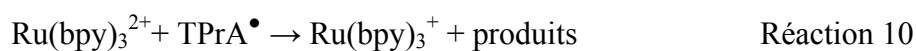


Figure 13: (A) Evolution de l'intensité électrochimiluminescente collectée en fonction de la concentration en TPrA, dans une solution contenant une concentration constante (1 mM) de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. (B) Evolution de l'intensité électrochimiluminescente en fonction de la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, dans une solution de concentration constante (100 mM) de TPrA.

La figure 13B montre l'influence de la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ sur l'intensité du signal électrochimiluminescent initiée et détectée à travers le réseau, lorsque la concentration en TPrA est fixée à 100 mM. La courbe de calibration à concentration en TPrA constante (figure 13B) présente une corrélation relativement linéaire ($r^2 = 0,996$) sur un domaine compris entre 1 mM et 50 μM , cette dernière étant la limite de détection. Lorsque le rapport $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]/[\text{TPrA}]$ augmente, la courbe de l'intensité collectée s'incurve sensiblement.

Différentes études portant sur les chemins réactionnels du système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ dans des conditions similaires à nos expériences peuvent servir de base à l'interprétation de ces courbes.^[363] Nous avons présenté plus haut le mécanisme simplifié (voie catalytique) où le co-réactif TPrA est oxydé par transfert d'électron homogène avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (Réaction 6). En fait, un autre phénomène peut intervenir, celui de l'oxydation directe de TPrA en $\text{TPrA}^{\bullet+}$ à la surface de l'électrode. L'intermédiaire TPrA^{\bullet} , issue de la déprotonation de $\text{TPrA}^{\bullet+}$, peut alors réagir avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, de façon similaire au déroulement de la réaction 8, ou bien avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (Réaction 10). Dans ce cas, le mécanisme conduisant à l'électrochimiluminescence passe alors par une réaction d'annihilation pour former un état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ (Réaction 11) :



L'électro-oxydation directe de TPrA est en compétition avec l'oxydation catalytique par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (Réaction 6). La voie réactionnelle dépend notamment du matériau d'électrode, du potentiel appliqué et des concentrations respectives des deux réactifs. Dans notre cas, le potentiel est fixé à 1,2 V/Ag/AgCl, c'est-à-dire un potentiel suffisamment positif pour oxyder directement à l'électrode, à la fois $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et TPrA. Pour la courbe de la figure 13A, la concentration en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est relativement forte (1mM), condition pour laquelle le mécanisme serait majoritairement catalytique. TPrA est oxydée exclusivement par oxydation homogène au contact de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Suivant les valeurs respectives des concentrations de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et de TPrA, un changement de voie réactionnelle pourrait expliquer la non-linéarité observée pour des concentrations en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dépassant 1mM (figure 13B).

3.2 Imagerie électrochimiluminescente du peroxyde d'hydrogène

3.2.1 Détection par le système luminol/H₂O₂

Pour tester les performances analytiques de notre réseau de capteurs, nous nous sommes intéressés à la détection électrochimiluminescente du peroxyde d'hydrogène. La mesure à distance implique maintenant un autre système d'intérêt biologique basé sur la luminescence électrogénérée du luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione). Le mécanisme réactionnel simplifié de cette réaction chimiluminescente est représenté sur la figure 14.^[183] En solution aqueuse basique, l'oxydation irréversible du luminol déprotoné ($E^\circ = 0,68 \text{ V/Ag/AgCl}$ pour une électrode d'ITO)^[176] conduit à la formation du luminol azaquinone (première espèce radicalaire). Celui-ci est connu pour réagir en présence du peroxyde d'hydrogène. Le 3-aminophthalate est ainsi formé à l'état excité par élimination de N₂ et ouverture de cycle.^[364] Ce dernier retourne à l'état fondamental en émettant un photon de lumière bleue (425 nm).

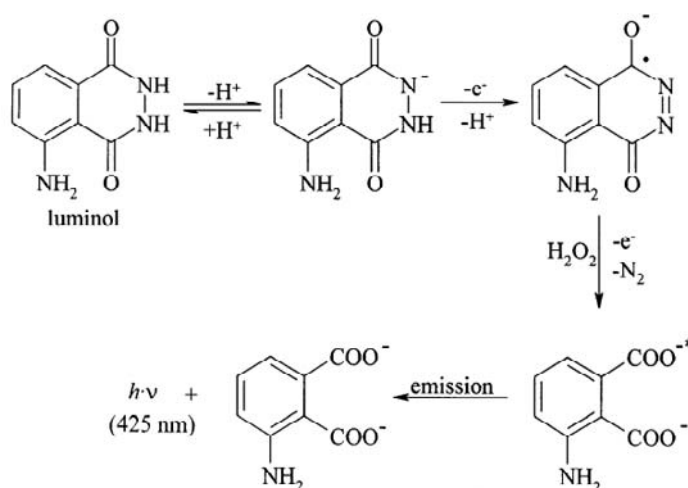


Figure 14 : Mécanisme de l'électrochimiluminescence du luminol en présence du peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène est un analyte d'intérêt majeur. Il intervient dans de nombreuses applications analytiques et dans des processus biologiques très variés. Par exemple, la détection électrochimiluminescente de H₂O₂ a été exploitée pour réaliser la mesure de différents substrats (α -cétoglutarate, L-glutamate, L-lactate, histamine etc.) par des biocapteurs enzymatiques^[183,365-369] ou par des dispositifs analytiques de séparation par chromatographie.^[370,371] Le peroxyde d'hydrogène est généré par les réactions enzymatiques impliquant les enzymes oxydases. Il est également consommé en présence d'enzymes

peroxydases.^[372, 373] Des biocapteurs enzymatiques basés sur l'activité de ces enzymes ont ainsi été développés en s'appuyant sur l'électrochimiluminescence du luminol.^[374] Un autre type d'applications de l'électrochimiluminescence du luminol concerne la détection des radicaux libres (ONOO^- , $\text{O}_2^{\bullet-}$, etc.).^[375, 376] Une telle détection utilisant le luminol a été appliquée à l'étude de processus cellulaires comme le stress oxydatif des cellules vivantes.^[194, 377-379] Durant ces processus, le peroxyde d'hydrogène est l'une des formes réactives de l'oxygène libérées par la cellule stressée.

Dans ce travail, nous utilisons le réseau de capteurs pour visualiser à distance le peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire du luminol. Le schéma expérimental est identique à celui de la figure 10. Le réseau opto-électrochimique est maintenant placé dans une solution de tampon borate (pH = 10) contenant 1mM de luminol et 10 mM de H_2O_2 . La valeur du pH est fixée à 10 car la luminescence est alors maximale dans nos conditions expérimentales.^[380] La figure 15 représente l'image codée de l'intensité d'une région représentative du réseau de capteurs lorsque l'électrochimiluminescence est initiée en appliquant à la couche d'ITO un potentiel de 0,8 V/Ag/AgCl. L'imagerie électrochimiluminescente à distance est réalisée à travers le réseau de capteurs lui-même.

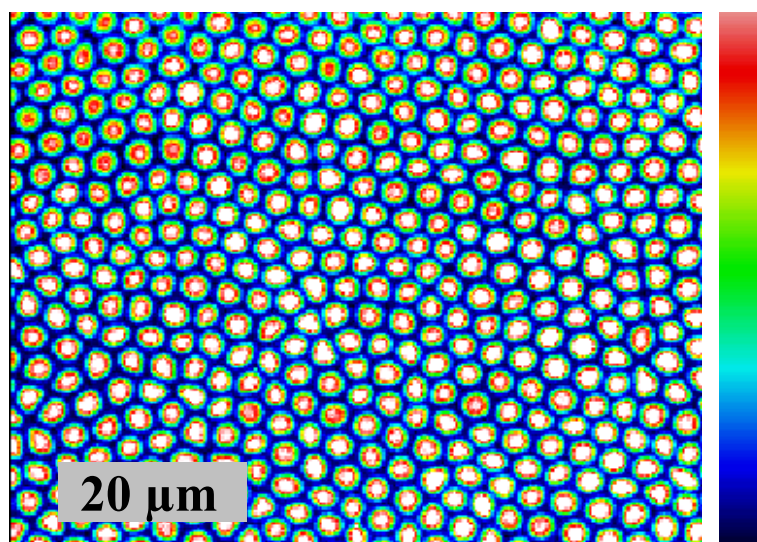
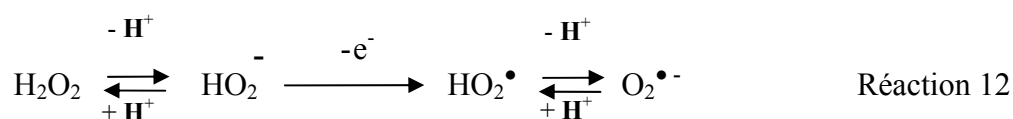


Figure 15 : Image électrochimiluminescente obtenue à la face proximale du faisceau lorsque le réseau est plongé dans une solution de luminol 1mM et de H_2O_2 10 mM (tampon borate pH = 10). Le potentiel appliqué est de 0,8 V/Ag/AgCl. Les niveaux d'intensité lumineuse sont codés en fausses couleurs. Le bleu représente les faibles valeurs d'intensité.

La répartition ordonnée des cœurs optiques très brillants est très distinctement visualisée. L'intensité de luminescence générée et collectée par chaque cœur est relativement uniforme. Comme pour le cas du Ru(bpy)₃²⁺/TPrA, cela indique que les dimensions des capteurs formant le réseau sont très proches. Cette image confirme le résultat de la figure 11 qui a été acquise avec un système électrochimiluminescent très différente de celui-ci. Pour ce système, l'image acquise à distance avec la caméra CDD permet également de mesurer simultanément et individuellement l'électrochimiluminescence de tous les capteurs du réseau.

3.2.2 Effet du potentiel sur l'intensité d'électrochimiluminescence

L'électrochimiluminescence est mesurée en solution en vue d'applications potentielles pour l'imagerie quantitative à distance du peroxyde d'hydrogène. Afin de trouver les conditions optimales, l'influence du potentiel appliqué au réseau d'ITO est étudiée. Le mécanisme réactionnel conduisant à l'émission du système luminol/H₂O₂ a été reporté à plusieurs reprises dans les revues dédiées aux applications analytiques de l'électrochimiluminescence.^[175, 340, 381] Les différents chemins réactionnels sont supposés fortement dépendre du matériel d'électrode et du potentiel appliqué.^[176, 382, 383] La réaction luminescente peut être initiée par l'oxydation du luminol directement à l'électrode. Cela conduit alors à la formation de l'état excité du 3-aminophthalate par un chemin impliquant le luminol diazaquinone avec le peroxyde d'hydrogène (Figure 14). Lorsque le potentiel est plus élevé, H₂O₂ est également oxydé à l'électrode simultanément au luminol. L'un des chemins réactionnels supposés implique la réaction du radical diazasemiquinone avec un radical superoxide O₂^{•-} issu de l'électrooxydation de H₂O₂ à l'électrode (Réaction 12).



La figure 16 montre l'influence du potentiel sur le courant faradique total de l'ensemble du réseau (courbe A) et sur l'intensité d'électrochimiluminescence moyenne transmise par les capteurs du réseau (courbe B). La réponse voltamétrique (courbe A) est quasi-idéale à la vitesse de balayage de 10 mV/s. L'allure quasi-stationnaire du courant mesuré démontre le très bon comportement électrochimique du film d'ITO pour ce système électrochimiluminescent. Le profil sigmoïdal est caractéristique d'un réseau d'ultramicroélectrodes fonctionnant en régime de diffusion radiale.

L'ITO est un très bon matériau d'électrode pour ce type d'applications. En effet, lorsqu'on le compare à d'autres matériaux d'électrode pour l'oxydation du luminol, il favorise majoritairement la formation du produit luminescent au détriment d'autres produits de réactions qui ne sont pas impliqués dans le mécanisme de chimiluminescence.^{[176, 384[#370} De plus, l'ITO offre une forte transparence optique à la longueur d'onde correspondant à l'émission de luminescence (425 nm).

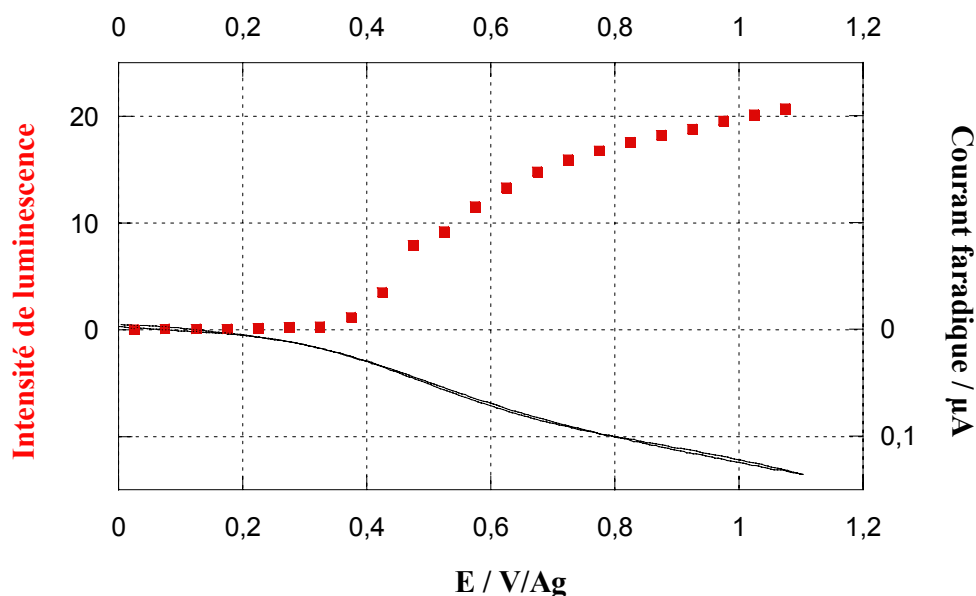


Figure 16 : (A) Voltamogramme cyclique quasi-stationnaire obtenue en plongeant le réseau dans une solution de tampon borate pH = 10 contenant 0,5 mM de luminol et 10 mM de H_2O_2 (vitesse de balayage égale à 10 mV/s) (B) Intensité de luminescence normalisée qui est collectée à travers le réseau en fonction du potentiel appliqué.

Les points de la courbe (B) représentent la valeur de l'intensité moyenne de l'image correspondant à une région d'intérêt sélectionnée (Figure 15). Pour 0 V/Ag, aucune réaction ne se produit. Le courant faradique est nul et aucune luminescence n'est détectée. L'oxydation du luminol se produit vers 0,45 V/Ag. On peut alors observer un début de signal lumineux. Lorsque le potentiel continu de croître, l'évolution de l'intensité de luminescence électrogénérée suit de façon assez proche l'évolution du courant faradique. L'intensité lumineuse atteint une valeur plateau aux environs de 0,8-0,9 V/Ag, c'est-à-dire exactement lorsque le voltamogramme tend vers un régime quasi-stationnaire. Par ailleurs, lorsque le potentiel est maintenu constant à 0,8 V/Ag, le signal électrochimiluminescent est stable pendant plusieurs minutes. Ce comportement stable est en accord avec le régime quasi-stationnaire obtenu en voltammétrie.

3.2.3 Détection quantitative de H₂O₂

Dans les conditions expérimentales utilisées, la mesure à distance de l'électrochimiluminescence du système luminol/H₂O₂ est stable pendant plusieurs minutes (~20 mn) lorsque le potentiel du réseau est fixé à 0,8 V/Ag.^[382] Nous avons donc utilisé cette valeur de potentiel pour calibrer quantitativement l'électrochimiluminescence générée et collectée à distance par le réseau. Sur la figure précédente, on s'aperçoit que ce potentiel ne correspond pas à l'intensité maximale. Cependant, lorsque le potentiel appliqué est plus élevé que 0,8 V/Ag, la stabilité et la reproductibilité de la mesure sont fortement compromises. En effet, l'intensité électrochimiluminescente et le courant faradique tendent, dans ce cas, à diminuer progressivement. Il a été reporté que, en solution aqueuse et au-delà de 1,2V/Ag, les surfaces d'ITO peuvent se dégrader de façon irréversible par corrosion. L'ITO est supposé se recouvrir progressivement d'un film d'oxyde SnO₂ isolant, causant la perte du caractère semi-métallique de la surface.^[176, 322, 385] Par ailleurs, lorsque le potentiel appliqué est supérieur à environ 1V/Ag, l'oxydation de H₂O₂ directement à l'électrode n'est plus négligeable. Cette réaction conduit à la formation d'un radical hydroperoxyde (Réaction 12) qui est susceptible de s'adsorber à la surface de l'électrode et de la passiver.^[176]

La figure 17 présente la courbe de calibration obtenue pour l'intensité électrochimiluminescente du luminol en fonction de la concentration en H₂O₂. La concentration en luminol est fixée à 1mM dans la solution de tampon borate à pH = 10. Le potentiel est de 0,8 V/Ag. La courbe de l'intensité de luminescence collectée en fonction de la concentration en H₂O₂ est linéaire entre 50 μM et 2 mM, avec un coefficient de corrélation de 0,998. La limite absolue de détection de H₂O₂ par cette méthode d'imagerie à distance est de 10 μM. La sensibilité de la caméra CCD est ici le facteur le plus limitant. En effet, dans le cas du système luminol/ H₂O₂, l'intensité de luminescence mesurée est beaucoup plus faible que pour les systèmes basés sur Ru(bpy)₃²⁺.

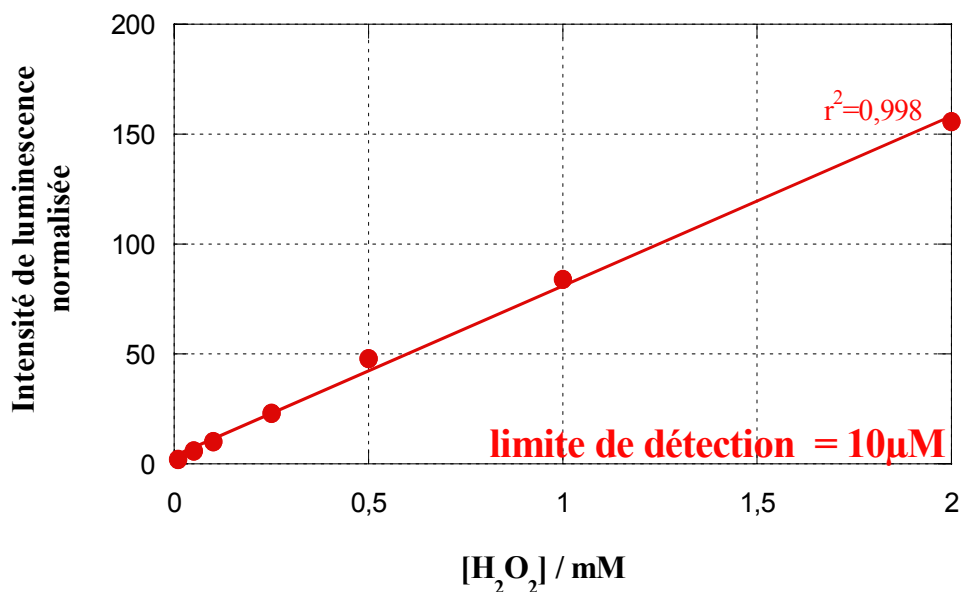


Figure 17 : Courbe de calibration pour H₂O₂. La solution employée contient une concentration fixe de 1 mM de luminol, dans une solution tampon borate à pH = 10. Le potentiel appliqué est de 0,8 V/Ag.

L'intensité de la mesure est tout à fait stable, même après vingt échelons de potentiel successifs à 0,8 V/Ag. Enfin, pour les fortes concentrations en H₂O₂, comprises entre 2 et 10 mM, les valeurs de l'intensité sont nettement plus faibles que celles que l'on pourrait prédire de la courbe de régression linéaire (données non présentées). Pour expliquer l'affaiblissement de l'intensité collectée lorsque H₂O₂ est présent en grande quantité, la première piste envisageable peut être des effets de passivation vis-à-vis de l'électro-oxydation du luminol. Une autre piste peut être liée à l'influence du pH sur le mécanisme réactionnel. En effet, il est montré qu'une diminution locale du pH peut être la cause d'une extinction de la luminescence.^[176, 386]

4 Imagerie en lumière blanche *via* le réseau de capteurs opto-électrochimiques

La capacité du réseau à transmettre des images cohérentes d'échantillons est ce que nous avons finalement voulu tester. Dans ce but, nous avons essayé de visualiser *via* le réseau un motif micrométrique. Une étude similaire a été réalisée en utilisant un réseau de microcavités optiques créées à l'extrémité de faisceaux d'imagerie.^[362] Le motif observé *via*

ce réseau était une cible spécialement conçue pour évaluer la résolution optique (« Air Force resolution target »). Le motif très simple que l'on utilise ici est constitué de 2 fibres de carbone de 10 μm de diamètre, placées perpendiculairement l'une au dessus de l'autre. A l'intersection des deux fibres de carbone, le motif est donc en 3 dimensions. Dans cette expérience, la face distale polie d'un faisceau d'imagerie et celle du réseau de capteurs sont successivement approchées du motif éclairé en lumière blanche. L'image est acquise en transmission, c'est-à-dire au niveau de la face proximale, par un microscope équipé de la caméra CCD. La figure 18A montre l'image obtenue avec le faisceau cohérent au niveau de l'intersection des fibres. La figure 18B montre celle obtenue pour cette même zone *via* le réseau.

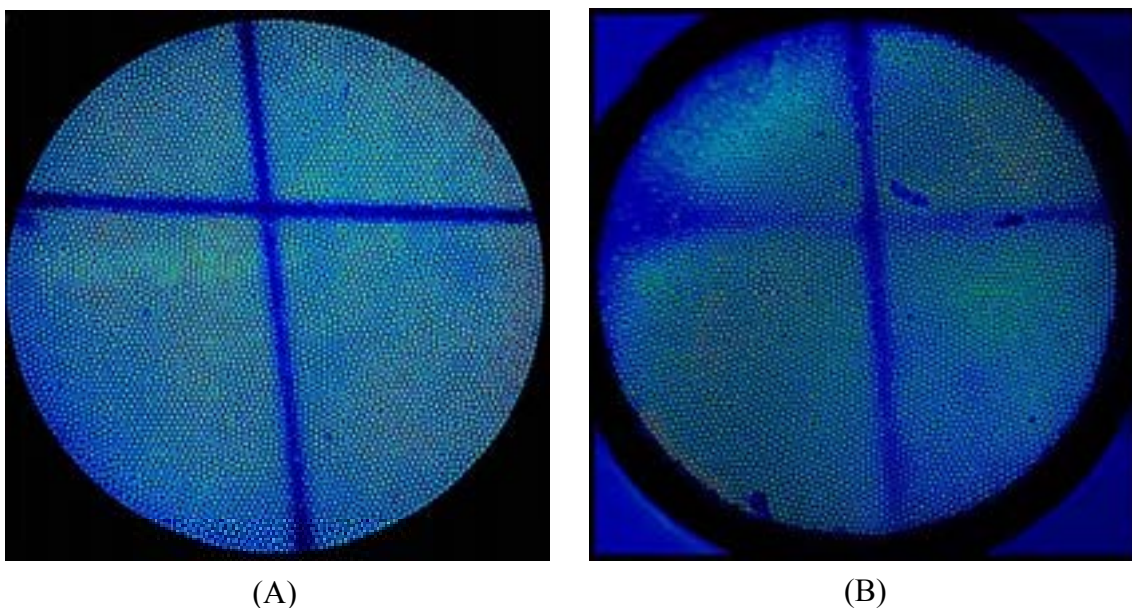


Figure 18 : Images en lumière blanche du motif formé de 2 fibres de carbone. (A) Image acquise à travers un faisceau d'imagerie polie. (B) Image acquise *via* le réseau de capteurs submicrométriques

Sur l'image A, on peut visualiser de façon nette les deux fibres. La zone sombre de l'image reflète la position des microfibrilles. La largeur est représentée par 2 à 3 cœurs optiques. Cette observation est compatible avec la distance inter-cœur (4 μm) et avec le diamètre des fibres de carbone (10 μm). L'image B par contre ne montre de façon claire que la fibre positionnée au dessus (fibre verticale sur l'image). La résolution spatiale est tout à fait similaire à celle du faisceau d'imagerie polie. Cependant, la fibre positionnée au dessous (fibre horizontale) ne peut pas être visualisée précisément car elle ne se situe pas dans le même plan focal que la première. Ainsi, il semble que la distance focale du réseau de

capteurs soit différente de celle d'un simple faisceau cohérent. L'échantillon doit vraiment être au contact avec la surface du réseau, ou au moins à une distance inférieure à 10 μm de celle-ci. Cette caractéristique intrinsèque au réseau peut se révéler d'une grande importance, puisqu'elle permet d'obtenir des images nettes que dans un plan focal précis. En d'autres termes, ce sectionnement de la distance focale est conceptuellement similaire à la microscopie confocale. Cette expérience nous permet de montrer que le réseau de capteurs conserve ses propriétés d'imagerie.

5. Conclusion

Ces travaux présentent une nouvelle approche pour fabriquer un réseau ordonné de capteurs opto-électrochimiques. Ce réseau présente, pour la première fois, une propriété d'imagerie à distance qui est adaptée pour des échantillons de dimension micrométrique. Il se compose de 6000 capteurs submicrométriques qui sont électroactifs et transparents à la lumière visible. Les étapes de fabrication respectent la structure et les propriétés du faisceau cohérent de fibres optiques. L'obtention en voltamétrie cyclique de courant quasi-stationnaire indique que les capteurs constituant le réseau peuvent être considérés comme diffusionnellement indépendants. Par ailleurs, par ce procédé de fabrication, chaque capteur est optiquement connecté à un cœur optique particulier du faisceau cohérent. Cette caractéristique peut ainsi permettre d'apporter ou de recueillir de façon discrète pour chaque capteur des informations spectroélectrochimiques confinée à l'interface avec le milieu extérieur. En particulier, des réactions électrochimiluminescentes peuvent être générées dans les couches de diffusion individuelles des capteurs. La propriété de confinement de la luminescence du système modèle utilisé, le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{tri-}n\text{-propylamine}$, est directement caractérisée en visualisant les spots électrochimiluminescents générés à l'extrémité des pointes. Toutes les pointes dont l'extrémité est couverte d'ITO sont bien électroactives. Ce résultat a été confirmé par plusieurs techniques d'analyse : microsonde Auger, AFM/résiscope et imagerie électrochimiluminescente. En tenant compte des caractéristiques de la collecte et de la transmission des signaux électrochimiluminescents au niveau des capteurs transparents (cône d'acceptance, distance inter-capteurs, etc.), du confinement de la zone électrochimiluminescente à la surface des capteurs par le mécanisme catalytique, nous avons montré que les capteurs sont optiquement indépendants. Comme la structure cohérente du faisceau permet de transmettre une image d'une extrémité à l'autre,^[347] les

images électrochimiluminescentes sont enregistrées à distance. Avec une caméra CCD, tous les capteurs constituant le réseau peuvent être visualisés individuellement avec une seule image. De plus, les intensités transmises par les images sont bien quantitatives. Pour les deux systèmes étudiés ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ et luminol/ H_2O_2), des courbes de calibration de l'intensité lumineuse en fonction des concentrations en réactifs ont été obtenues, démontrant le potentiel analytique de ce type de réseau d'imagerie. En particulier, l'image directe de concentrations micromolaires de H_2O_2 a été réalisée. Pour améliorer la limite de détection, des phénomènes de catalyse de l'électrochimiluminescence de luminol/ H_2O_2 peuvent être testés, par exemple en utilisant des dérivés du ferrocènes^[369, 387] ou des enzymes peroxydase.^[388]

Etant donné le procédé de fabrication employé, les capteurs constituant le réseau ne sont pas individuellement adressables par voie électrochimique. En effet, tous ne peuvent être soumis qu'à un potentiel identique. Le réseau ne peut en conséquence pas être utilisé pour les applications de l'électrochimiluminescence adaptées aux réseaux interdigités.^[181, 242, 243] Cette notion d'adressabilité électrochimique est aussi importante pour le développement de certains types de dispositifs analytiques dans le domaine de l'imagerie bioélectrochimique.^[245, 248] Elle est donc un point limitant important de notre procédé. Cependant, comme les capteurs peuvent être lus indépendamment, on peut obtenir l'image de la distribution spatiale de l'intensité électrochimiluminescente, donc la cartographie du réactif impliqué. Cette étude reste à réaliser. L'électrochimiluminescence est une voie prometteuse pour visualiser à distance la dynamique d'un bio-échantillon *via* le réseau, mais cette analyse spatiale peut éventuellement être complétée par une image de fluorescence si l'échantillon est marqué par une sonde spécifique. En d'autres termes, avec un échantillon adapté, on doit être capable d'obtenir la cartographie chimique d'un composé induisant une réaction électrochimiluminescente, une image en fluorescence et aussi en lumière blanche. Pour des échantillons de cellules vivantes, un exemple de mesure spectroélectrochimique est le suivi optique de signaux chimiques extracellulaires électro-stimulés *in situ* par un réseau d'ultramicroélectrodes.^[389] Le réseau développé dans ce travail peut également trouver des applications dans les dispositifs photoniques ou opto-électroniques.

Pour finir, l'électrochimiluminescence offre des perspectives très riches pour le développement de méthodes d'imagerie à distance de biomolécules. Par exemple, le système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{NADH}$ représente l'une des perspectives de ce travail pour l'imagerie sélective

de biomolécules impliquées dans des réactions catalysées par des enzymes déshydrogénases. Le système luminol/H₂O₂ devrait également pouvoir être couplé avec le fonctionnement des enzymes oxydases génératrices de peroxyde d'hydrogène. Dans cet ordre d'idée, la prochaine étape de développement de ce travail est la fabrication de réseaux de biocapteurs enzymatiques conservant une propriété d'imagerie à distance. Ce travail nécessite de pouvoir immobiliser de façon discrète le luminophore électrochimiluminescent (notamment le Ru(bpy)₃²⁺) et une enzyme à la surface de chacun des capteurs submicrométriques du réseau. Dans un premier temps, la propriété d'adressabilité optique du réseau, où chaque capteur submicrométrique est couplé à un chemin optique qui lui est propre, peut être exploitée pour photopolymériser des microspots polymériques individuels sur chacun d'eux.^[390] Une autre voie possible pour créer un réseau de biocapteurs est l'électropolymérisation contrôlée au niveau des capteurs électroactifs.

CHAPITRE 3 :

DEVELOPPEMENT DE RESEAUX DE NANO-SONDES OPTIQUES ET APPLICATIONS

1. Introduction

La course vers l'infiniment petit a toujours été un moteur de la pensée humaine. Voir, comprendre, manipuler la matière à des échelles de plus en plus petites a toujours été une source d'avancées importantes, voire révolutionnaires, en science. Depuis une à deux décennies, l'échelle de l'infiniment petit se situe au niveau du nanomètre pour les chimistes. Les nanosciences regroupent l'ensemble des études portant sur des phénomènes et des objets de dimensions comprises entre quelques nanomètres et quelques centaines de nanomètres.^[391] Cette définition peut certes être discutée^[392] mais il s'agit, tout de même, d'une échelle particulière qui est source d'une grande richesse scientifique. En plus de la facette tournée vers la recherche fondamentale, les enjeux sont, bien sur, d'ordres technologiques et commerciaux. A cette échelle, les propriétés de la matière sont parfois très éloignées de nos représentations classiques et beaucoup d'entre elles restent à explorer. L'échelle dite « nano » est particulièrement bien adaptée au développement de générations très diverses de matériaux, à la croisée des différentes disciplines : chimie, biochimie, électronique, optique. Certaines classes de nanomatériaux sont, en fait, exploitées depuis longtemps (colloïdes, micelles, dendrimères, copolymère bloc, etc.), d'autres n'ont été élaborées et utilisées que depuis peu (nanotubes,^[393-395] nanoparticules,^[401-404] nanofibres,^[405-408] membranes nanoporeuses,^[396-398] surfaces nanoporeuses,^[399,400] particules quantiques,^[409,410] etc.). Selon les propriétés qu'ils acquièrent, les nanomatériaux sont appliqués à de très nombreux domaines. Ne pouvant être exhaustifs, on peut citer, à titre d'exemple, les capteurs bioélectrochimiques,^[411,412] la biodétection optique,^[413-415] les nanosondes bio-implantables,^[416-418] la catalyse chimique,^[401] le marquage biologiques^[419] etc. Les nanostructures ordonnées permettent, entre autres, de manipuler la propagation de photons ou d'électrons à l'échelle nanométrique. Elles offrent ainsi une large gamme d'applications fascinantes en photonique, optoélectronique ou nanoélectronique.^[406, 420-424]

Ces avancées se font simultanément aux multiples développements de nouvelles techniques fournissant une information caractéristique de cette échelle. La microscopie à effet tunnel (STM)^[425] et la microscopie à force atomique (AFM)^[426] ont été des instruments pionniers rendant possible la visualisation de nanostructuration et de détails moléculaires, voire atomiques. La résolution spatiale de ces techniques dépend essentiellement du principe de fonctionnement et de la dimension de la sonde qui se déplace de façon régulière au voisinage immédiat de la surface. Par exemple, le STM possède une nanopointe métallique

qui interagit avec une surface conductrice *via* l'effet tunnel. L'enregistrement des variations de l'infime flux d'électrons entre la pointe et la zone analysée, en fonction de la distance sonde/échantillon, permet d'établir la topographie de la surface. Les nanopointes de tels microscopes peuvent également servir à manipuler directement les atomes et molécules à la surface, lorsque l'on augmente intentionnellement l'interaction entre la pointe et le substrat. Une telle approche a été appliquée au développement de nanostructures organisées.^[427-429]

Manipuler la matière à l'échelle nanométrique est évidemment d'une importance essentielle, mais une véritable maîtrise implique également de pouvoir la caractériser. Conceptuellement, l'idée d'une telle mesure est de confiner une perturbation au niveau nanométrique, puis de recueillir la réponse localisée qui en résulte.

En microscopie optique classique, la résolution spatiale est limitée par la barrière d'Abbé relative à la diffraction de la lumière qui a été décrite il y a plus d'un siècle.^[430] La résolution latérale, c'est-à-dire la distance Δx minimale entre deux objets que l'on peut distinguer, est alors restreinte à une valeur de l'ordre de la demi-longueur d'onde de la lumière émise ($\Delta x = \lambda/(2\pi \cdot NA)$, où NA est l'ouverture numérique de la lentille).^[283] Cela signifie que, dans le domaine visible, où se situe la majeure partie des applications de la fluorescence, les objets de dimension inférieure à environ 300/250 nm ne peuvent donc pas être analysés. Cette caractéristique limite fortement l'étude de nanomatériaux ou de processus se déroulant à cette échelle. En plus de la limite liée à la diffraction, la profondeur de champ d'un microscope conventionnel est au mieux de 1,6 μm .^[431] Pour des échantillons plus épais que cette profondeur de champ, les images sont rendues floues par les photons émis hors du plan focal. De même, pour les applications spectroscopiques corollaires à la microscopie, les signaux subissent l'interférence d'un bruit de fond considérable provoqué par les photons hors du plan focal. Des techniques de mise en œuvre particulière de la microscopie permettent donc d'améliorer la résolution latérale et/ou d'atténuer la lumière parasite.^[431] Par exemple, la microscopie confocale (voir aussi Chapitre 1) utilise un spot de lumière très concentré au lieu d'un plan large d'illumination et un diaphragme est placé devant le détecteur pour filtrer les photons « out-of-focus ». Ces deux améliorations permettent de bénéficier d'un facteur 2 à la fois sur la résolution latérale et longitudinale. Les microscopies basées sur l'optique non linéaire, comme le microscope d'excitation à 2 photons, n'améliorent sensiblement que la profondeur de champ, par confinement des effets de la lumière non pas du point de vue spatial mais spectral.^[130, 431] Une autre méthode pour

atténuer la profondeur de champ est d'utiliser des dispositifs à radiations d'ondes évanescentes. En effet, lorsqu'une radiation lumineuse est transmise à l'intérieur d'un guide d'ondes par réflexion totale interne multiple, l'une des composantes électromagnétiques de la lumière, dite onde évanescente, peut s'extraire du guide d'ondes vers l'environnement extérieur. Son intensité décroît exponentiellement avec la distance à l'interface. C'est le champ proche optique, caractérisé par une « profondeur de pénétration » maximale de l'ordre de 300 nm. Un tel phénomène est par exemple utilisé comme alternative au développement de biocapteurs optiques basés sur la fluorescence, à partir des fibres optiques notamment.^[432-434] Le champ proche y permet d'exciter spécifiquement des fluorophores immobilisés non plus à l'extrémité de la fibre optique (voir Annexe 1), mais sur sa surface longitudinale. La caractéristique spectrale des ondes restant guidées par la fibre est modifiée suite aux interactions moléculaires extérieures qui altèrent la fluorescence en champ proche.

Utilisé dans une configuration différente, le champ proche optique s'est révélé être la clé vers l'imagerie optique résolue à l'échelle sub-longueur d'onde. Un tel concept a été décrit pour la première fois en 1928,^[435] mais ce n'est qu'après l'avènement des microscopies STM et AFM qu'a émergé progressivement la microscopie à champ proche optique.^[436-438] Elle permet de visualiser des détails au-delà de la limite de diffraction de la lumière. La microscopie à champ proche optique, ou SNOM, existe sous plusieurs configurations.^[283, 431] La plus courante utilise une source lumineuse de dimension sub-longueur d'onde qui est déplacée par asservissement piézoélectrique à proximité immédiate de la surface d'un échantillon.^[439] De telles nanosources optiques sont fabriquées généralement par étirement d'une fibre optique jusqu'à l'obtention d'une pointe nanométrique à son extrémité. Les côtés de la pointe sont ensuite recouverts par un métal de façon à ne laisser qu'une petite ouverture optique à son extrémité. Les propriétés réfléchissantes de cette enveloppe métallique permettent de concentrer au niveau de la nano-ouverture la lumière d'un laser introduite dans la fibre à l'autre extrémité. Par ailleurs, les propriétés même de la lumière sont fortement modifiées lorsqu'elle se propage au niveau de la partie effilée et métallisée de l'extrémité de la pointe optique. En effet, le confinement des ondes lumineuses qui s'y produit engendre la formation d'une onde évanescente, d'intensité exponentiellement décroissante avec la distance à l'ouverture.^[283, 440] Si l'extrémité de la sonde optique est positionnée à une distance suffisamment proche de la surface (c'est-à-dire inférieure à la longueur d'onde), l'onde évanescente est forcée d'interagir avec l'échantillon, provoquant un effet d'exaltation lumineuse se limitant à une zone de taille similaire à celle

de la nano-ouverture. L'intensité de la lumière résultante en ce point précis peut alors être mesurée en champ lointain par un microscope conventionnel, en transmission ou réflexion selon la nature du substrat. La mesure est ensuite répétée en positionnant la pointe à un emplacement différent de la surface étudiée. L'ensemble des données locales est finalement traité pour reconstruire l'image optique de l'échantillon. En enregistrant en parallèle la distance pointe/échantillon, l'image topographique peut être obtenue en plus de l'image optique. La résolution latérale, relative au degré de confinement de la lumière, dépend très fortement du diamètre de la nano-ouverture. Elle dépend aussi de la distance entre la nano-sonde et la surface, du fait de l'élargissement des lignes du champ évanescent en direction de la surface de l'échantillon.

La microscopie à champ proche optique se caractérise donc essentiellement par l'exploitation des propriétés non-propagatives de la lumière transmise par une nano-ouverture. Les images de nano-objets proviennent pourtant des mêmes mécanismes de contraste optique que ceux de la microscopie classique (réflectivité, polarisation, biréfringence, etc.).^[440] Comme cette dernière, la microscopie à champ proche optique peut aussi être couplée avec certaines spectroscopiques pour obtenir, en plus de l'image, des informations physico-chimiques suite à la stimulation optique.^[441] La spectroscopie Raman est exploitée en champ proche en profitant, par exemple, des effets d'exaltation de surface (SERS).^[441-443] Cependant, la fluorescence demeure la principale source d'applications dans les domaines de la physique, de la biologie ou de la chimie analytique.^[444] Pour citer quelques exemples, l'application la plus développée est certainement l'étude par fluorescence de la molécule unique.^[445] Les résultats obtenus par ce type d'expérience démontrent la performance de cette microscopie en terme de résolution spatiale et de limite de détection. Cette approche ouvre des horizons pour l'analyse du Vivant en permettant une meilleure compréhension des phénomènes biochimiques fondamentaux avec une résolution moléculaire.^[446] Une application récemment développée est l'imagerie d'un brin d'ADN ou d'une protéine unique.^[447,448] Une autre catégorie d'applications très développée est l'analyse nanoscopique de films structurés (polymères conducteurs, surfaces hybrides, nanostructures métalliques, structures photoniques, cristaux liquides, etc.).^[444] Les domaines d'applications sont très vastes et illustrent parfaitement la flexibilité des mécanismes de contrastes optiques applicables en champ proche, ainsi que la puissance de cette méthode d'imagerie pour collecter simultanément une information spectrale et topographique à l'échelle nanométrique.

Le développement de nanosondes pour la microscopie à champ proche optique a ouvert la voie à de nouvelles applications analytiques dans le domaine des nanocapteurs optiques et des nanobiocapteurs.^[71] Ces nanocapteurs permettent d'étudier des processus à l'échelle submicrométrique dans des cellules vivantes. Du fait de sa dimension, un nanocapteur à fibre optique permet l'analyse de volumes réduits d'au moins 6 ordres de grandeur par rapport aux capteurs usuels, pour un temps de réponse 100 fois plus rapide (de l'ordre de la centaine de microsecondes). Plusieurs exemples d'applications pour la détection de gradient de pH, de gradients de concentrations d'ions physiologiques (Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , etc.) ou d'autres biomolécules au niveau intracellulaire ont été présentés.^[73-76]

Dans ce troisième chapitre, nous allons exposer une nouvelle voie pour l'imagerie en champ proche optique. Elle repose sur la fabrication d'un microréseau ordonné de nano-ouvertures. En s'inspirant de la stratégie de la microscopie à champ proche optique qui utilise une seule nanopointe à ouverture, l'outil que nous avons fabriqué comprend plusieurs milliers de ces nano-sondes, disposées en réseau à la surface d'un faisceau cohérent de fibres optiques. Cette structure ordonnée est caractérisée par la microscopie électronique à balayage et par la microscopie AFM à pointe conductrice. Ce réseau possède la particularité originale de combiner propriétés d'imagerie et propriétés électrochimiques. La combinaison de signaux optiques et électrochimiques est, d'une manière générale, une approche particulièrement intéressante pour accroître la sélectivité et/ou la sensibilité d'une mesure.^[186, 449] L'un des moyens de mener des investigations spectroélectrochimiques est par exemple de moduler un signal optique ou spectroscopique par contrôle électrochimique. Plusieurs types de microcapteurs ont démontré ce principe de manipulation de la fluorescence à l'échelle micrométrique.^[187, 260, 261, 271] Le contrôle électrochimique des propriétés optiques d'un système a également été montré récemment pour des monocouches auto-assemblées à base de sondes photo-absorbantes comme $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.^[450] Dans ce travail, les propriétés opto-électrochimiques du réseau de nano-ouvertures seront présentées en utilisant les caractéristiques extraordinaires de la molécule $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Nous montrerons que la photoluminescence générée dans le champ proche par chacun des capteurs peut être modulée électrochimiquement à l'échelle nanométrique. A la fin de ce chapitre, nous présentons une étude des propriétés optiques en champ lointain du réseau de nano-sondes. Ces résultats mettent en avant les applications potentielles de ce type de réseau pour l'imagerie dans le champ proche optique, notamment pour les échantillons « mous » telles que les cellules vivantes.

2. Fabrication et caractérisation

Une nano-sonde à ouverture, basée sur une fibre optique, a pour principale caractéristique géométrique un profil effilé à son extrémité formant une pointe atteignant une dimension nanométrique. Les deux méthodes les plus couramment employées pour produire ce type de pointes sont l'étirement à chaud sous l'effet d'une fusion locale induite par un laser à CO_2 ^[285, 286] et la dissolution chimique contrôlée.^[281, 287, 288] Cette seconde méthode est principalement employée avec les fibres optiques à base de silice, grâce à l'utilisation de solutions contenant de l'acide fluorhydrique qui est très corrosif pour ce matériau. A la suite de cette attaque chimique, un traitement de la nanopointe par une solution basique de fluorure d'ammonium permet d'obtenir une surface de pointe parfaitement lisse par dissolution des amas de résidus formés sur la surface. Ce procédé est plus reproductible que la méthode par étirement sous fusion locale et elle permet d'obtenir des pointes dont l'angle est plus faible. L'étape qui conduit à l'obtention d'une nano-ouverture métallique sur une fibre optique unique est généralement un dépôt opaque d'aluminium par évaporation sous vide sur les flans de l'extrémité effilée (la nanopointe) de la fibre. La fibre est positionnée inversement au sens du dépôt de façon inclinée. Elle est également en rotation régulière autour de son axe, de manière à assurer un dépôt uniforme tout autour de la partie effilée. L'inclinaison permet de ne pas recouvrir l'apex de la nanopointe lors du dépôt, afin d'y conserver une ouverture de taille sub-longueur d'onde à travers le métal. Les propriétés réfléchissantes du métal confinent la lumière jusqu'au niveau de l'ouverture nanométrique. L'aluminium est généralement choisi pour les applications de spectromicroscopie à champ proche dans le domaine visible (fluorescence, Raman). Ce métal est déposé relativement facilement, sans formation d'oxydes métalliques qui endommagent fortement la réflectivité du revêtement métallique de la nanopointe.^[444] L'épaisseur globale du dépôt métallique doit être nettement supérieure à la profondeur de pénétration de la lumière dans le métal (« épaisseur de peau »). Pour une radiation de longueur d'onde 500 nm, l'épaisseur de peau qui représente la longueur de la décroissance exponentielle caractéristique d'une onde électromagnétique se propageant dans un métal, est de l'ordre de 13 nm pour l'aluminium. L'épaisseur de métal déposé sur la région effilée de la fibre est donc généralement comprise entre 50 et 200 nm, condition suffisante pour éviter la fuite de lumière à travers les flans métalliques de la nanopointe, et donc la perte de la résolution spatiale.^[444]

2.1 Etapes de fabrication

Les étapes de fabrication sont en partie similaires à celles des capteurs présentés au chapitre 2. Le matériau initial est toujours un faisceau cohérent comprenant 6000 fibres optiques monomodes de 3 μm de diamètre. A l'extrémité polie du faisceau, chacun des cœurs est façonné de manière à produire une nano-sonde optique. La fabrication de ce réseau nécessite 4 étapes distinctes, qui sont schématisées sur les figures 1A à 1E :

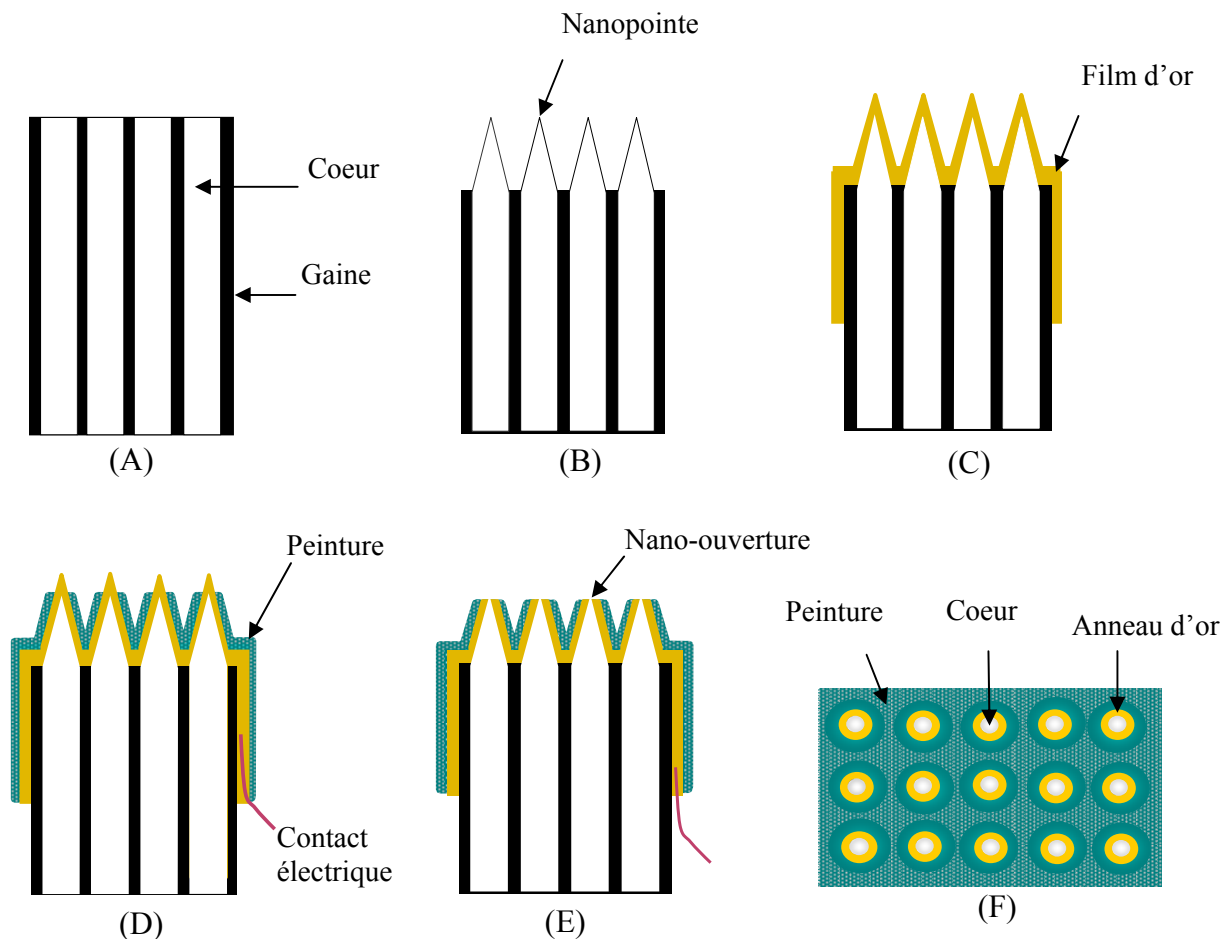


Figure 1 : (A-E) Représentations schématiques (vue en coupe) des différentes étapes de fabrication d'un réseau de nano-ouvertures opto-électrochimiques. (F) Structure finale de la surface (vue de dessus)

La première étape de fabrication est l'obtention du réseau de nanopoints par dissolution chimique sélective, comme décrit au chapitre 2. Par contre, le métal que l'on a choisi de déposer est l'or. Il va confiner la lumière jusqu'à la nano-ouverture. Ce métal est beaucoup mieux adapté que l'aluminium pour les applications électrochimiques visées. Ensuite, du fait de la configuration en réseau, la méthodologie pour déposer le métal diffère

de celle d'une nano-ouverture unique. En effet, si le réseau est incliné par rapport à la cible d'or pulvérisée, chaque pointe individuelle empêche le dépôt du métal sur les flans des pointes voisines par effet d'ombrage.^[283] Pour remplacer le procédé conventionnel de formation de nano-ouvertures, trois étapes sont nécessaires. La première consiste à déposer de façon uniforme par pulvérisation cathodique un film d'or de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur sur la surface structurée des nanopointes optiques. L'ensemble de la surface est ainsi recouvert, c'est-à-dire aussi bien l'espace entre les pointes que l'extrémité des pointes (figure 1C). Ce dépôt respecte l'architecture ordonnée de la surface en créant un réseau de nanopointes couvertes d'une couche d'or suffisamment épaisse pour bloquer toute transmission lumineuse.

La surface des nanopointes d'or est isolée par un dépôt de peinture électrophorétique.^[278, 284, 310, 311] La procédure de dépôt a été présentée dans le chapitre 2. On obtient ainsi un réseau ordonné d'électrodes d'or coniques (figure 1D).^[80] Après cette étape, les nanopointes d'or demeurent opaques. La quatrième et dernière étape consiste donc à enlever sélectivement la couche d'or non protégée par la peinture à l'extrémité des nanopointes.^[287] Pour cela, le réseau est plongé dans une solution dont la composition dérive de celles des solutions commerciales destinées à la corrosion de l'or (« gold etching solution »). Elles sont à base de iodure de potassium et de diiode. Pour des mélanges KI/I₂ de proportions respectives 4 :1 dilués dans l'eau, la vitesse de corrosion théorique d'une surface d'or modèle parfaitement plane se situe généralement entre 0,5 et 1 µm par minute, selon le degré de dilution. L'extrémité conique d'or de chaque nanopointe est donc dissoute jusqu'à l'obtention d'une ouverture dans la couche de métal. Cette dernière apparaît lorsque le cœur optique effilé sous-jacent affleure au niveau de la couche d'or (figure 1E). La figure 1F représente une vue schématique de dessus du réseau final. Les nanopointes optiques correspondant aux cœurs sont successivement entourés par des anneaux d'or, puis par la couche de peinture isolante. Au final, chacune des nano-ouvertures est optiquement connectée à un cœur optique individuel du faisceau cohérent d'imagerie. Grâce au procédé de fabrication, le film d'or accomplit deux fonctions essentielles. Tout d'abord, il sert à confiner la lumière au niveau de l'apex de chaque nano-sonde.^[283] Ensuite, il sert également de matériau d'électrode pour réaliser des réactions électrochimiques dans l'environnement immédiat de chaque nano-ouverture. Enfin, en jouant sur les conditions de dépôt de la peinture électrophorétique et de dissolution de l'or, nous avons pu préparer des réseaux avec des nano-ouvertures de dimension variable.

2.2 Caractérisations des nano-ouvertures

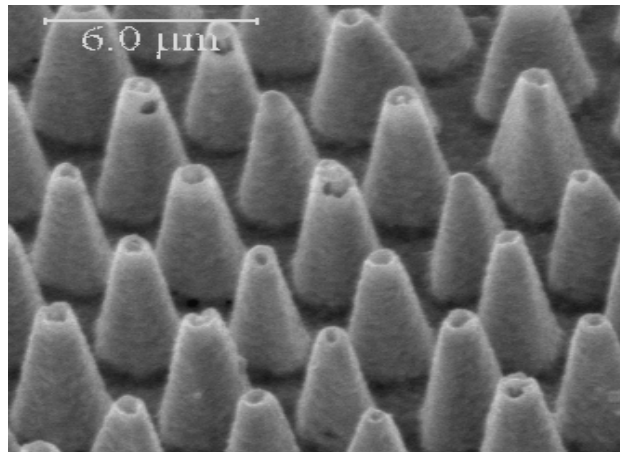
2.2.1 Images en microscopie électronique à balayage

La structure des réseaux de nano-ouvertures a été observée par microscopie électronique à balayage. Cette méthode est très utile pour observer et mesurer les dimensions caractéristiques des nano-sondes. La figure 2 montre des images caractéristiques de la surface du faisceau de fibres optiques enregistrées après les étapes de fabrication décrites ci-dessus. Les images (A) et (B) sont donc obtenues après la formation des nano-ouvertures par dissolution des apex d'or pour deux réseaux préparés dans des conditions différentes. A fort grossissement (figure 2C), on peut voir 2 nano-ouvertures du réseau présenté à l'image (B).

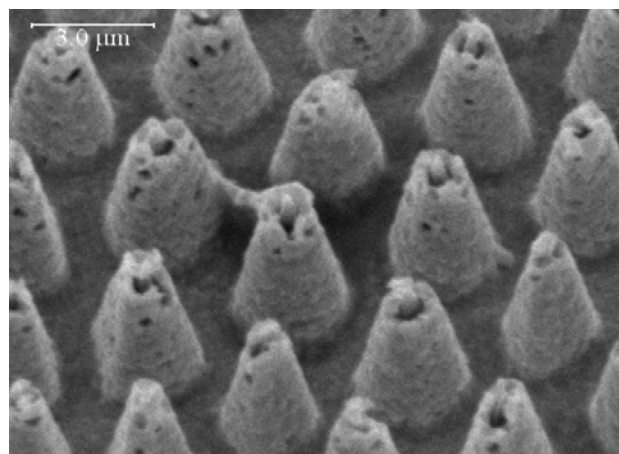
Le film d'or déposé à la surface est tout à fait homogène et respecte l'architecture initiale des nanopointes. En microscopie à champ proche optique, la qualité du dépôt métallique est fortement dépendante de la rugosité de surface de la nanopointe à l'extrémité de la fibre optique.^[281, 283] Généralement, avec la technique de dissolution chimique sélective, la rugosité de la surface dépend très sensiblement des conditions environnementales, comme les vibrations ou les variations locales de température. Dans le cas d'une forte rugosité, la couche métallique peut présenter des trous ou des protubérances. Ces défauts sont complètement rédhibitoires pour la microscopie à champ proche optique.^[451] Dans le cas du réseau de nano-ouvertures, la surface obtenue après la dissolution chimique sélective des cœurs est lisse et régulière. L'absence de poussières ou de résidus sur la surface nécessite un traitement dans un bain aux ultrasons pendant plusieurs minutes juste avant le dépôt d'or. Le film d'or déposé par pulvérisation plasma ne présente pas de défauts visibles (figure 2A) L'épaisseur des films déposés peut être estimée à partir de la vitesse de dépôt du pulvérisateur d'or (environ 100 angströms/minute) et du temps de dépôt.

Les films d'or déposés sont généralement compris entre 100 et 300 nm. La valeur exacte est difficile à connaître avec l'appareillage utilisé. Comme l'épaisseur de peau de l'or est estimée à 30 nm dans le domaine visible,^[272, 287] ces films ont une épaisseur suffisante pour réfléchir totalement la lumière et donc la guider jusqu'à la nano-ouverture. Les pointes d'or restent donc opaques vis-à-vis de la transmission de la lumière visible.

(A)



(B)



(C)

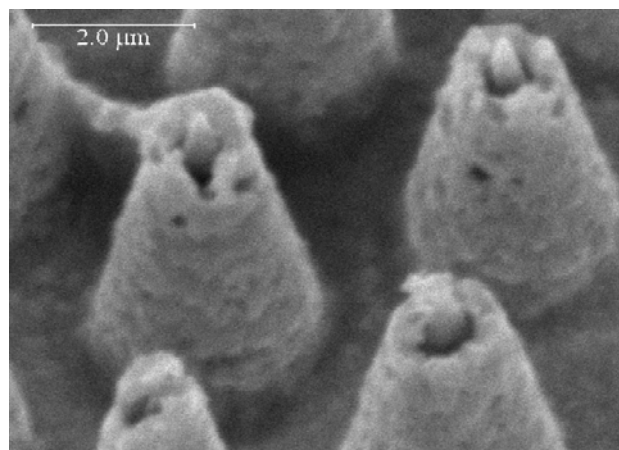


Figure 2 : (A-B) Images de réseaux de nano-ouvertures préparés dans des conditions différentes. Le diamètre moyen des nano-ouvertures est différent sur les deux images. (C) Image à fort grossissement de nano-ouvertures provenant du réseau montré sur l'image B.

Les paramètres de dépôt de la peinture électrophorétique et de dissolution de l'or peuvent être modulés afin de créer des réseaux présentant des rayons d'ouvertures différents. On peut jouer sur la valeur du potentiel cathodique lors du dépôt de la peinture, sur le nombre de dépôts, sur la composition de la solution de KI/I₂ et sur la durée de dissolution chimique de l'or. Les figures 2A et 2B montrent les surfaces de deux réseaux préparés en faisant varier les deux derniers paramètres. Dans les deux cas, les images permettent de vérifier la présence d'ouvertures au niveau des nanopointes. Cette très bonne homogénéité de l'ensemble de la structure permet de valider le procédé employé pour créer des nano-ouvertures de dimensions ajustables. On peut observer entre les 2 images une nette différence de profil et de dimension caractéristique des nano-ouvertures. Sur l'image A, le rayon moyen des ouvertures circulaires est d'environ 150 nm. Par contre, sur l'image B, où l'attaque de l'or est plus longue et la solution plus agressive, la forme des ouvertures est beaucoup plus visible. Les apex des cœurs optiques apparaissent à travers les ouvertures. La figure 2C montre une image à plus fort grossissement. On observe alors distinctement aux extrémités l'apex des cœurs optiques. Ces ouvertures apparentes, de forme conique (c'est-à-dire l'extrémité qui n'est recouverte ni par l'or, ni par la peinture isolante) ont pour diamètre moyen environ 440 nm et pour hauteur 500 nm. Par manque de contraste, nous ne pouvons distinguer l'or de la peinture, même à fort grossissement. L'épaisseur d'une peinture électrophorétique a cependant été estimée en utilisant la microscopie électronique à transmission.^[452] Une peinture déposée en condition anodique sur une nanoélectrode de platine a été observé et son épaisseur estimée (~ 100 nm). Cette valeur semble tout à fait raisonnable au vu de nos observations.

2.2.2 Caractérisation par microscopie AFM à pointe conductrice

En microscopie à champ proche optique, la forme et la géométrie des nano-ouvertures sont des paramètres essentiels pour l'interprétation des images. A la différence d'une nano-sonde unique, les 6000 nano-ouvertures sont ici disposées sur la surface d'un faisceau d'imagerie de 270 µm de diamètre. Nous avons utilisé la technique de microscopie AFM à pointe conductrice (« résiscope »), présentée au chapitre 2, afin d'analyser en détails la structure du réseau de nano-ouvertures. Cette technique fournit simultanément une image topographique et une cartographie de la résistance locale en fonction de l'architecture de la surface. En conséquence, cette méthode peut apporter une information complémentaire par rapport aux images obtenues par microscopie électronique.

La figure 3 regroupe un ensemble de données obtenues par AFM à pointe conductrice pour un réseau de nano-ouvertures tel que celui de la figure 2A. L'image (A) montre la topographie d'une zone particulière du réseau. Elle est associée à l'image (B) qui présente la cartographie de la résistance locale correspond à cette même zone. Cette dernière permet de révéler la présence d'or à l'extrémité de chaque nano-sonde, puisque seul le film d'or est conducteur parmi les constituants du réseau. L'image électrique montre ainsi les « anneaux » d'or qui entourent chaque nanopointe. Par ailleurs, cette image démontre qu'à l'exception de cet anneau, l'ensemble de la surface est isolant. Cette étude indique que la couche de peinture électrophorétique n'a pas été altérée par la dissolution de l'or.

L'image (C) représente les profils linéaires correspondant à la topographie et à la résistance lorsque la pointe AFM parcourt deux nano-ouvertures adjacentes. Le profil topographique montre bien distinctement les zones « creusées » correspondant à la position des ouvertures optiques. Pour le profil électrique, chaque chute brutale de la résistance locale correspond précisément aux anneaux d'or conducteurs situés à l'extrémité des nano-sondes. Ces images et ces profils confirment l'architecture de surface du réseau observée en microscopie électronique. L'obtention d'informations quantitatives à partir de ces images doit en revanche être considérée avec précautions. En effet, la zone de contact entre la pointe AFM et l'échantillon n'est pas parfaitement régulière tout le long du balayage. La taille de la pointe AFM qui est rendue conductrice par un enduit métallique est en fait similaire à celles des nano-sondes du réseau. De plus, le procédé d'asservissement de la pointe AFM peut avoir du mal à suivre parfaitement la topographie de notre échantillon. L'image de résistance locale (D) montre l'anneau d'or d'une nano-ouverture. Elle est obtenue à fort grossissement. Dans ce cas, le balayage est restreint à la seule extrémité d'une nano-sonde. La pointe AFM garde ainsi une certaine « hauteur » par rapport au reste de la structure tridimensionnelle.

La figure 3D montre clairement la présence d'un anneau d'or conducteur régulier autour de l'ouverture optique. La forme en « flèche » de ce motif reflète le phénomène de convolution lié au contact de la nano-ouverture métallique avec la pointe AFM. Lorsqu'elle est située au niveau de l'apex, c'est effectivement *via* son extrémité que s'établit le contact. Si on inverse le sens de balayage, l'orientation de la « flèche » est modifiée et suit le sens du balayage.

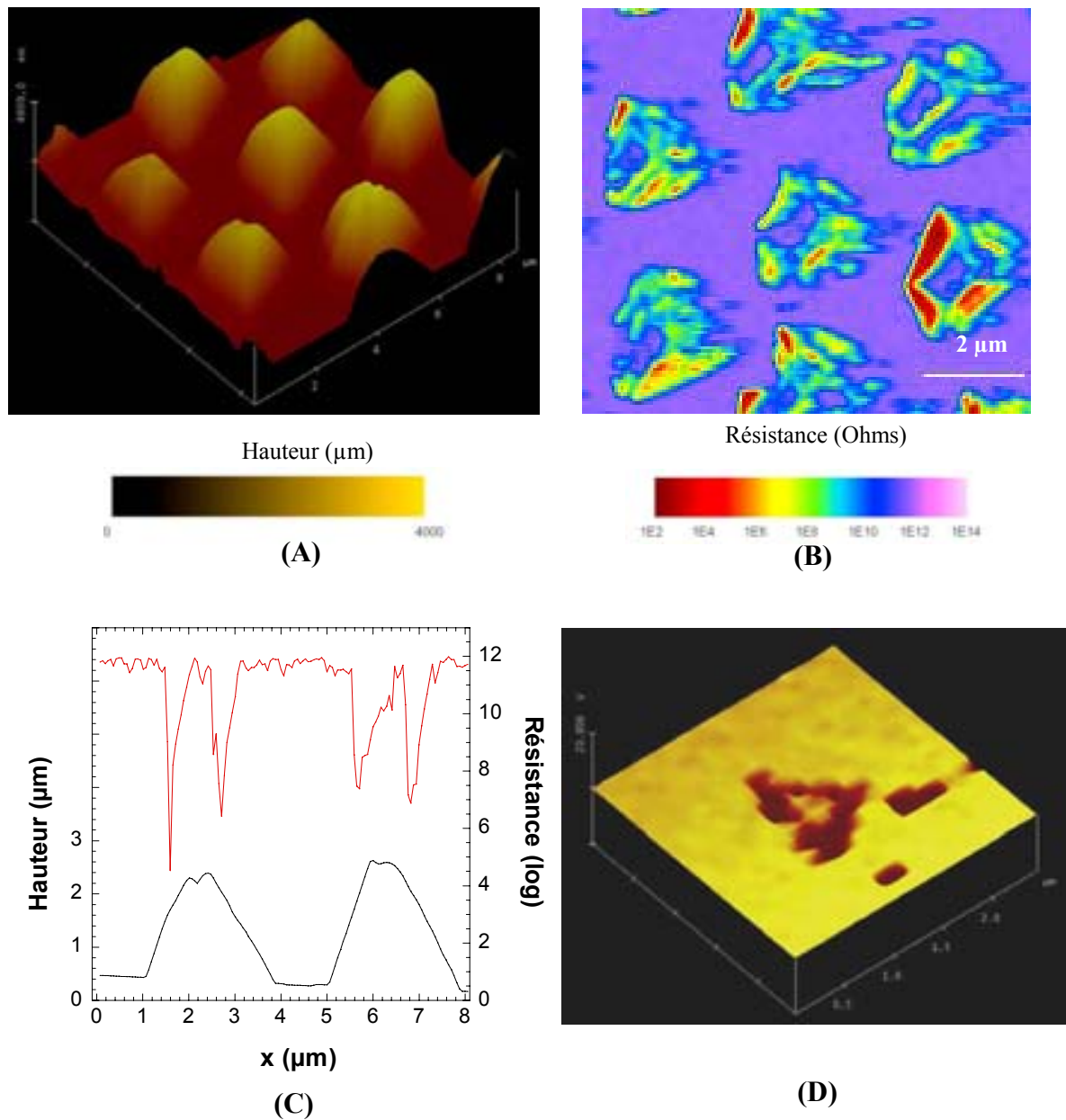


Figure 3 : (A) Image topographique tridimensionnelle et (B) image de la résistance locale de la surface d'un réseau de nano-ouvertures obtenues par microscopie AFM à pointe conductrice. (C) Profils topographique et de résistance, mesurés pour deux nano-ouvertures adjacentes. (D) Image de résistance enregistrée à fort grossissement pour une nano-ouverture.

Cette approche, basée sur la microscopie AFM, s'avère être une technique très intéressante pour compléter les informations structurales des réseaux de nano-ouvertures obtenues par les images de microscopie électronique. Notamment, elle démontre la présence d'un mince anneau d'or autour de la majorité des ouvertures. Par ailleurs, la présence de

zone isolante sur le reste de la surface permet de confirmer que le dépôt électrophorétique résiste à l'attaque chimique de l'or avec la solution iodée. Ce type d'information ne peut pas être obtenu avec la microscopie électronique. Cette méthode permet donc de valider la procédure de fabrication de ce type de réseaux. Par ailleurs, même si la résolution spatiale est altérée par les conditions relatives au relief de l'échantillon, l'analyse des cartographies topographiques et de résistance peuvent fournir des informations additionnelles (forme de la pointe, rayon de courbure, épaisseur du film de métal, etc.) pour l'interprétation des résultats en imagerie à champ proche optique.

3. Propriétés d'imagerie à distance et applications

3.1 Imagerie photoluminescente à travers le réseau

La première étape de cette étude est de tester les propriétés d'imagerie photoluminescente d'un réseau de nano-ouvertures. Nous utilisons l'analyte modèle $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, complexe de métal de transition qui combine des propriétés photochimiques et électrochimiques exceptionnelles. La photoluminescence est sans doute l'une des méthodes analytiques les plus polyvalentes qui peut être utilisée pour la détection ou pour l'imagerie et qui s'adapte à un vaste panel de dispositifs (capteurs à fibre optique, spectroélectrochimie, microscopie confocale, etc.). De plus, diverses propriétés intrinsèques peuvent être exploitées : limite de détection extrêmement faible, sélectivité, émission suivant les différents états d'oxydation du luminophore.

Le schéma du montage utilisé est représenté sur la figure 4A. Il est basé sur l'utilisation d'un microscope épifluorescent associé à un détecteur CCD. Le réseau de nano-ouvertures (face distale) plonge dans une solution contenant 10 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et un électrolyte support. La lumière excitatrice est focalisée sur la face proximale polie du faisceau. Chaque cœur guide la longueur d'onde sélectionnée qui correspond à l'excitation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, par réflexion totale interne, jusqu'à l'autre extrémité. Cette lumière est alors confinée au cours de son passage à travers les nanopointes métallisées et sort au niveau de chaque ouverture.

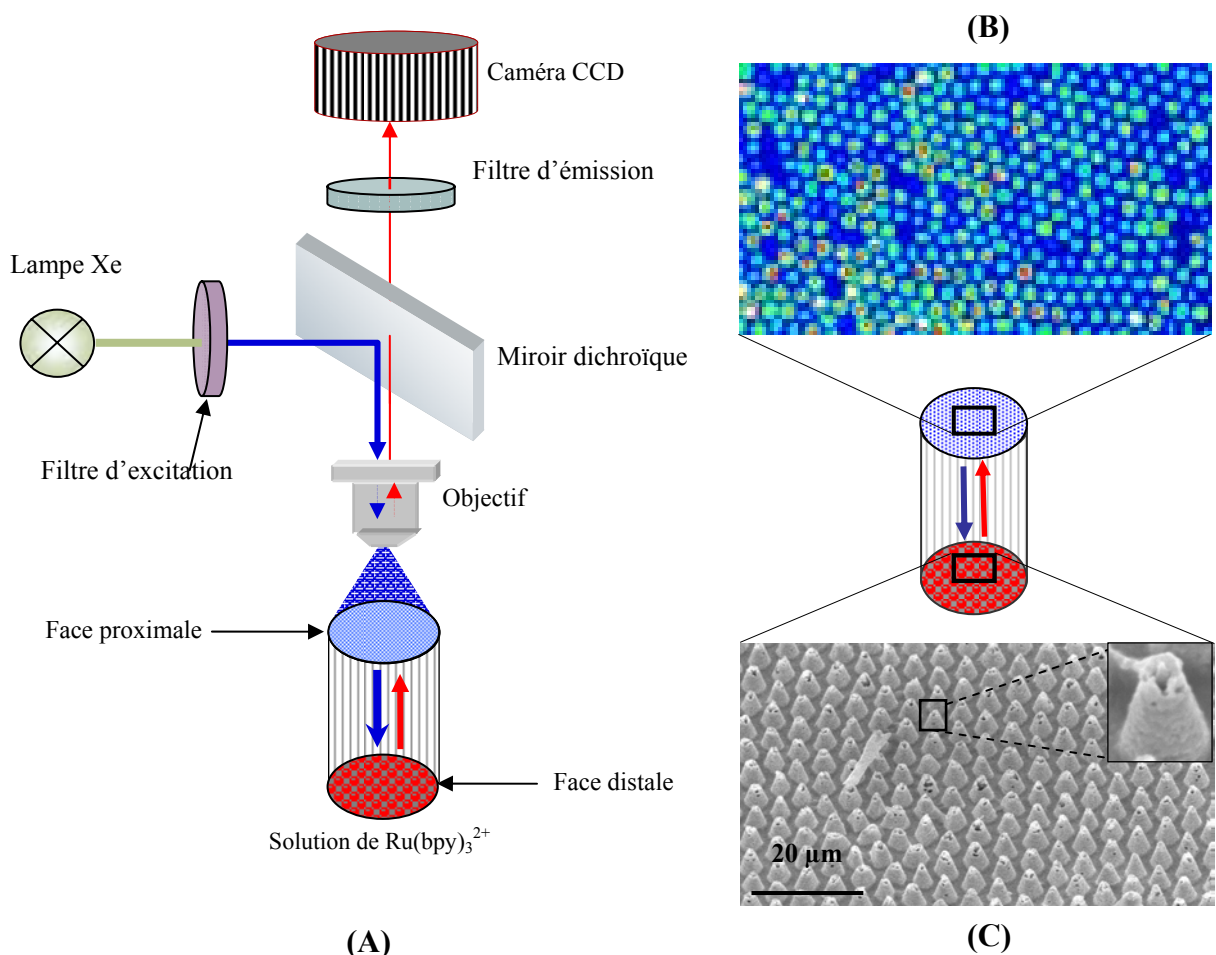


Figure 4: (A) Schéma de principe du microscope épifluorescent utilisé. (B) Image montrant la distribution des intensités de photoluminescence acquises à travers le réseau de nano-ouvertures. (C) Image de microscopie électronique à balayage d'une région représentative de la face distale.

Cette longueur d'onde initie l'émission lumineuse de molécules de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se trouvant à proximité des nano-sondes. Chacune d'elle collecte une fraction de la photoluminescence isotrope qu'elle a induite et qui est ensuite transmise par le cœur optique correspondant à travers le faisceau d'imagerie. La photoluminescence résultante est séparée du faisceau excitateur en traversant le miroir dichroïque et est finalement détectée par la caméra CCD. Avec ce dispositif, l'imagerie de photoluminescence est effectivement réalisée à distance, à travers le réseau de nano-ouvertures lui-même.

La figure 4B montre une image codée en fausses couleurs de l'intensité de photoluminescence transmise par une partie d'un réseau de nano-ouvertures. Les intensités de photoluminescence sont parfaitement stables pendant plusieurs dizaines de minutes. Une

région représentative du réseau utilisé dans cette expérience, comprenant environ 300 nano-sondes, est présentée sur la figure 4C. Etant donné que le faisceau de fibres utilisé est cohérent, la valeur de l'intensité lumineuse transmise par chacun des cœurs optiques jusqu'à la face proximale reflète l'intensité de photoluminescence collectée par chaque nano-ouverture au niveau de la face distale. Une image enregistrée par une caméra CCD permet de lire simultanément l'ensemble des intensités individuelles de photoluminescence de chaque nano-ouverture. En d'autres mots, l'intensité de chaque sonde est mesurée individuellement. Cette image de photoluminescence révèle, par ailleurs, la fraction de nano-ouvertures qui sont optiquement actives. Si l'on considère l'image de l'ensemble du réseau (Figure 5A), l'émission de photoluminescence est détectée à distance pour environ 90% des nano-ouvertures. Il semble que toutes les nano-sondes ne génèrent pas un signal photoluminescent. Cela signifie que l'or n'a pas été enlevé de toutes les extrémités des nano-sondes. Ce défaut propre à la procédure de fabrication des réseaux est probablement dû au recouvrement partiel de certaines nanopointes d'or par la peinture électrophorétique. En conséquence, l'or ne peut être dissout lors de la dernière étape de fabrication et l'ouverture optique n'est pas formée pour ces nanopointes. Il n'y a ni excitation ni émission de la photoluminescence pour ces sondes défectueuses.

Chaque ouverture délivre localement la lumière excitatrice en solution et collecte le signal d'émission correspondant. Cependant, une fraction du signal collectée peut provenir de la photoluminescence initiée par des nano-sondes environnantes. Dans cette géométrie se pose de nouveau la question de l'indépendance optique des nano-sondes. Leur nature et la configuration expérimentale sont très différentes de celles du Chapitre 2. De nombreux aspects sont à prendre en compte. Tout d'abord, en se plaçant au niveau d'une seule nano-sonde, la fraction collectée dépend des caractéristiques géométriques des nano-sondes (dimension, géométrie et ouverture numérique) et des propriétés physico-chimiques de la solution.^[59-62] L'intensité de la lumière excitatrice diminue suite à l'absorption par le luminophore et du fait de l'expansion de l'aire des « cônes » d'excitation issus des nano-sondes.^[61] Ce dernier effet peut être considéré comme inversement proportionnel au carré de la distance à la nano-ouverture (distance r). De même, l'efficacité de collecte de la photoluminescence par une nano-ouverture décroît en $1/r^2$.^[63] Donc, les molécules de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ n'ont pas toutes une contribution égale à l'intensité de photoluminescence collectée. Cette contribution dépend fortement de la distance r de la molécule à la nano-ouverture considérée et elle décroît très rapidement avec ce paramètre.^[61] Ces considérations

optiques indiquent très clairement que l'intensité de photoluminescence collectée provient essentiellement du volume de solution situé très près de la nano-ouverture.

En prenant en compte ces effets ainsi que de la distance entre les nano-sondes, une autre façon de démontrer ce résultat est de considérer la section efficace d'une nano-ouverture par rapport aux sources d'émission environnantes. L'estimation de la fraction du signal transmis par une nano-ouverture mais qui est généré par des sondes voisines peut ainsi être évaluée. Pour cela, les dimensions moyennes caractéristiques d'une ouverture (rayon et hauteur) sont estimées sur la figure 2C. On considère l'émission de photoluminescence qui est initiée par une nano-ouverture et qui arrive sur une autre adjacente. Comme le diamètre moyen des nano-ouvertures est d'environ 220 nm (Figure 4C), nous pouvons considérer que l'émission de photoluminescence initiée par chaque nano-ouverture est une source ponctuelle de lumière de dimension submicrométrique. Cette approximation est d'autant plus justifiée que la concentration de l'espèce absorbante est relativement importante (10 mM) et donc, que la profondeur de pénétration de la lumière excitatrice est très faible dans la solution. Etant donné que la distance entre deux nano-sondes est de 4 μm , la fraction de la photoluminescence émise au niveau d'une nano-ouverture et collectée par une autre est inférieure à 0,15%. L'arrangement des fibres optiques dans le faisceau est quasiment hexagonal, donc chaque nano-ouverture est entourée par 6 spots luminescents. De ce fait, la fraction de la photoluminescence arrivant sur une nano-ouverture mais émanant des six autres immédiatement adjacentes est inférieure à 1% de la photoluminescence qu'elle-même génère. En conclusion, les nano-ouvertures formant le réseau collectent la photoluminescence initiée à leurs apex. Elles peuvent donc être considérées comme optiquement indépendantes dans cette configuration.

3.2 Modulation électrochimique de la photoluminescence

3.2.1 Démonstration du concept en chronoampérométrie

Les propriétés photochimiques de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dépendent de son état d'oxydation : il est luminescent à l'état Ru(II) alors qu'il ne l'est pas au degré d'oxydation Ru(III). En jouant sur cette caractéristique, l'image de photoluminescence acquise à travers le réseau peut être modulée électrochimiquement par les électrodes de forme anneau entourant chaque nano-ouverture.

La figure 5 compare les images de photoluminescence enregistrées (A) avant et (B-C) après l'application d'un potentiel de 1,2 V/Ag. Ce potentiel est suffisamment élevé pour oxyder $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en l'espèce non-luminescente $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ au niveau des anneaux d'or. Des couches de diffusion individuelles se forment ainsi progressivement autour de chaque nano-ouverture. Après 350 ms (Figure 5B), on observe une nette chute de l'intensité. Cette diminution se poursuit pour des temps plus longs (Figure 5C).

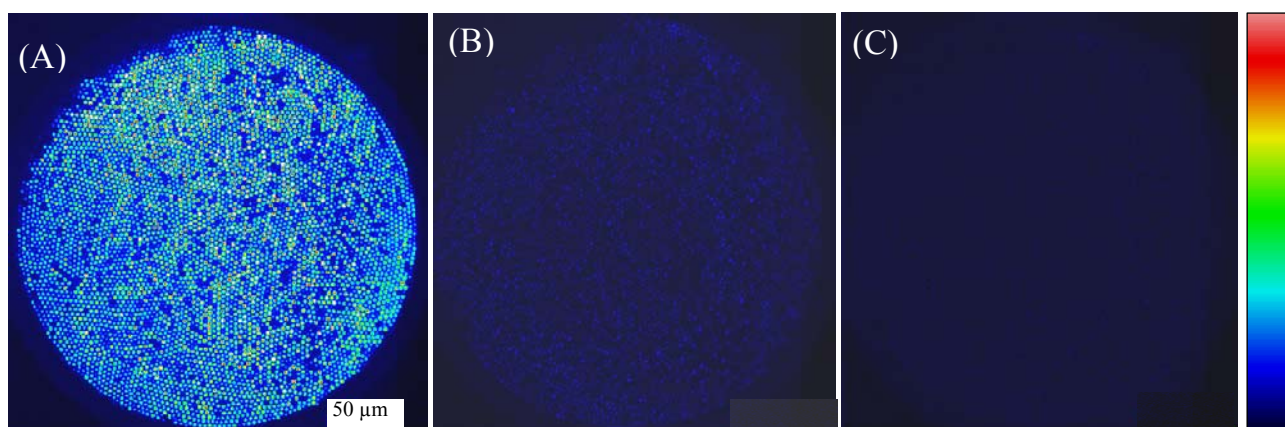


Figure 5 : Images photoluminescentes enregistrées *via* le faisceau de fibres optiques (A) avant et (B-C) à différents temps ($t = 350$ ms et 4,9 s) après l'application d'un potentiel de 1,2 V/Ag. Le réseau de nano-ouvertures est plongé dans une solution contenant 10 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et KNO_3 1M. Le temps d'exposition de la caméra est de 50 ms. Le codage couleur des intensités lumineuses utilise la même échelle pour les trois images. Le noir représente les plus faibles intensités.

En effet, l'intensité de photoluminescence est directement reliée à la concentration de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ localisée au voisinage de la nano-ouverture considérée. L'intensité de la photoluminescence initiée et transmise par chaque nano-ouverture dépend donc de la concentration locale de la forme photoluminescente autour des ouvertures qui est contrôlée par la réaction électrochimique se produisant à chaque anneau d'or. De par la conception du réseau, toutes les ultramicroélectrodes anneau opèrent au même potentiel. Elles ne sont pas individuellement adressables du point de vue électrochimique. En revanche, comme chacune d'elle est connectée à une nano-ouverture correspondant à un cœur optique du faisceau, les intensités photoluminescentes générées et collectées peuvent être individuellement mesurées.

La figure 6 représente la réponse chronoampérométrique et l'évolution de l'intensité de photoluminescence mesurée pour l'ensemble du réseau à la suite du saut de potentiel appliqué à $t = 5$ s. Suite à l'oxydation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, la courbe du courant faradique tend après quelques secondes vers un régime quasi-stationnaire limité par la diffusion.

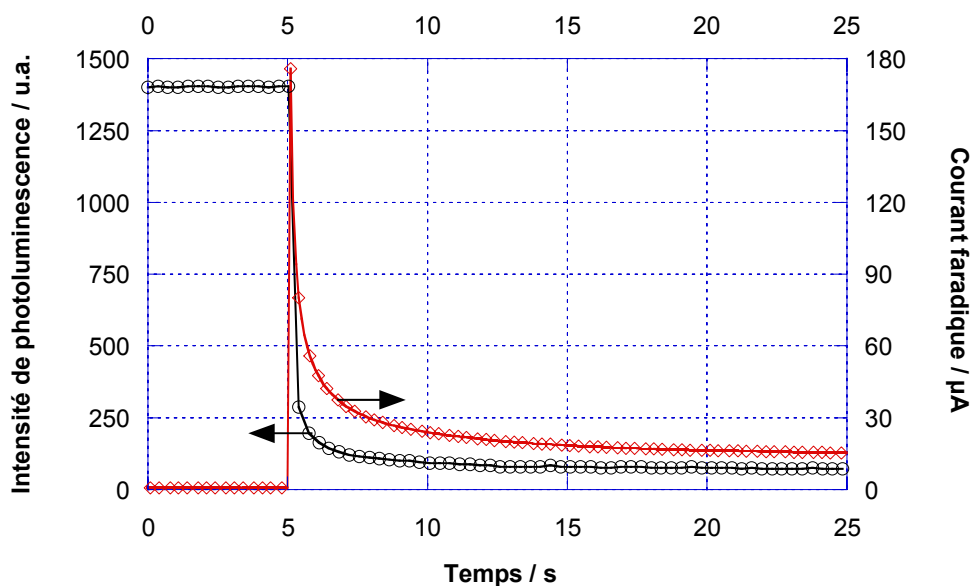


Figure 6 : Evolution de l'intensité de photoluminescence et du courant faradique en fonction du temps. Un potentiel de 1,2 V/Ag est appliqué à $t=5$ s. La solution est de même composition que celle de la figure 5.

Le courant quasi-stationnaire obtenu indique que les ultramicroélectrodes anneau sont suffisamment espacées pour que le recouvrement entre les couches de diffusion puisse être considéré comme négligeable.^[320] Le courant de plateau est alors égal à la somme algébrique des courants individuels de chaque ultramicroélectrode formant le réseau. La valeur expérimentale est de $15 \mu\text{A}$. Cette valeur peut être comparée avec une valeur théorique calculée pour un réseau d'ultramicroélectrodes indépendantes de forme anneau. Une expression semi-analytique du courant stationnaire limité par la diffusion pour une microélectrode anneau disposée dans un plan isolant infini est donnée par :^[453]

$$I_{\text{anneau}} = n F D C^* l_0 \left[1 + \frac{l_0}{(4 \pi^3 D t)^{1/2}} \right] \quad \text{Equation 1}$$

avec D le coefficient de diffusion de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ($D = 5,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$),^[166] C^* la concentration de la solution (10mM) et l_0 un paramètre géométrique qui tient compte des dimensions de l'anneau. Il est défini par l'équation 2 :

$$I_0 = \frac{\pi^2 (a+b)}{\ln [32 a / (b-a) + \exp(\pi^2 / 4)]} \quad \text{Equation 2}$$

Les paramètres a et b sont, respectivement, les rayons internes et externes de l'anneau. Ils peuvent être estimés à partir de l'image de microscopie électronique. La valeur de a est ~ 240 nm. Concernant le rayon externe de l'anneau, la valeur est plus difficile à déterminer car on ne peut distinguer la couche d'or du film de peinture électrophorétique sur cette image. Cependant, l'épaisseur globale de ces 2 couches est ~ 400 nm. Comme mentionné précédemment, l'épaisseur d'une autre peinture électrophorétique a pu être estimée par microscopie électronique à transmission.^[452] La valeur trouvée était de ~ 100 nm. En utilisant cette valeur, on peut estimer que l'épaisseur du film d'or est de ~ 300 nm et que donc le rayon externe de l'anneau d'or est de ~ 500 nm. En considérant ces valeurs, la valeur théorique du courant stationnaire d'un simple anneau d'or ayant ces dimensions serait de 2 nA. Le courant global pour le réseau de 6000 nano-sondes serait alors de 12 μ A. Cette valeur est plus faible que la valeur expérimentale. Cet écart peut provenir, d'une part, de l'incertitude sur les valeurs de a et de b . D'autre part, l'architecture des nano-sondes est assez différente de ce qui est postulé dans le cadre de ce modèle qui considère des plans isolants infinis autour des anneaux. De ce fait, la valeur expérimentale peut être considérée en relativement bon accord avec la valeur théorique.

Sur la figure 6, les points de la courbe d'intensité de photoluminescence retracent l'évolution de certaines images de la figure 5. Ils correspondent aux valeurs de la moyenne de tous les pixels qui sont compris dans une région d'intérêt comme celle de la figure 4B. Le profil montre une chute d'intensité lumineuse simultanément à la chute du courant faradique. Cette évolution est directement liée à l'appauvrissement progressif en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ au voisinage des nano-sondes. La partie transitoire de la courbe peut être comparée à celle du chronoampérogramme. On constate que l'intensité lumineuse atteint une valeur constante plus rapidement que le courant faradique. Cette valeur constante correspond, après quelques secondes, à moins de 5% de la valeur initiale de la photoluminescence. L'origine de cette intensité résiduelle est probablement liée au profil de concentration de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ au voisinage de la nano-ouverture. Cette espèce diffuse vers la surface de l'électrode et se trouve alors dans le volume excité/échantillonné par la nano-ouverture.

3.2.2 Réversibilité de la modulation rédox

La figure 7 montre la réponse photoluminescente acquise à travers le réseau de nano-ouvertures suite à une séquence alternée de sauts de potentiel entre 0 et 1,2 V/Ag. L'espèce non-luminescente $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ est générée à 1,2 V/Ag, mais elle est réduite lorsque le potentiel retourne à 0 V/Ag. On observe que l'intensité diminue bien lorsque l'on génère la forme non-luminescente, puis, lors de la phase suivante, elle augmente de nouveau suite à la réduction de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ et à la diffusion de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ au voisinage de chaque nano-ouverture.

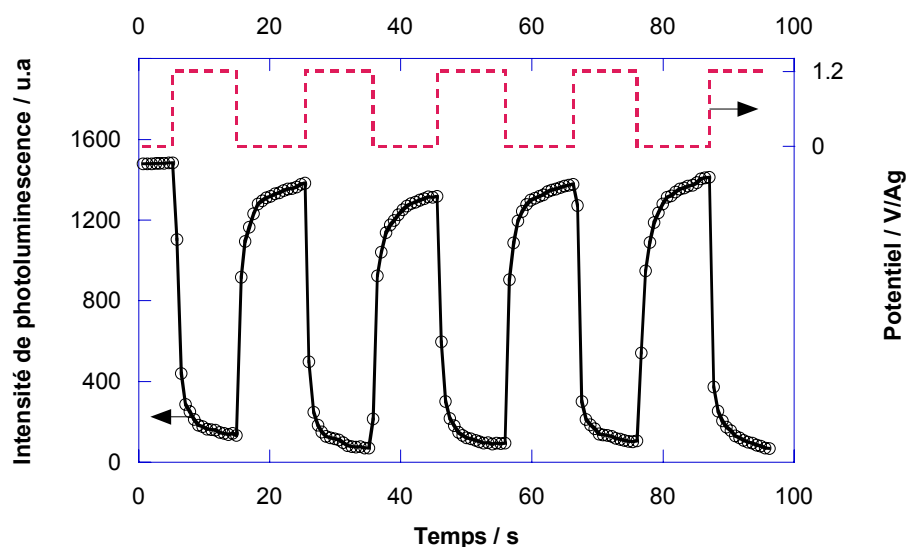


Figure 7 : Evolution de l'intensité de photoluminescence mesurée *via* le faisceau de fibres optiques durant l'application d'une séquence de sauts de potentiel de 0 à 1,2 V/Ag. Le réseau de nano-ouvertures est plongé dans une solution de composition identique à celle de la figure 5.

Cette figure reflète donc la modulation électrochimique des concentrations de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ au voisinage des nano-ouvertures. Cette situation est schématisée sur la figure 8. Comme discuté ci-dessus, la zone d'échantillonnage optique de la photoluminescence est confinée à proximité immédiate de la nano-ouverture. L'intensité dans cette zone est donc très fortement dépendante des couches de diffusion engendrées par l'anneau d'or entourant l'ouverture. Ce phénomène de modulation électrochimique de la photoluminescence est stable sur plusieurs dizaines de cycles de saut de potentiel.

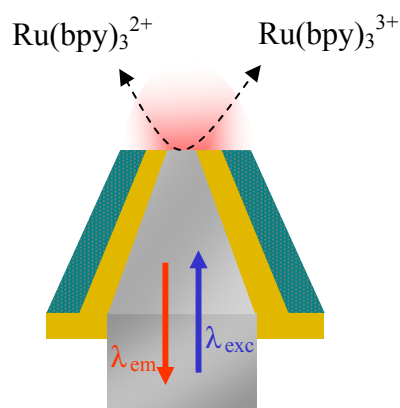


Figure 8 : Représentation schématique de la modulation électrochimique de la photoluminescence au niveau d'une ouverture. La double flèche indique la modulation des concentrations de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ au niveau de l'ultramicroélectrode de forme anneau.

4. Propriétés optiques des nano-ouvertures en champ lointain

A l'échelle nanométrique, les lois de l'optique classique laissent la place à de nouveaux phénomènes qui ne sont abordés qu'en considérant le caractère ondulatoire de la lumière. Les effets liés au champ proche optique et à la diffraction de la lumière par des objets de dimension sub-longueur d'onde induisent des comportements de la lumière tout à fait étonnants. Par exemple, celle-ci peut épouser le contour d'un objet en y adhérant par l'intermédiaire d'ondes évanescentes ou s'incurver au voisinage des bords de l'objet. Ce dernier phénomène se produit par effet de diffraction. La diffraction des ondes électromagnétiques à travers un trou dans un écran conducteur infiniment plan est un sujet d'importance majeure en optique. Des traitements théoriques de ce phénomène ont été publiés dès les années 1940.^[454-456]

La microscopie en champ proche optique est née bien plus tard avec l'avènement des matériaux piézo-électriques et le développement de nano-sources lumineuses stables *via* une ouverture métallique formée à l'extrémité d'une fibre optique.^[285] L'un des paramètres essentiels de cette microscopie est la fréquence au-delà de laquelle les ondes guidées par le cœur optique de la fibre deviennent évanescentes. Cette « fréquence de coupure » dépend principalement du diamètre du cœur. Lorsque qu'un cœur est effilé à l'une de ses extrémités, son diamètre devient de plus en plus petit, si bien que pour une longueur d'onde donnée, certains modes ne peuvent plus se propager librement et deviennent évanescents au niveau

de l'apex de la nanopointe.^[440, 457] Conjugés à l'effet réfléchissant du revêtement métallique formant la nano-ouverture, les modes évanescents créent un champ proche optique confiné à la sortie conique du cœur. Cette lumière émanant de la nano-ouverture interagit fortement avec la matière située dans son champ proche. Les phénomènes d'exaltation locale qui en résultent sont notamment utilisés pour transcrire des propriétés spectrales d'un objet à l'échelle sub-longueur d'onde. Par la nature non-propagative de ce régime, la surface d'excitation est ainsi réduite à une valeur infime.

Les approches théoriques de ce principe utilisent le plus souvent pour modèle une ouverture circulaire parfaite, de rayon a , formée dans un écran conducteur non-infini.^[440, 454] La distribution de l'intensité lumineuse transmise par l'ouverture dépend principalement du paramètre a et du vecteur d'onde k ($k = 2\pi/\lambda$).^[456] Dans le cas limite où le produit $k.a \ll 1$, il est nécessaire de considérer des ondes radiatives (terme propagatif de Bethe)^[454] et des ondes évanescentes (terme non propagatif de Bouwkamp).^[458] La portée des ondes évanescentes chute très rapidement avec la distance, mais la fraction d'énergie lumineuse qu'elles portent augmente fortement lorsque la valeur de a diminue. En contrepartie, l'intensité des ondes propagatives diminue fortement lorsque la valeur de a diminue. Pourtant, seules ces dernières contribuent au signal que l'on enregistre en champ lointain en microscopie à champ proche.^[459] Il est par conséquent primordial d'étudier les propriétés radiatives d'une nano-ouverture dans les deux régimes (champ proche et champ lointain) et de les modéliser afin d'interpréter clairement les images SNOM.^[460] Des modèles numériques simulant la distribution du champ électromagnétique autour d'une nanopointe à ouverture métallique ont donc été proposés pour le champ proche^[440,457,461] et pour le champ lointain.^[459,462-465] Par exemple, la distribution de l'intensité d'une radiation transmise en champ lointain par une nano-ouverture peut être assimilée à une combinaison de 2 dipôles radiatifs (magnétiques et électriques) situés dans le plan de la nano-ouverture et orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre.^[460,462] Une discussion sur les différents modèles théoriques se situe au-delà de mes compétences actuelles dans ce domaine spécialisé de l'optique. Cependant, nous pouvons exploiter les propriétés décrites dans ces travaux. En particulier, la distribution angulaire en champ lointain de l'intensité d'une radiation monochromatique transmise par une nano-ouverture peut être utilisée pour caractériser le rayon de l'ouverture. Ce type d'études a déjà été réalisé pour une ouverture métallique unique, jusqu'à une valeur de rayon d'ouverture de $\lambda/10$.^[459,460,462, 466,467] Aucune étude de ce type n'avait encore été réalisée sur des réseaux de nano-ouvertures.

4.1 Description du montage expérimental

Les propriétés radiatives en champ lointain pour une nano-sonde à ouverture ont été étudiées expérimentalement en lumière polarisée linéairement^[460,462,467,459] et circulairement.^[463,466] Une analyse complète de la distribution angulaire d'intensité de lumière polarisée linéairement a été décrite pour une nanopointe à ouverture.^[462] Un laser fixe illumine la fibre optique et la dépendance angulaire de la lumière émise par une nano-ouverture formée à l'autre extrémité de la fibre est mesurée en déplaçant circulairement un détecteur autour de cette ouverture. Nous avons adapté ce montage afin d'étudier les réseaux de nano-ouvertures que nous avons développés. Notre dispositif se présente en fait sous une configuration « inversée » par rapport au montage décrit ci-dessus.^[462] Compte tenu du théorème général de réciprocité optique de Helmholtz,^[468] les signaux restent identiques même en interchangeant de position le laser et le détecteur. Le sens de la fibre optique par rapport au laser (lumière entrante ou sortante des nano-ouvertures) n'a pas d'incidence sur les résultats. Le montage expérimental utilisé pour obtenir le profil angulaire de distribution de l'intensité en champ lointain d'un réseau de nano-ouvertures est représenté sur la figure 9A. La direction du faisceau d'imagerie est alignée suivant l'axe Z . Le réseau de nano-ouvertures est placé dans le plan XY , au centre d'un cercle défini par la rotation du goniomètre. Un laser He-Ne ($\lambda = 633$ nm) polarisé linéairement est utilisé comme source d'illumination du réseau. Cette lumière polarisée est aussi collimatée par un jeu de lentilles afin d'éclairer uniformément l'ensemble des nano-ouvertures. Le laser ainsi que des filtres neutres, le jeu de lentilles et le polariseur sont montés sur le goniomètre. L'ensemble se déplace dans le plan XZ de façon à faire varier l'angle d'incidence θ de la lumière autour du réseau. L'angle θ est l'angle compris entre la direction de l'onde incidente et l'axe Z . Le laser est positionné face au réseau lorsque $\theta = 0^\circ$. Pour $\theta = \pm 90^\circ$, le laser se trouve dans le plan XY . Les données sont collectées pour des angles variant de 0° à $\pm 80^\circ$.

L'intensité de lumière transmise à travers le réseau est finalement analysée par un second polariseur et mesurée par une caméra CCD. Un autre paramètre est l'angle Φ qui correspond à l'angle entre le plan XZ (où se déplace le laser) et le plan de polarisation du champ électrique de l'onde incidente. Nous avons effectué des mesures goniométriques pour 2 polarisations.

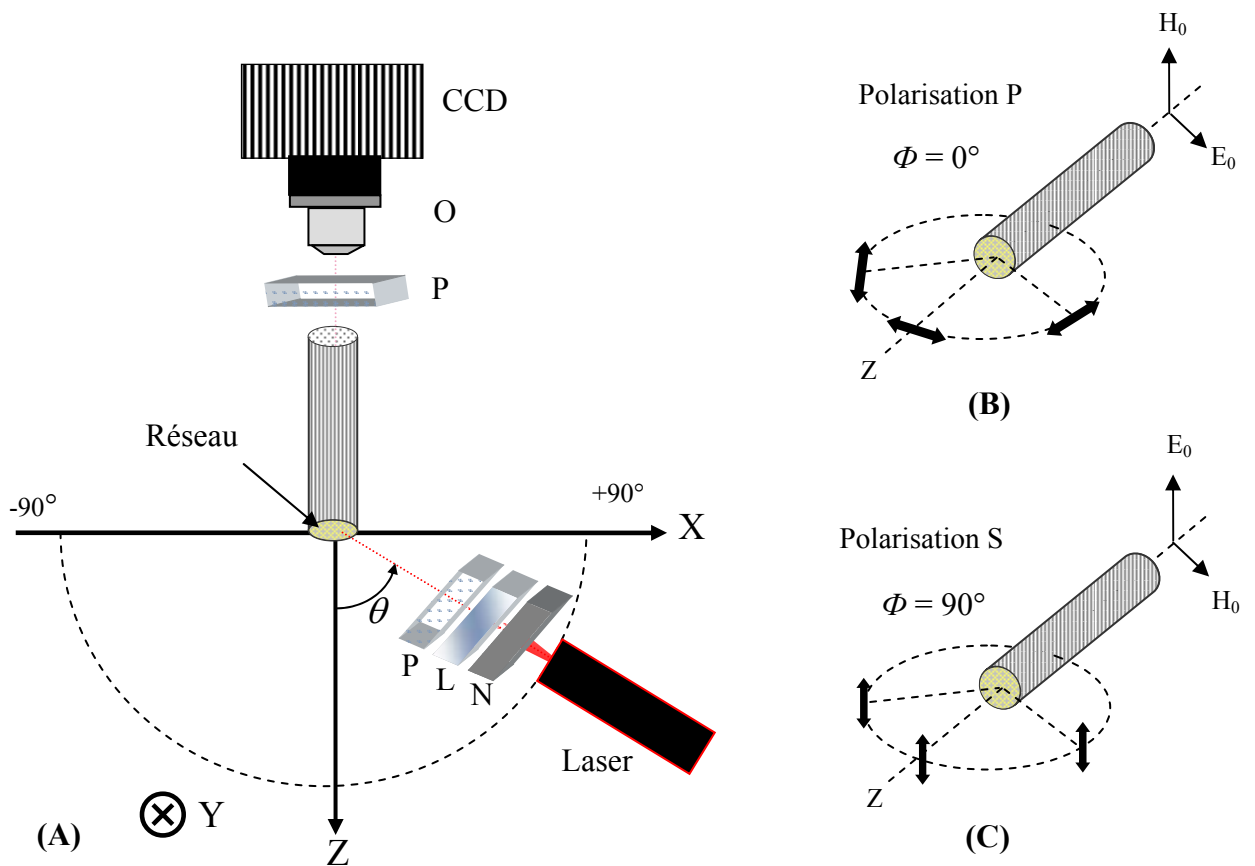


Figure 9 : (A) Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour caractériser en champ lointain les réseaux de nano-ouvertures. L'intensité lumineuse d'un laser He-Ne est ajustée en utilisant un filtre neutre (N). La lumière est ensuite collimatée à l'aide d'une lentille (L) et polarisée (P). La radiation arrivant sur le réseau est transmise jusqu'à l'autre extrémité où un objectif (O) recueille l'intensité qui est mesurée par la caméra CCD. (B-C) Représentations des plans de polarisation P et S du champ électrique E_0 incident par rapport au plan XZ.

Dans le premier cas, la valeur de Φ est nulle (Figure 9B) et la polarisation du champ électrique incident est parallèle au plan XZ (polarisation P). Dans le second cas, la valeur de Φ est de 90° (Figure 9C), et la polarisation est parallèle au plan YZ (polarisation S). Dans ce cas, la polarisation de la lumière est donc perpendiculaire au plan où se déplace le laser. Pour construire un profil angulaire en fonction de l'angle θ , l'intensité moyenne est calculée pour une région d'intérêt représentative de l'image acquise à un angle θ donné. Puis, la mesure est reproduite dans les mêmes conditions d'acquisition mais pour d'autres angles d'incidence. Deux profils sont tracés pour chaque réseau, l'un en polarisation P et l'autre en polarisation S (Φ égal à 0° ou 90°).

4.2 Distribution angulaire de la lumière transmise à travers un réseau

La dépendance angulaire de l'intensité normalisée détectée en champ lointain a été mesurée par le dispositif décrit ci-dessus pour la polarisation P (Figure 10A) et la polarisation S (Figure 10B). Sur ces figures, le profil angulaire d'un faisceau cohérent de fibres optiques simplement poli est également représenté.

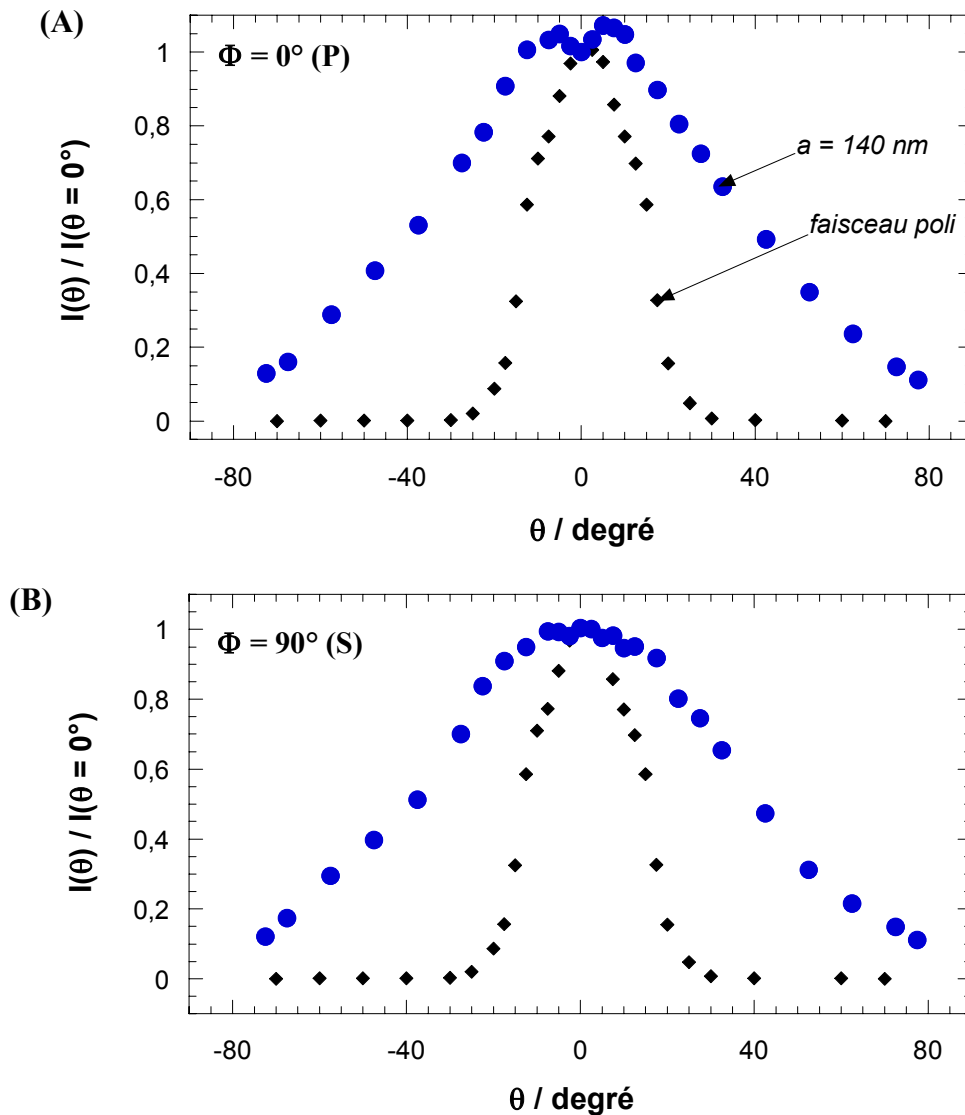


Figure 10 : Profils angulaires de l'intensité normalisée transmise par un faisceau de fibres optiques poli (\blacklozenge) et par un réseau de nano-ouvertures de rayon $a = 140 \text{ nm}$ (\bullet) obtenus (A) en polarisation P et (B) en polarisation S.

D'après la propriété attendue pour ce faisceau de fibres monomodes, le demi-angle définissant le cône d'acceptance est de l'ordre de 20° , estimé par la largeur à mi-hauteur du profil. Cet angle correspond bien à une valeur de l'ouverture numérique identique à celle spécifiée par le fabricant (0,35). Cette distribution est de plus indépendante de la polarisation de la lumière incidente. La caractérisation en champ lointain d'un réseau de nano-ouvertures montre un comportement très différent de celui du faisceau d'imagerie poli. Pour les deux polarisations, les profils normalisés sont nettement plus larges. Cela est caractéristique d'un phénomène de diffraction de la lumière. En effet, l'intensité lumineuse collectée et transmise par les cœurs optiques est distribuée sur le domaine $-80^\circ < \theta < +80^\circ$. Pour des incidences d'illumination supérieures à l'angle d'acceptance théorique des cœurs optiques, une intensité lumineuse conséquente est transmise et détectée. Ainsi chaque nano-ouverture diffracte la lumière incidente. Ce phénomène était attendu du fait de la dimension sub-longueur d'onde des nano-ouvertures.

On observe que l'allure des courbes varie légèrement pour les deux profils mesurés avec des valeurs différentes de Φ entre le polariseur et le plan d'analyse.^[462, 463, 466] En faisant ainsi tourner la polarisation du laser, on peut alors accéder à des informations sur l'anisotropie de l'émission du réseau. Ce phénomène avait déjà été observé avec une nano-ouverture unique.^[462] Il est lié aux conditions aux limites pour les deux plans d'analyse.^[465, 469] Dans le plan P, la contribution du champ électrique est dominante. Par contre, dans le plan S, les conditions aux limites du champ magnétique jouent un rôle essentiel.^[465,469] Par ailleurs, en polarisation P, on peut observer que le maximum de l'intensité transmise ne correspond pas à la position où le laser fait face au réseau. Cette forme particulière en « double pic » qui est visible de part et d'autre de $\theta = 0^\circ$ avait également été obtenue pour une nano-ouverture^[462] mais sans qu'aucune explication théorique ne soit clairement fournie. L'ensemble des données est résumé sur la figure 11 dans une représentation polaire.

Sur la totalité du domaine d'analyse angulaire, ce réseau de nano-ouvertures fournit des profils réguliers et symétriques autour de $\theta = 0^\circ$. Cette allure lisse et symétrique du profil angulaire, obtenue pour les deux polarisations, montre que la distribution de taille des nano-ouvertures au sein d'un même réseau est homogène, variant faiblement autour d'une valeur moyenne.

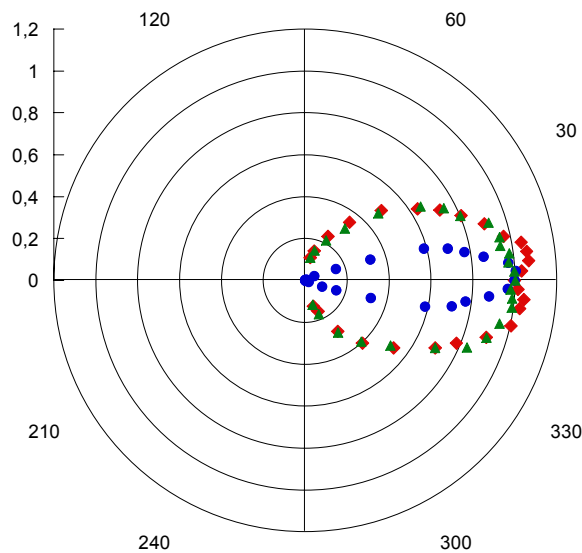


Figure 11 : Profils de la distribution angulaire en champ lointain en coordonnées polaires. Les symboles ●, ◆ et ▲ représentent, respectivement, les mesures effectuées avec un faisceau de fibres optiques poli, un réseau de nano-ouvertures en polarisation P et en polarisation S.

Par ailleurs, la forme de la courbe est très sensible à la qualité du film d'or. Des défauts dans le film d'or et donc, des « fuites » à travers le revêtement d'or des pointes se révéleraient par un profil d'émission irrégulier. La bonne qualité des anneaux d'or avait déjà été confirmée par les images de microscopie électronique (Figure 2D) et de cartographie AFM (Figure 3D). Aucun trou dans le film n'avait été observé. Le confinement de la lumière par le film d'or est démontré par le comportement symétrique de l'émission. Ces différentes caractéristiques en champ lointain du réseau montrent un comportement de diffraction exactement similaire au comportement d'une seule nanopointe à ouverture métallique qui est aujourd'hui utilisée en routine pour la microscopie à champ proche optique. Il est important de remarquer enfin que cette étude est limitée à des valeurs de θ inférieures à 80° . En effet, au-delà de cet angle d'incidence, l'intensité que l'on mesurerait serait faussée par l'ombre projetée par les différentes nano-ouvertures. Cet effet d'ombrage inhérent à notre réseau limite donc l'étude, alors qu'il aurait été intéressant d'explorer les grandes valeurs d'angle d'incidence. En effet, il a été démontré qu'un phénomène de « rétro-transmission » se produisait seulement en polarisation P dans des configurations à nano-ouverture unique lorsque l'angle d'incidence était balayé jusqu'à $\pm 160^\circ$.^[462, 464]

4.3 Analyse des propriétés de diffraction selon la taille des ouvertures

D'après la procédure de fabrication des réseaux ordonnés de nano-ouvertures décrite plus haut, il est possible d'obtenir des ouvertures de diamètre ajustable. Plusieurs de ces réseaux ont été caractérisés du point de vue optique avec le montage en champ lointain précédent. La figure 12 présente l'ensemble des profils angulaires d'intensité transmise, en polarisation P parallèle au plan d'analyse (figure 12A) et en polarisation S perpendiculaire au plan d'analyse (figure 12B), pour des rayons de nano-ouvertures variant de ~ 100 nm à ~ 260 nm. La distribution angulaire de l'intensité transmise par un faisceau d'imagerie sur lequel l'une des faces est structurée en réseau de nanopointes optiques (image 1 de la figure 12) est également représentée. Les images 1-5 de la figure 12 correspondent à des nano-ouvertures provenant de réseaux différents dont on a fait varier les paramètres de fabrication afin d'obtenir des tailles variées. Chacune d'entre elle est bien représentative des nano-ouvertures d'un réseau particulier. Les valeurs des rayons de nano-ouvertures affichées sur cette figure sont estimées à partir des images de microscopie électronique. On peut s'apercevoir de la différence de géométrie des différentes nano-ouvertures. Pour celles de plus grand rayon ($a \sim 260$ nm), les pointes des cœurs optiques dépassent clairement du film d'or (image 2 de la figure 12). Leur fabrication est en effet réalisée avec un temps de dissolution de l'or relativement long. Par contre, les ouvertures plus faibles ($a \sim 100$ nm), sont simplement constituées de trous dans le métal au niveau de l'apex des nanopointes (image 5 de la figure 12). Cette préparation est plus délicate, car elle nécessite plusieurs dépôts de peinture électrophorétique. Cela présente le risque de recouvrir totalement la surface avant l'étape de dissolution de l'or. La reproductibilité diminue très fortement dès que l'on cherche à diminuer la taille des ouvertures d'un réseau. Entre ces deux cas limite, l'optimisation des conditions de préparation permet d'obtenir des réseaux de nano-ouvertures présentant des valeurs intermédiaires du rayon moyen.

Le profil d'intensité relative d'un réseau de nanopointes (c'est-à-dire juste après l'étape de dissolution chimique sélective des cœurs optiques dans la solution d'acide fluorhydrique) est identique dans les deux polarisations. Le maximum d'intensité est observé pour $\theta = 0^\circ$. La largeur à mi-hauteur a pour valeur 16° . Cette valeur est inférieure à celle du faisceau simplement poli. Le profil reste gaussien autour de $\theta = 0^\circ$, mais l'intensité semble approcher une valeur plateau lorsque θ atteint $\pm 20^\circ$.

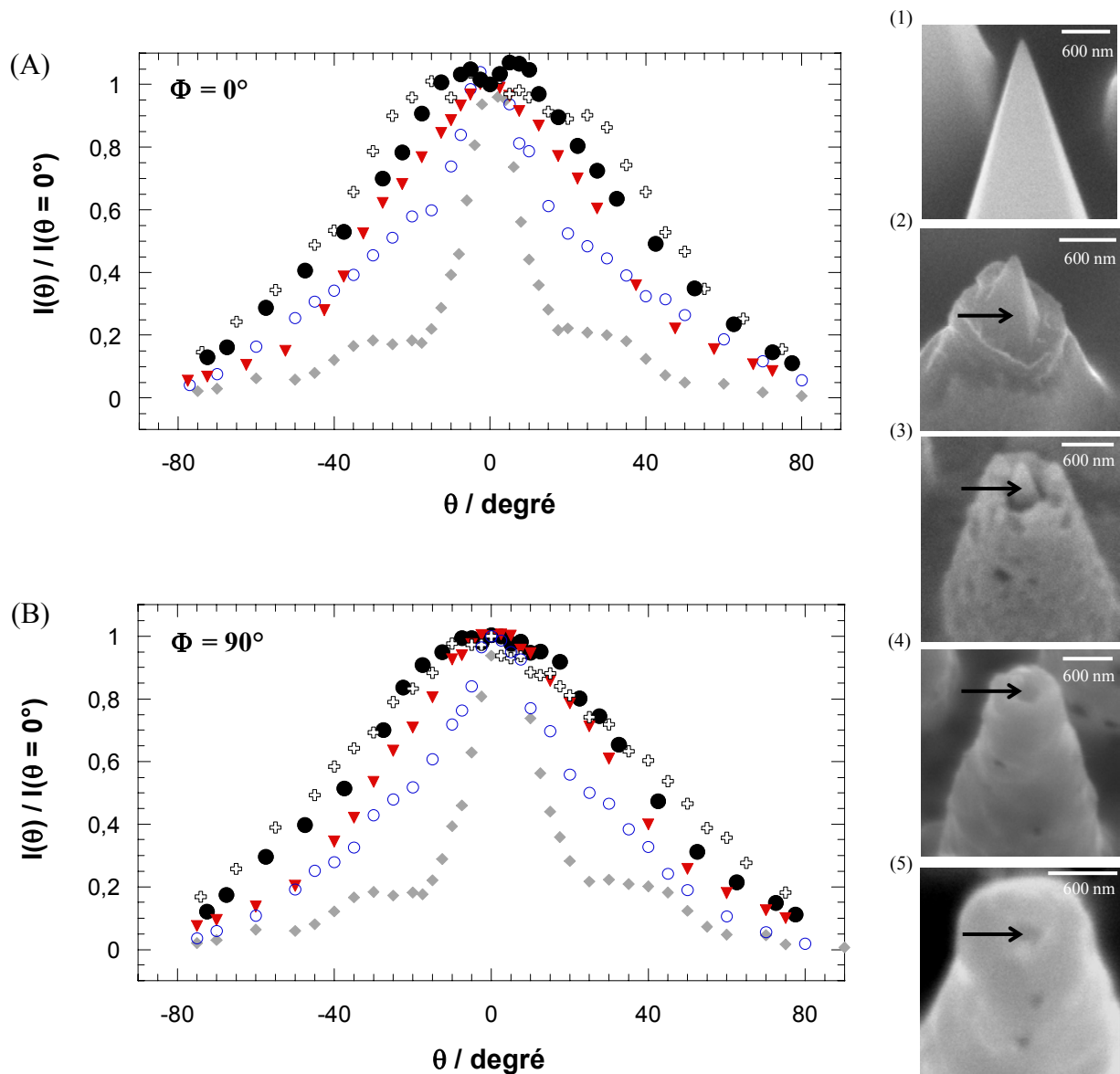


Figure 12 : Profils angulaires de l'intensité normalisée transmise (A) en polarisation P, et (B) en polarisation S, par des réseaux de nano-ouvertures de différents rayons estimés par microscopie électronique. \circ : 260 nm (image 2); \blacktriangledown : 220 nm (image 3); \bullet : 150 nm (image 4); \oplus : 100 nm (image 5). Le profil angulaire d'un ensemble de nanopointes (image 1) est également représenté (\blacklozenge).

Quand l'angle d'incidence est balayé au delà de $\pm 40^\circ$, le signal décroît progressivement jusqu'à ce que la lumière ne soit plus transmise. Cette allure de « pied de pic » indique que la transmission lumineuse s'effectue même au-delà du cône d'acceptance théorique d'un cœur optique poli. Ce phénomène est probablement lié au format du réseau et à la géométrie particulière des nanopointes. On peut remarquer qu'au chapitre précédent, nous avons déjà observé un profil d'acceptance similaire, lorsque ces mêmes nanopointes

sont recouvertes d'un film transparent d'ITO. L'intérêt d'étudier ce type de surface n'est pas seulement de comparer ses propriétés optiques avec celles des réseaux de nano-ouvertures (ci-dessous). En effet, dans des configurations alternatives de la microscopie à champ proche optique qui émergent aujourd'hui, la nano-sonde n'est plus nécessairement une nano-ouverture métallique illuminatrice ou collectrice de lumière, mais elle peut être une nanopointe sans ouverture (« apertureless probe »).^[470-474] La sonde est usuellement une nanopointe en métal^[475-477] ou en verre.^[478-481] Une illumination extérieure focalisée sur l'extrémité de la nanopointe crée une forte exaltation du champ électromagnétique qui reste confiné à l'apex et peut donc être utilisé comme nano-source de lumière. La résolution dépend principalement du rayon de courbure de la nanopointe et de la polarisation de la lumière incidente.^[482] Par contre, contrairement aux sondes avec ouverture qui sont limitées par l'épaisseur de peau du métal utilisé, la limite de résolution peut être plus faible.^[483] Pour le mode collecteur en champ proche, elle assure la détection des champs électromagnétiques localisés sur la surface analysée du fait de la forte diffusion qui se produit à l'apex. En mode réflexion, elle assure à la fois l'illumination de l'échantillon et la collection de la lumière réfléchie. Par conséquent, l'assemblage ordonné de nanopointes de verre (image 1 de la figure 12) peut constituer un outil qu'il sera intéressant de tester en microscopie à champ proche.

Sur la figure 12, on observe le phénomène de diffraction décrit plus haut pour chacun des réseaux analysés. En effet, les caractéristiques déjà mentionnées pour les figures 10 et 11 se présentent à nouveau : régularité et symétrie de part et d'autre de $\theta = 0^\circ$, différence d'allure des profils entre les deux polarisations, double-épaulement aux petits angles des courbes en polarisation P. Ce comportement démontre que les dimensions caractéristiques des différentes nano-ouvertures sont plus petites que la longueur d'onde incidente. Cette constatation est confirmée par le fait que les profils normalisés tendent à s'élargir lorsque la valeur a du rayon des nano-ouvertures diminue. Ce phénomène se rencontre pour les deux polarisations. Pour les grands angles d'incidence ($\theta \sim 60-70^\circ$), le signal décroît lentement vers une valeur minimale qui reste supérieure au niveau du bruit. Ainsi, il semble que la lumière éclairant le réseau peut être transmise par les nano-ouvertures même lorsque l'angle d'incidence est supérieur à 50° , valeur correspondant à la limite d'acceptance des nanopointes de verre (image 1 de la figure 12). Aux grands angles, cette valeur limite est d'autant plus grande que le rayon des ouvertures est petit. Cette caractéristique reflète l'effet de plus en plus marqué de la diffraction lorsque le paramètre a diminue. Pour les nano-

ouvertures dont la géométrie se situe entre la nanopointe de verre et l'ouverture métallique (image 2 de la figure12), les profils semblent également intermédiaires entre les 2 comportements limites. En polarisation S, la courbe est étroite pour les faibles angles d'incidence et se rapproche de celle des nanopointes non recouvertes d'or (image 1 de la figure12). Au fur et à mesure que l'angle d'incidence augmente, le comportement tend vers celui d'une ouverture diffractant la lumière. Cependant, on peut constater que l'effet de la diffraction est relativement faible car le diamètre de l'ouverture est assez proche de la longueur d'onde utilisée. Par contre, pour les nano-ouvertures de dimension plus faible, on observe un comportement clairement lié à l'effet de la diffraction.

Il a été établi que les profils angulaires d'émission en champs lointain d'une nano-ouverture unique pouvaient être utilisés pour en déterminer le rayon a .^[462] La méthode consiste à mesurer les largeurs à mi-hauteur des profils angulaires en polarisation S. Ces valeurs varient en fonction de a suivant une relation empirique.^[462] Cette approche a été démontrée pour des diamètres d'ouverture jusqu'à $\lambda/6$ (cf. Figure 4 de la référence ^[462]). Nous avons donc cherché à valider cette approche comme méthode de détermination du rayon moyen des nano-ouvertures d'un réseau. Le tableau 1 compare les valeurs de a obtenues à partir de la largeur à mi-hauteur avec celles estimées à partir de nombreuses images enregistrées en microscopie électronique à balayage. Les images 1-5 de la figure 12 ne sont qu'un panel représentatif.

Largeur à mi-hauteur	a (nm) champ lointain	a (nm) MEB
50°	250	260
65°	190	220
80°	140	150
98°	95	100

Tableau 1. Comparaison des valeurs des rayons de nano-ouvertures calculées à partir de la largeur à mi-hauteur des courbes en polarisation S et de celles estimées à partir des images de microscopie électronique à balayage (MEB).

L'accord est relativement bon entre ces différentes valeurs. Les faibles différences proviennent probablement de la variabilité du rayon des nano-ouvertures appartenant à un même réseau. Ce phénomène avait déjà été observé avec les images de photoluminescence

acquises à travers un réseau. Ce bon accord entre ces données montre que chaque nano-ouverture d'un réseau se comporte comme une nano-ouverture unique. En d'autres termes, dans le régime champ lointain, les nano-ouvertures sont donc optiquement indépendantes. La distance entre les nano-ouvertures est suffisamment grande pour empêcher d'éventuels effets d'interférences. De ce fait, leur utilisation peut être envisagée comme un réseau de sondes pour la microscopie à champ proche optique.

La distribution d'intensité mesurée en champ lointain en polarisation S semble bien être un moyen efficace pour estimer la taille moyenne des nano-ouvertures d'un réseau. Ce procédé d'analyse présente l'avantage majeur d'être relativement rapide et non destructeur, contrairement à la microscopie électronique.

5. Conclusion

La fabrication et la caractérisation d'un nouveau type de réseaux ont été présentées. La structure de ces réseaux conserve l'arrangement des faisceaux cohérents de 6000 fibres optiques à partir desquels ils ont été façonnés. Les nano-sondes se comportent comme des ultramicroélectrodes d'or de forme d'anneau. Nous avons montré que le recouvrement des couches de diffusion est minimisé. De plus, les réseaux conservent leurs propriétés d'imagerie à la fois à l'échelle nanométrique et micrométrique. En effet, chaque nano-ouverture peut sonder une zone dont l'extension correspond à la dimension caractéristique du champ proche optique (c'est-à-dire inférieure à la centaine de nanomètres). Des images de photoluminescence ont pu être acquises à distance, à travers les nano-ouvertures et transmises *via* le faisceau d'imagerie à une caméra CCD. Ce type d'image permet de fournir la distribution statistique des nano-sondes effectivement actives optiquement. Ensuite, la modulation électrochimique de la photoluminescence d'un luminophore rédox modèle a été réalisée à l'échelle nanométrique. En effet, chaque nano-sonde sonde optiquement son voisinage immédiat alors que l'anneau d'or module électrochimiquement la composition de ce volume. La modulation réversible de la photoluminescence est visualisée à distance à travers le réseau même. De plus, le format en réseau de cet objet permet d'obtenir une image résolue à l'échelle nanométrique mais qui couvre une large zone micrométrique. Cette approche réussit à relier ces deux échelles d'analyse qui sont extrêmement importantes. Le concept de cette expérience peut être à l'avenir employé comme un outil d'imagerie rapide

pour l'acquisition de données en parallèle sur des systèmes offrant la combinaison d'une réaction rédox et d'un signal de fluorescence (détection de biomolécules comme les acides aminés ^[164] ou les acides nucléiques,^[270] l'étude de l'immobilisation de réactif rédox dans un film,^[187] etc.).

Les perspectives en imagerie chimique de ces réseaux sont orientées vers la microscopie à champ proche optique. Cette méthode est à présent une méthode d'analyse bien établie en nanotechnologies, en physique des surfaces et des matériaux ou encore en biologie. L'acquisition en parallèle de milliers de signaux spatialement résolue d'un même échantillon améliore grandement le temps de mesure global. De ce fait, le temps de mesure en un point peut par conséquent être considérablement accru. Cela peut également ouvrir des perspectives pour l'étude de phénomènes dynamiques se produisant à ces 2 échelles. Des systèmes intégrant des sondes multiples AFM ou optiques ont par exemple été développés pour l'imagerie ou la nanolithographie en parallèle.^[289, 484-487] A terme, des applications pour l'imagerie parallèle en champ proche optique d'échantillons vivants comme les cellules biologiques sont prometteuses. Ce type d'échantillon semble particulièrement bien adapté étant donné la taille caractéristique des cellules et celles des composants intracellulaires. Une autre possibilité serait de combiner imagerie en champ proche et électrochimie dans des nano-environnements. C'est-à-dire d'observer optiquement l'échantillon suite à une stimulation électrochimique.

De tels réseaux peuvent également être appliqués en photonique, dans des dispositifs électro-optiques, ou bien encore dans la fabrication de nanostructures par photolithographie en utilisant le champ proche.^[290, 488] Une autre piste intéressante pour la biodétection parallèle peut être l'exploitation des phénomènes de résonance de plasmons de surface (SPR), en utilisant comme support de détection des réseaux de nanopointes sans ouverture qui seraient recouverts d'une très fine couche d'or. Ce type de microcapteur SPR a récemment été évoqué avec une nanopointe unique formée à l'extrémité d'une fibre optique.^[489, 490] Cette technique est notamment très bien adaptée à la détection de biopolymères comme l'ADN ou les protéines.

Conclusion générale

La notion d'imagerie de micro- ou de nano-environnements est un dénominateur commun aux 3 types de travaux présentés dans ce mémoire. Ce projet global s'est articulé, d'une part, autour de la présentation d'une technique de cartographie dynamique d'une couche de diffusion plane et, d'autre part, autour du développement de microréseaux de capteurs de nature différente et de leurs applications en imagerie chimique. L'un des signes forts de la cohérence qui existe entre les 3 voies d'activités développées dans ce mémoire est qu'elles mobilisent toutes, de façon plus ou moins similaire, un nombre important d'outils et de concepts provenant de branches différentes de la physico-chimie, comme l'électrochimie, les ultramicroélectrodes, l'électrochimiluminescence, les fibres optiques, l'imagerie, le champ proche optique et la spectroscopie.

La première partie montre l'imagerie à distance d'une couche de diffusion plane obtenue à travers un faisceau cohérent de fibres optiques. La résolution spatiale de cette méthode spectroélectrochimique repose sur les propriétés optiques du faisceau d'imagerie (ouverture numérique, diamètre des fibres optiques individuelles, etc.) ainsi que sur les propriétés physico-chimiques de la solution contenant $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (absorbance, indice de réfraction, etc.). Nous avons pu moduler certains de ces paramètres pour obtenir des conditions de résolution spatiale adéquates vis-à-vis de l'échantillonnage photoluminescent. En d'autres termes, du fait du confinement du volume sondé, chaque fibre optique du faisceau échantillonne optiquement un volume particulier et indépendant au sein de la couche de diffusion. La résolution temporelle de la méthode n'est limitée que par le système d'acquisition digitale des images de photoluminescence. Nous avons pu améliorer la dynamique d'acquisition des images et atteindre un temps de 50 ms. Avec la continue évolution des détecteurs CCD, cette limite devrait être grandement diminuée assez rapidement. Les profils de concentration sont en bon accord avec les profils théoriques. La méthode est limitée à la première seconde d'électrolyse, du fait du phénomène de convection dans la solution. Par ailleurs, nous avons pu montrer qu'un effet de filtre interne primaire est probablement responsable de la distorsion des profils de concentration observée près de la surface de l'électrode. Une perspective intéressante serait d'utiliser la microscopie à champ proche optique pour réaliser l'imagerie des profils de concentration au niveau d'une nanoélectrode ou d'un nanopore.

Dans la seconde partie, la surface d'un faisceau de fibres optiques a été utilisée comme support pour la fabrication d'un réseau de capteurs opto-électrochimiques. L'architecture de cette surface tridimensionnelle a été caractérisée en utilisant la microscopie Auger et la microscopie AFM à pointe conductrice. Les informations recueillies par ces techniques ont clairement permis de valider la procédure de fabrication d'un tel réseau. Par ailleurs, la caractérisation électrochimique du réseau a permis de prouver que chacune des ultramicroélectrodes est diffusionnellement indépendante. De plus, ce nouvel outil possède les mêmes propriétés d'imagerie que le faisceau optique initial, les capteurs étant transparents et chacun optiquement connecté à une fibre optique individuelle. Les performances de cet outil ont été démontrées pour l'imagerie électrochimiluminescente à distance avec 2 systèmes modèles, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ et luminol/ H_2O_2 . Le réseau permet ainsi de détecter, de façon quantitative et sur plusieurs ordres de grandeur, la concentration de ces analytes d'intérêt biologique. L'étude des paramètres géométriques et physico-chimiques a montré que les capteurs sont optiquement indépendants. L'électrochimiluminescence est une méthode analytique robuste qui suscite un intérêt grandissant, comme en témoignent les diverses applications commerciales. Une voie future serait de fabriquer des réseaux de nanobocapteurs. Ils pourraient être doués d'une résolution spatiale à l'échelle nanométrique et micrométrique, donc adaptés notamment à l'imagerie d'échantillons biologiques (tissus cellulaire, réseau de neurones, etc.).

Enfin, la troisième partie décrit une approche de conception similaire à la précédente mais basée sur un principe d'imagerie très différent. Il s'agit de développer des réseaux de nanosondes pour le champ proche optique. Deux types de nano-sondes ont été développés : des nano-sondes sans ouverture et des nano-ouvertures entourées par un anneau d'or conducteur. L'or permet non seulement de confiner la lumière à l'extrémité de l'ouverture, mais également de réaliser des réactions électrochimiques locales. La géométrie des nano-ouvertures a été caractérisée par microscopie AFM à pointe conductrice, mettant clairement en évidence les zones conductrices de la surface. Par ailleurs, la manipulation réversible de l'imagerie photoluminescente a été démontrée avec le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Ce type de réseau est susceptible de représenter une avancée significative en microscopie à champ proche optique. L'intérêt d'un réseau comprenant des milliers de nanosondes réside dans l'accroissement de la quantité d'informations provenant du champ proche optique d'un échantillon. La résolution sub-longueur d'onde de cette technique pourrait également s'avérer très intéressante pour caractériser des processus électrochimiques à l'échelle

nanométrique. Dans cet ordre d'idées, une possibilité intéressante serait de combiner la microscopie à champ proche optique avec la microscopie électrochimique à balayage en utilisant le format réseau. D'une manière générale, les atouts et les perspectives dans ces 3 domaines d'activités ont été présentés à la fin de chacun des chapitres correspondants. Sans rentrer de nouveau dans les détails, une large diversité d'applications fécondes s'ouvre désormais à la suite de ces travaux, conséquence de la très grande richesse de notions qui sont intervenues dans ce travail.

SECTION EXPERIMENTALE

I - Imagerie épifluorescente d'une couche de diffusion plane

Le montage et son principe sont décrits sur la figure 1 du chapitre 1. Une cellule à trois électrodes est d'abord fabriquée dans une configuration particulière. L'électrode de travail est en carbone vitreux de 3 mm de diamètre (Bioanalytical Systems, BAS). Elle est choisie de dimension suffisamment large afin de pouvoir mesurer la couche de diffusion plane, en plaçant la fibre d'imagerie au centre de l'électrode, sans induire d'interférences avec des effets de bords.¹³² La contre-électrode et l'électrode de quasi-référence sont respectivement un barreau de graphite de 10 mm de diamètre et un fil d'argent de 2 mm de diamètre. Les trois électrodes sont fixées parallèlement dans un moule cylindrique de résine époxy (résine réticulée à froid Plexcil C6 et A6, Escil). La surface du moule est polie sur des films métallographiques de granulométrie décroissante (30µm, 15 µm, 3 µm et 0,3 µm, Thorlabs Inc.) et, finalement, sur une feuille de feutre imbibée avec une suspension de poudre d'alumine de taille de grain 0,05 µm (Micropolish II, Buehler). Les trois électrodes sont ensuite connectées à un potentiostat PGSTAT 12 Autolab (EcoChemie).

Les solutions sont préparées en utilisant le tris(2,2'-bipyridine)ruthénium(II) (Aldrich) et du sodium sulfate anhydre (Prolabo) comme électrolyte support (concentration 1M), dilués dans de l'eau ultra-pure (Milli-Q Plus 185, Millipore). Des solutions de différentes concentrations en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (1 mM, 5 mM et 30 mM) sont utilisées. Un volume de solution est déposé à la surface du moule de résine contenant les trois électrodes.

Les fibres d'imagerie d'environ 50 cm de longueur contiennent 6000 cœurs optiques de 3-4 µm de diamètre. Les deux faces de chaque faisceau sont polies sur des films de polissage à granulométrie décroissante (30µm, 15 µm, 3 µm et 0,3 µm; Thorlabs Inc.). Les fibres d'imagerie d'ouverture numérique 0,35 et 1,0 sont commerciales. Les premières sont fabriquées par Sumitomo Electric Industries, présentent un arrangement quasi-hexagonal sur un diamètre global d'environ 350 µm. Les secondes sont fabriquées par Collimated Holes Inc., et présentent un arrangement hexagonal parfait. Les fibres d'imagerie d'ouverture numérique 0,22 ont été spécialement fabriquées par Lot-Oriel. Leurs structures sont similaires à celles produit par Sumitomo. Pour ces deux dernières, l'aire effective de transmission est de 270 µm de diamètre (Figure 1). Une première enveloppe de gaine optique de 40 µm entoure les 6000 cœurs, une seconde enveloppe protectrice de silicone

d'environ 40 μm d'épaisseur englobe les deux matériaux et assure une protection mécanique. Pour pouvoir positionner l'extrémité d'un faisceau d'imagerie directement au contact de la surface de l'électrode de carbone vitreux, ces deux enveloppes doivent être au préalable éliminées.

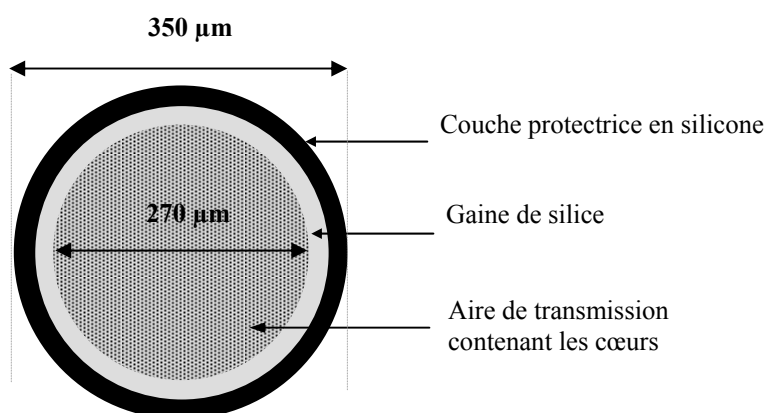


Figure 1 : Schéma représentant la face d'un faisceau cohérent de fibres optiques de Sumitomo d'aire de transmission 270 μm

La couche de silicone est dissoute en plongeant l'extrémité du faisceau dans l'acétone, puis en la soumettant à un bain d'ultrasons pour enlever les résidus (Bioblock Scientific). La gaine de silice est ensuite dissoute en plongeant l'extrémité du faisceau dans une solution à base d'acide fluorhydrique (HF, 99,99 %, Aldrich) et de fluorure d'ammonium (NH_4F , 99,99 %, Aldrich). Des solutions diluées de chaque composé sont d'abord préparées séparément : HF à 48 % massique et NH_4F 40 % massique dans l'eau déminéralisée (ATTENTION : ces solutions sont extrêmement corrosives). La solution de corrosion de la silice est composée de 500 μL de la solution diluée de NH_4F , 100 μL de la solution diluée de HF et 100 μL d'eau (mélange 5 : 1 : 1). La face dénudée de silicone du faisceau de fibres optiques est placée verticalement dans cette solution pendant environ 2h30. Ce temps est nécessaire pour dissoudre la gaine jusqu'au niveau de l'aire de transmission (observation sous un microscope en réflexion). Cette face du faisceau est finalement polie de nouveau sur les films de polissage, et nettoyée sous ultrasons.

1.1 Positionnement et procédure d'imagerie

La face distale de la fibre d'imagerie de diamètre complet 270 μm est positionnée très précisément au centre du disque de carbone vitreux, de façon normale à la surface et directement à son contact. On utilise pour cela un sub-micromanipulateur à trois axes

(MDT616, Thorlabs) et un goniomètre (Melles Griot). Cette étape cruciale est contrôlée avec un stéréomicroscope (Stemi 2000, Zeiss). La fibre d'imagerie et la surface du moule des trois électrodes sont ensuite recouvertes par la solution contenant $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Les images de photoluminescence sont acquises en fonction du temps lorsque le potentiel de l'électrode de travail est porté de 0 à 1,2 V/Ag. Du fait qu'un objet positionné à la surface d'une électrode peut interférer avec les profils de concentration si sa symétrie n'est pas compatible avec le processus étudié, un système de diffusion plane modèle est choisi pour minimiser les effets liés à l'intrusion de la fibre d'imagerie dans la couche de diffusion. En effet, en positionnant le faisceau d'imagerie le long d'un plan orthogonal au disque de l'électrode, la symétrie du phénomène est respectée.

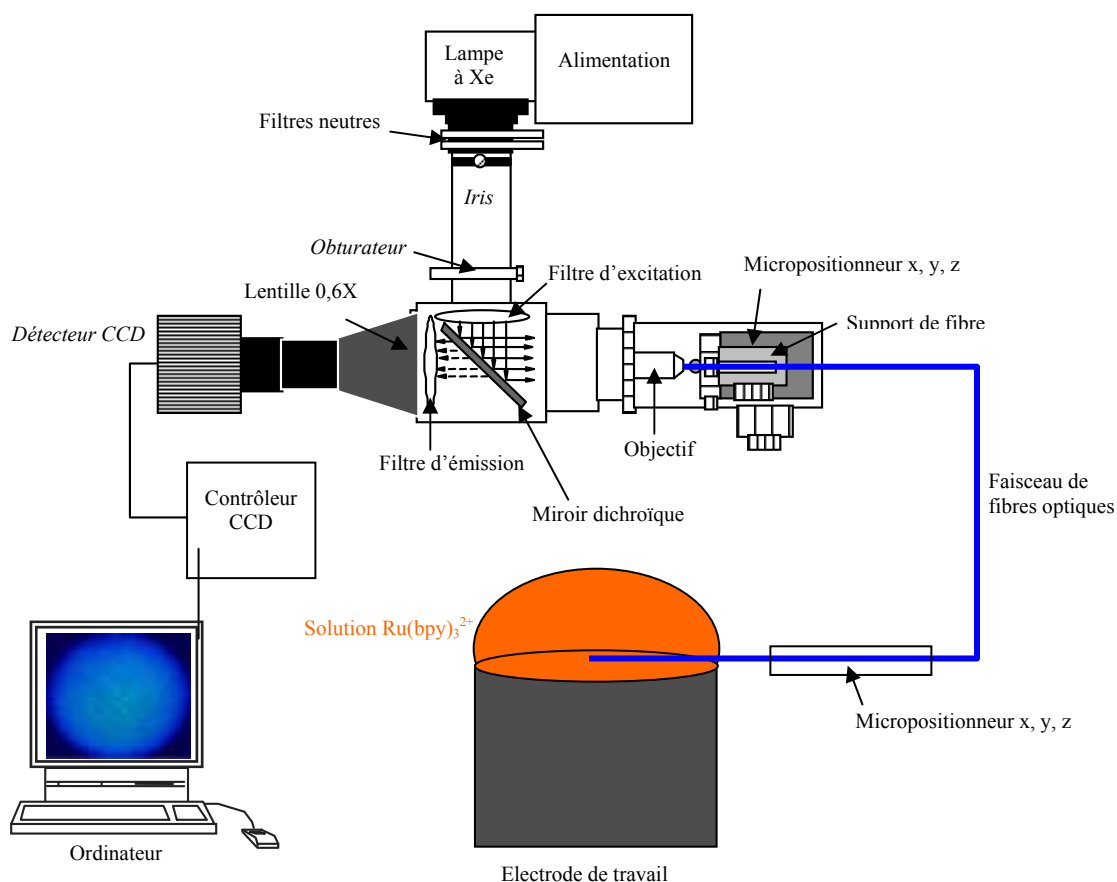


Figure 2 : Schéma représentant le dispositif complet d'imagerie épifluorescente avec un faisceau cohérent de fibres optiques

La face proximale polie du faisceau est positionnée, grâce à un support, devant l'objectif d'un microscope d'épifluorescence modifié (BX-30, Olympus).^[163] Il est schématisé sur la figure 1 du chapitre 1 et une description détaillée peut être trouvée avec la figure 5 du chapitre 3. La lumière émane d'une lampe à arc Xénon de 75 W (EBX 75, LEJ).

Cette lumière blanche, dont l'intensité est ajustée par des filtres neutres, est dirigée selon un parcours optimisé pour permettre l'illumination homogène de la partie appropriée du faisceau. Dans cette zone appelée « région d'intérêt », on va visualiser le phénomène de diffusion plane. La lumière passe à travers un filtre d'excitation (Omega Optical) sélectionnant les longueurs d'ondes autour de 485 ± 11 nm correspond à la photoexcitation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Les longueurs d'onde sélectionnées sont réfléchies à 90° sur un miroir dichroïque (540 nm) et focalisé sur la face proximale du faisceau d'imagerie par un objectif de microscope 20X (Olympus). La lumière d'excitation est alors transmise à travers le faisceau de fibres optiques et induit l'émission de photoluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ à 605 nm. L'intensité de lumière collectée et transmise par chaque cœur optique est proportionnelle à la concentration locale de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. La lumière recaptée traverse le faisceau et le miroir dichroïque. Le signal est filtré à travers un filtre d'émission (605 ± 25 nm), pour assurer que seule la photoluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ soit observée.

Les images de photoluminescence sont enregistrées par une caméra CCD (Roper Scientific) contenant un chip Marconi 47-10 (1024x1024 pixels). La vitesse de lecture maximale des pixels est de 1 MHz en codage 16-bit, soit un temps de lecture pour le capteur complet d'environ 1 s. Le temps de lecture est le délai entre deux images consécutives. Le capteur de cette caméra est refroidi thermoélectriquement (effet Peltier) à -40°C . L'acquisition d'image est assurée par un obturateur mécanique. Le temps d'exposition choisi pour cette expérience est de 10 ms, valeur minimale de notre obturateur mécanique. Afin d'augmenter la dynamique de la caméra pour obtenir la meilleure résolution temporelle possible, une région d'intérêt est sélectionnée à partir de l'image complète de la fibre d'imagerie. La lecture est plus rapide si seule la région d'intérêt est traitée. Avec la région d'intérêt choisie dans cette expérience (voir figure 2 du chapitre 1), le temps de lecture est réduit à environ 200 ms. Un second procédé employé pour accélérer le temps de lecture est le « binning ». Ce procédé consiste à considérer à assembler plusieurs pixels entre eux pour qu'ils soient lus collectivement. Pour ne pas perdre significativement la résolution spatiale, un binning faible (2x2) est utilisé. Cela conduit à un temps de lecture de 60 ms. Enfin, pour obtenir des profils de photoluminescence à partir des séquences d'images obtenues *via* le faisceau d'imagerie, l'intensité des pixels dans la région d'intérêt est moyennée point par point (WinView, Roper Scientific).

1.2 Evaluations expérimentales des paramètres physico-chimiques

❖ Coefficient de diffusion

Pour le calcul des profils de concentration théorique, nous avons besoin de connaître la valeur du coefficient de diffusion D de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Cette valeur a été déterminée par deux méthodes différentes. Dans un premier temps, en utilisant une macroélectrode de carbone vitreux de diamètre 1,5 mm, la valeur de D est obtenue à partir de la relation de Randles-Sevcik ($i_{\text{pic}} = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C \cdot v^{1/2}$, où n est le nombre d'électron, A l'aire de l'électrode, C la concentration et v la vitesse de balayage).^[165] Nous avons tracé la courbe de l'intensité du pic d'oxydation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage dans une solution contenant 10 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et 1M de KNO_3 . La valeur de D est alors $5,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

La seconde méthode de mesure emploie une ultramicroélectrode. Elle a été fabriquée à partir d'une fibre d'or de 15 μm de diamètre. La valeur de D peut être estimée à partir de l'expression du courant stationnaire de l'ultramicroélectrode disque ($i_{\text{lim}} = 4nFD C^\circ a$).^[4,192] Un voltammogramme cyclique à la vitesse de balayage de 10 mV/s est réalisé dans une solution contenant 5 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (Figure 3). Le courant de palier permet d'estimer la valeur du coefficient de diffusion : $D = 5,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Les valeurs que nous avons pu obtenir par ces deux méthodes sont en très bon accord avec la valeur que l'on trouve dans la littérature.^[265]

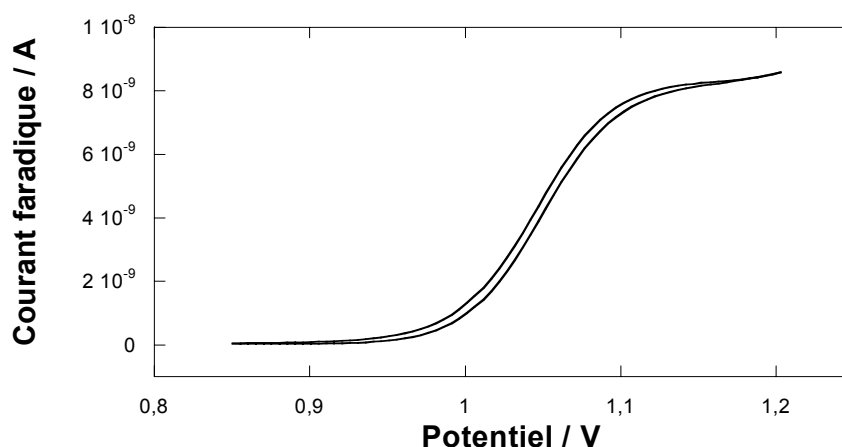


Figure 3 : Voltammogramme stationnaire obtenue avec une ultramicroélectrode d'or de diamètre 15 μm . La solution contient 5 mM de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et 1M de Na_2SO_4 . La vitesse de balayage est de 10 mV/s.

❖ Coefficients d'extinction molaires

Pour évaluer l'importance relative des effets de filtres internes primaires et secondaires, nous avons besoin de connaître des valeurs du coefficient d'extinction molaire ϵ de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Les solutions de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ sont préparées par électrolyse totale de solutions contenant du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dans l'acide sulfurique 1M (H_2SO_4 1M, Prolabo), sous dégazage par azote et en refroidissant la cellule électrochimique dans de l'eau glacée.⁴⁹¹ Les électrolyses sont réalisées avec un montage à trois électrodes : un tube de platine est porté au potentiel de 1,2 V par rapport à une électrode de référence au calomel, la contre-électrode est un barreau de graphite isolée de la solution par un fritté.

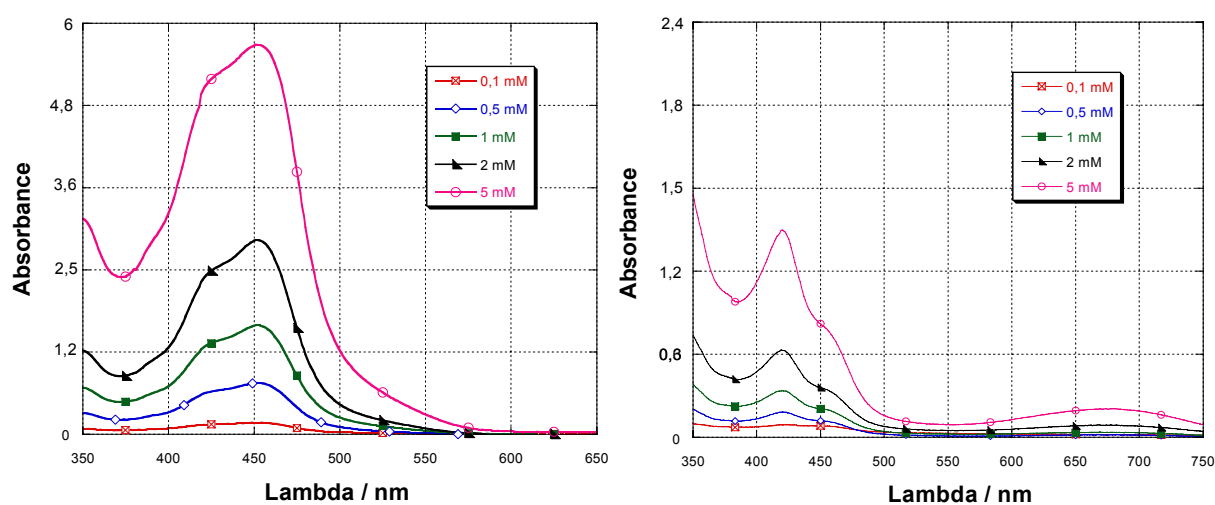


Figure 4 : (A) Spectres d'absorption enregistrés pour les différentes solutions contenant $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ou (B) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$.

Les spectres d'absorption sont réalisés avec un spectromètre Perkin-Elmer Lambda-2, pour des solutions aqueuses diluées des deux composés (concentrations de 0,1 mM à 5 mM) (Figure 4). Le domaine de longueur d'onde balayé est 360/700 nm. Les valeurs du coefficient d'extinction molaire aux longueurs d'onde d'excitation (485 nm) et d'émission (605 nm) sont estimées en considérant la loi de Beer-Lambert ($\text{Abs} = \epsilon l C$; où l est l'épaisseur de la cellule de quartz (0,1 cm) et C la concentration). En traçant les courbes $\text{Abs}_{(\lambda)} = f(C)$, les valeurs de $\epsilon_{(\lambda = 485 \text{ nm})}$ obtenues sont $4200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et $600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Pour la longueur d'onde d'émission, le coefficient $\epsilon_{(\lambda = 605 \text{ nm})}$ est négligeable pour $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et de $200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Ces valeurs sont en accord avec les données de la littérature.^[162]

II - Développement d'un réseau de capteurs submicrométriques

2.1 Fabrication du réseau de capteurs

Les différentes étapes de fabrication de ces structures ont été présentées en détails au chapitre 2. Un faisceau d'imagerie comprenant 6000 cœurs optiques de 3-4 μm de diamètre est utilisé comme support (IGN-035/06, Sumitomo Electric Industries). L'aire de transmission et l'ouverture numérique de ce faisceau cohérent de fibres optiques sont, respectivement, 270 μm et 0,35. Les deux faces sont polies sur des films de polissage de granulométrie décroissante (30 μm , 15 μm , 3 μm et 0,3 μm ; Thorlabs Inc.). L'une des extrémités polies est dénudée de la couche de silicone protectrice avec de l'acétone. Ensuite, la dissolution chimique sélective des cœurs optiques est réalisée en la plongeant dans une solution contenant 500 μL de solution de NH_4F diluée à 40% (massique), 100 μL de solution de HF diluée à 48% (massique) et 100 μL d'eau déminéralisée. (ATTENTION : cette solution est extrêmement corrosive). Cette composition est adaptée de plusieurs méthodes de dissolution décrites dans la littérature.^[287-289, 291] La durée de dissolution est de 2h30. C'est la durée minimale nécessaire pour enlever entièrement la gaine optique de 40 μm d'épaisseur autour de l'aire de transmission. Toutefois elle est suffisante pour obtenir des nanopointes à la surface. Un temps de dissolution plus long provoque l'attaque des contours de l'aire de transmission, c'est-à-dire que les cœurs optiques à la périphérie sont également détériorés. A la différence de l'expérience du chapitre 1, la surface où sont formées les nanopointes n'est pas repolie.

Le dépôt d'une couche transparente d'ITO est réalisé par une méthode de pulvérisation cathodique radio-fréquence (Alcatel SCM 451). La cible pulvérisée est un disque de 10 cm de diamètre de poudre compacte composée de 90 % d'oxyde d'indium (In_2O_3) et 10 % d'oxyde d'étain (SnO_2), d'une pureté de 99,99 % (Cerac). L'extrémité du faisceau de fibre est placée à 5 cm de la cible. Avant le dépôt, la pression de la chambre est réduite à l'ultra-vide (2.10^{-6} mbar) grâce à une pompe à diffusion. Le dépôt est réalisé en présence d'oxygène, introduit dans la chambre à une pression partielle de 10^{-5} mbar. De l'argon est ensuite incorporé dans cette atmosphère, pour obtenir une pression totale de 10^{-2} mbar et un taux d'oxygène de 1%. Une puissance radio-fréquence de 120 W est appliquée à la cible. Avant de faire le dépôt, cette dernière est pré-nettoyée des différents contaminants de surface pendant 30 minutes. Puis, le réseau de nanopointes optiques est exposé au plasma

pendant 30 minutes. Ces conditions sont adaptées des résultats d'un article qui évalue l'influence des conditions de dépôt sur les propriétés électrochimiques de films d'ITO.^[307] Par cette méthode, le film d'ITO recouvre non seulement la surface mais également les contours du faisceau. Ainsi, après le dépôt, le réseau de nanopointes ITO est connecté électriquement à un fil de cuivre (Kynar Insulated 30 awg, RS) collé sur le contour conducteur du faisceau par une laque d'argent (SPI, West Chester, PA). Enfin, afin d'isoler électriquement la connexion et le contour, on enrobe mécaniquement l'ensemble avec une couche de peinture isolante (Monoliss'Satin Blanc 01, ICI Dulux Valentine) finement déposée jusqu'au bord du réseau. Elle sèche pendant 48h.

Après ces étapes, la surface du réseau de nanopointes ITO est la seule surface conductrice apparente de l'outil. Nous avons développé une procédure de dépôt de peinture électrophorétique à partir de procédés décrits dans la littérature.^[278, 310, 452, 492] Ce procédé a été le fruit de multiples essais permettant d'ajuster les paramètres pour obtenir la reproductibilité la plus fiable possible au cours de cette étape déterminante de la fabrication. La peinture que l'on utilise est une suspension colloïdale commerciale (FT83-0250, BASF). Cette solution est diluée dans un rapport volumique 1 :1 avec une solution aqueuse d'acide acétique 3 mM (Prolabo). Une seconde dilution avec de l'eau déminéralisée est effectuée dans des proportions volumiques variables suivant le but recherché. Pour les réseaux de nanopointes ITO, nous avons utilisé une dilution par 100 de la solution de peinture/acide acétique. Le dépôt est réalisé en voltamétrie linéaire avec une configuration à 2 électrodes. Le réseau (« électrode de travail ») est plongé dans la peinture. Un fil de platine qui trempe sur 1 cm dans la solution constitue la contre-électrode. Un petit barreau magnétique est placé dans la cellule pour agiter doucement la solution pendant 10 minutes, avant de démarrer le dépôt. Cette étape de « pré-mouillage » du réseau semble indispensable pour assurer un dépôt homogène de peinture qui adhère bien à la topographie de l'ensemble de la surface. Comme il est précisé dans le texte du chapitre 2, le dépôt isolant est provoqué par précipitation de la peinture lorsque le pH augmente localement à la surface du réseau. Deux méthodes ont été testées pour porter le réseau à un potentiel cathodique : les sauts de potentiel (chronoampérométrie à échelon de potentiel), et le balayage en voltampérométrie linéaire. Cette seconde méthode est plus « douce » et plus reproductible. Elle évite notamment les inhomogénéités ou la précipitation d'amas de peinture. Le potentiel est balayé une seule fois de 0V à -3V à la vitesse de 10 mV/s. Après déconnexion, le réseau est rincé dans l'eau pendant quelques secondes, et portée tout de suite à la température de

180°C dans une étuve pendant 1h. La peinture se rétracte au niveau de l'apex des nanopointes ITO sous l'effet de la chaleur. Ainsi, on obtient un film isolant très fin et très robuste déposé sur l'ensemble du réseau à l'exception de l'extrémité de chaque nanopointe.

2.2 Instrumentation pour la caractérisation du réseau

Les surfaces de réseaux de nanopointes ITO sont caractérisées par microscopie électronique à balayage (JEOL), ainsi que par une microsonde Auger avec canon à émission de champ (VG Microlab 310F). Pour ces deux analyses, les faisceaux sont fixés sur les plots au niveau de leur face distale par papier double-face conducteur. L'analyse par microscopie AFM à pointe conductrice est réalisée avec un microscope AFM commercial conventionnel (NanoScope), couplé à un module d'acquisition et de traitement du courant (« résiscope ») spécialement fabriqué par une équipe de recherche du Laboratoire de Génie Electrique de Paris.^[316] Les échantillons sont préparés en enrobant les faisceaux de fibres optiques dans des cylindres de résine époxy (Plexcil C6 et A6, Escil), sans bien sûr recouvrir la face distale. Après séchage, les cylindres sont transversalement découpés à 0,5 cm de l'extrémité, au niveau de la connexion électrique. Les coupes sont finalement fixées par laque d'argent (SPI, West Chester, PA) sur des supports conducteurs spécifiques (SD-101, Veeco). La caractérisation électrochimique est réalisée avec un potentiostat (PGSTAT 12 Autolab, EcoChemie). La solution est composée de 5 mM de chlorure d'hexaamineruthénium(III) ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, Aldrich) et de 1M de sel électrolytique nitrate de potassium (KNO_3 , Labosi).

La cellule est constituée d'une chambre cylindrique en Kevlar de 5 cm de diamètre et 3 cm de long, équipée d'un petit canal latéral pour introduire la solution électrochimiluminescente et d'une fenêtre en verre très fine qui constitue la paroi faisant face à l'objectif.^[80] La contre-électrode et l'électrode de pseudo-référence sont respectivement des fils de platine et d'argent, dont les extrémités sont moulées parallèlement dans un cylindre de résine époxy (Plexcil C6 et A6, Escil). Ce cylindre peut être vissé verticalement à l'intérieur de la cellule de façon étanche, pour former entre sa surface plane et la paroi en verre un compartiment pouvant accueillir une solution d'épaisseur d'environ 0,8 cm. Il est traversé par un capillaire servant à introduire le réseau. L'ensemble de la chambre est disposé horizontalement face à l'objectif de microscope.

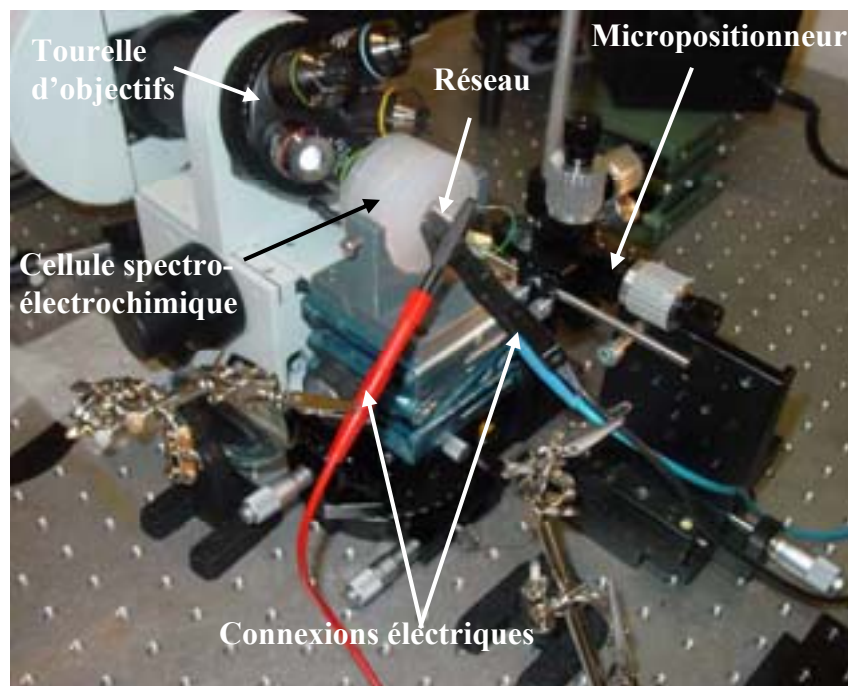


Figure 5 : Photographie du montage pour l'imagerie électrochimiluminescente de face. Le réseau est introduit horizontalement dans un capillaire formé à travers le cylindre de résine.

La caractérisation par imagerie d'électrochimiluminescence est réalisée en utilisant une cellule spectroélectrochimique permettant de disposer à l'horizontale le réseau en face d'un dispositif de microscopie. Ce montage est présenté sur la figure 5.

Le réseau de capteurs est introduit dans le capillaire formé à travers la résine à l'aide d'un micropositionneur 3-axes de haute précision (MDT616, Thorlabs). Après la traversée complète de cette paroi, la surface électroactive du faisceau est alors dans le même plan que les deux autres électrodes, et peut alors être alignée dans le plan focal d'un objectif 40X afin d'observer l'électrochimiluminescence générée par le réseau. Les signaux lumineux sont ainsi observés de face, à travers successivement la paroi vitrée et l'épaisseur 0,8 cm de solution. La solution électrochimiluminescente est un tampon phosphate aqueux (PBS : pH = 7,5, Aldrich) contenant du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (1 mM, Aldrich) et de la tri-*n*-propylamine (100 mM, Aldrich). Pour réussir à dissoudre la tri-*n*-propylamine, la solution est fortement acidifiée (pH ~3) par quelques gouttes d'acide orthophosphorique concentré sous agitation magnétique vigoureuse, puis le pH est ajusté à 7,5 par ajout de solution 5 M d'hydroxyde de solution (Aldrich).

2.3 Application à l'imagerie à distance

L'instrumentation utilisée pour l'imagerie électrochimiluminescente dérive du microscope d'épifluorescence décrit plus haut à la figure 2 (BX-30, Olympus). Les spots de lumière générés par le réseau sont collectés par un objectif de microscope grossissant 40x, envoyés sur un filtre passe-bande (605 ± 25 nm, Omega Optical), et détectés par une caméra CCD (Ropper Scientific, Marconi 47-10). La face proximale polie est disposée face au système microscope/caméra CCD. Le second type d'application d'imagerie électrochimiluminescente utilise des solutions de concentrations variables en luminol (Aldrich) et/ou peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 30%, Roth). Elles sont préparées dans un tampon borate aqueux de pH = 10 (J.T. Baker). Toutes les solutions de ce travail ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (Milli-Q Plus 185, Millipore). Enfin, l'échantillon réel qui a été visualisé à travers le réseau de capteurs est préparé à partir de deux fibres de carbone de diamètre 10 μm (Soficar), disposées en croix sur un ruban adhésif.

III - Développement de réseaux de nano-sondes à champ proche optique

3.1 Fabrication des réseaux de nano-ouvertures

Les réseaux de nano-ouvertures sont fabriqués à partir de faisceaux cohérents de 6000 fibres optiques (ING-053/06, Sumitomo Electric Industries). La procédure de polissage et la dissolution chimique sélective des cœurs du faisceau cohérent sont strictement identiques à celles évoquées ci-dessus pour la fabrication des réseaux de capteurs opto-électrochimiques. La surface est recouverte par un film d'or qui est déposée par pulvérisation cathodique sous vide à partir d'une cible d'or (JEOL). Les faisceaux sont placés verticalement dans la chambre soumise à un vide primaire (200 mtorr). Une haute tension est appliquée à la cible d'or qui génère un plasma permettant de déposer un film d'or de façon contrôlée. Les autres étapes sont similaires.

La peinture commerciale (FT83-0250, BASF) est d'abord diluée dans un rapport volumique 1 :1 avec une solution aqueuse d'acide acétique 3 mM (Prolabo). Cette dernière est ensuite diluée 50 fois dans l'eau. Le dépôt est réalisé en voltammétrie linéaire avec une

configuration à 2 électrodes. Le réseau est la cathode et un fil de platine constitue l'anode. Une fois plongé dans la peinture, le réseau subit un « pré-mouillage » de 10 min sous agitation magnétique. Pour le dépôt, un balayage en voltampérométrie linéaire est réalisé entre 0 V et $-2,5$ V à la vitesse de 20 mV/s. Le réseau est rincé dans l'eau pendant quelques secondes et porté à la température de 180°C dans une étuve pendant 1h. La dissolution chimique sélective des apex d'or des nanopointes est finalement accomplie par immersion du réseau dans une solution aqueuse à base de iodure de potassium (J.T. Baker) et de diiode (Labosi). Les proportions massiques de cette solution KI : I₂ : H₂O sont 4:1:100. Cette solution est plus diluée que les solutions commerciales. Pour ces dernières, plus agressives pour l'or car généralement moins diluées (composition 4 : 1 : 40), la vitesse de dissolution reportée est d'environ 0,5-1 $\mu\text{m}/\text{min}$. Selon la dimension moyenne des nano-ouvertures que l'on souhaite obtenir (voir la figure 12 du chapitre 3), le temps de dissolution varie de 30 s à 3 mn. Un long rinçage dans l'eau est nécessaire (30 mn) pour éliminer les résidus.

3.2 Modulation électrochimique de la photoluminescence

Les mesures électrochimiques sont effectuées avec un potentiostat PGSTAT 12 Autolab (EcoChemie). La caractérisation du comportement électrochimique en voltampérométrie stationnaire utilise une solution 1 mM de chlorure d'hexaamine-ruthénium(III) (Ru(NH₃)₆Cl₃, Aldrich) et de 1M de nitrate de potassium (KNO₃, Labosi). Les voltammogrammes sont réalisées avec une contre-électrode de platine et une électrode de référence Ag/AgCl. La cellule électrochimique est placée dans une cage de Faraday (Autolab).

Le microscope d'épifluorescence (BX-30, Olympus) modifié a déjà été présenté plus haut (Figure 2). Les faisceaux d'imagerie utilisés pour préparer des réseaux de nano-ouvertures sur la face distale sont des échantillons de 4 cm de long. La face distale est placée à l'horizontale dans la solution photoluminescente (Figure 6). Des fils d'argent et de platine sont mis en contact avec la solution, pour servir respectivement de pseudo-référence et de contre-électrode.

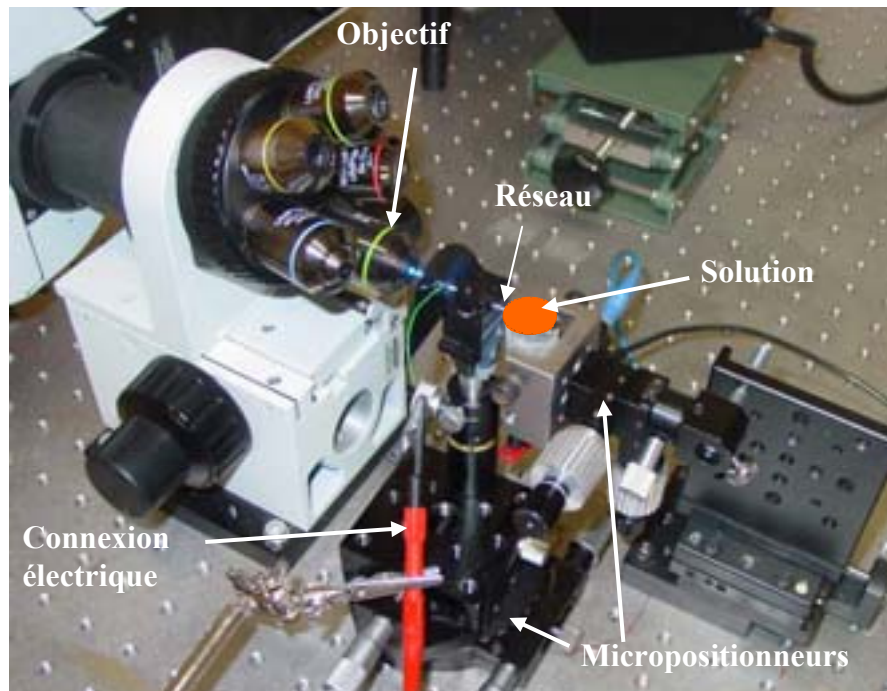


Figure 6 : Photographie du montage pour l'imagerie photoluminescente.

3.3 Caractérisation optique en champ lointain

Les propriétés en champ optique lointain sont étudiées à l'aide d'un montage réalisé au laboratoire sur une table optique (Melles Griot). Ce montage, présenté et détaillé à la figure 9 du chapitre 3 et photographié sur la figure 7, est adapté d'une technique goniométrique de caractérisation en champ lointain de nanopointe à ouverture à champ proche.^[462] Une plateforme métallique est vissée sur la partie tournante d'un goniomètre (Bouty), et sur laquelle sont alignés une diode laser (Melles Griot), une combinaison de filtre neutre, un jeu de lentille et un polariseur (ACMEL). Le faisceau de fibre optique, de longueur d'environ 6 cm, est supporté par une tige montée sur un micromanipulateur à deux axes vissé sur la table optique. L'extrémité où est fabriquée le réseau de nano-ouvertures est positionnée au centre du goniomètre, de façon à pouvoir être illuminée de façon identique quelque soit l'angle d'incidence du faisceau laser. L'autre extrémité est placée devant un objectif de microscope grossissant 20X.

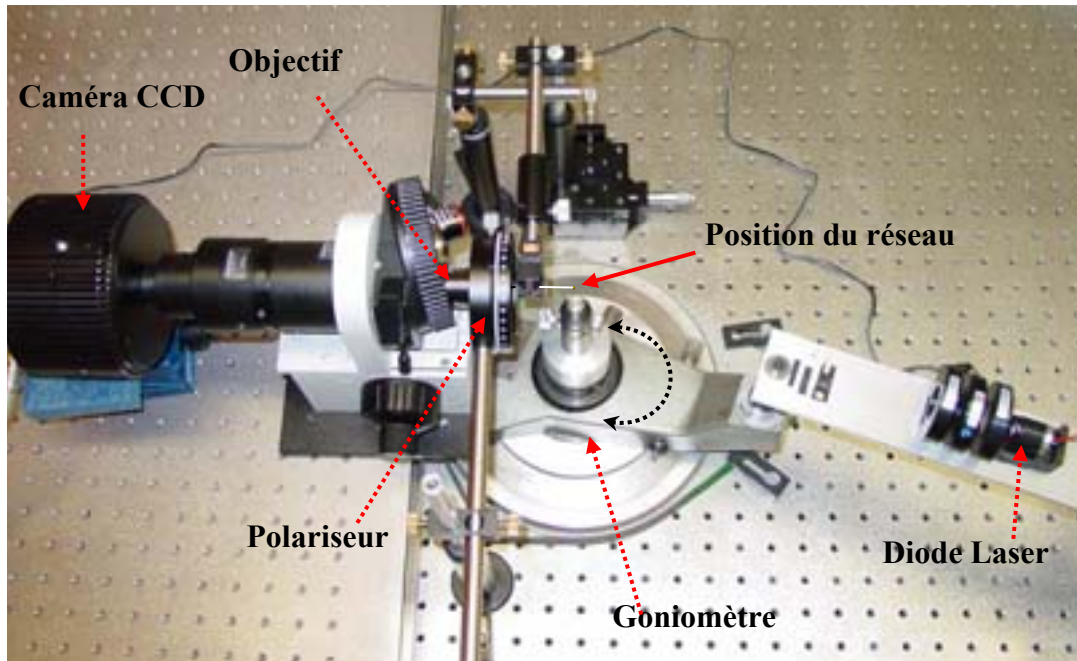


Figure 7 : Photographie du montage goniométrique pour la caractérisation des propriétés des nano-ouvertures en champ optique lointain

Un second polariseur circulaire (Melles Griot) est placé entre la face proximale du faisceau et l'objectif. L'appareillage d'imagerie est constitué d'un dispositif similaire à celui de l'épifluorescence précédemment décrit (BX-30, Olympus). Les mesures sont faites avec une caméra CCD, possédant un capteur 512x768 (Kodak), refroidit à -25°C par effet Peltier et codant les images en 12 bits (Roper Scientific). Les temps d'exposition sont ajustés entre 500 ms et 3 s, afin de fournir des intensités lumineuses significatives pour chacun des réseaux présentant des diamètres des nano-ouvertures différents. Pour construire les profils de diffraction selon les deux types de polarisation, les images sont ensuite normalisées par rapport au temps d'exposition, puis par rapport à l'intensité moyenne de l'image enregistrée à incidence 0° .

Annexe 1 : Propriétés des fibres optiques et des fibres d'imagerie

I - Les fibres optiques

Une fibre optique est un objet diélectrique qui guide les ondes lumineuses. Elle est constituée d'un cœur optique cylindrique enrobé dans une gaine optique. Les matériaux transparents utilisés pour les fabriquer sont en général à base de silice, d'oxydes ultra-purs ou bien en matière plastique. L'indice de réfraction du cœur $n_{\text{cœur}}$ est légèrement supérieur à celui de la gaine n_{gaine} , propriété ajustée en fonction du niveau de dopage du matériel transparent pur (bore, fluor, germanium etc.). Cette propriété permet à la lumière d'être guidée d'un bout à l'autre du cœur optique par réflexion totale interne à l'interface cœur/gaine (Figure 1) selon la loi de Snell-Descartes.^[493]

L'ouverture numérique (NA) définit l'angle solide θ_0 délimitant le cône d'acceptance pour lequel un rayon lumineux ayant une incidence θ avec la normale pourra effectivement être guidé à travers la fibre. La valeur de θ doit être inférieure à θ_0 pour que le rayon lumineux se propage dans le cœur.

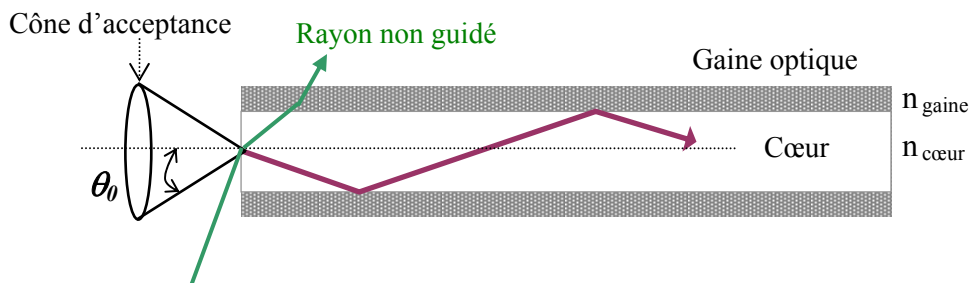


Figure 1 : Trajet de la lumière dans une fibre optique à saut d'indice

L'ouverture numérique des fibres optiques dépend de la nature des matériaux constituant le cœur et la gaine. Les paramètres importants sont les valeurs de leurs indices de réfraction. L'indice de réfraction du milieu environnant la fibre (n_{milieu}) influe également sur la valeur de l'angle θ_0 .^[493] L'expression de l'ouverture numérique est donnée dans le contenu du chapitre 1 (Equation 1).

Les fibres optiques peuvent être classées en deux catégories selon le profil d'indice d'indice de réfraction le long de leur section transverse. Si l'indice du cœur ($n_{\text{cœur}}$) et de la gaine (n_{gaine}) sont uniformes mais avec un changement brusque d'indice à l'interface cœur/gaine, la fibre est dite à saut d'indice. Si l'indice de réfraction du cœur décroît paraboliquement de l'axe du cœur jusqu'à la gaine, il s'agit alors d'une fibre à gradient d'indice. Dans une telle fibre, la lumière se propage selon un parcours sinusoïdal. Une autre classification des fibres optiques dépend de leur taille de cœur qui influe sur la propagation dans la fibre. Les fibres sont dites monomodes si le cœur est d'un diamètre de quelques μm , et multimodes pour des diamètres de cœur jusqu'à 100 μm . La notion de mode de propagation provient de la théorie ondulatoire de la lumière qui utilise les équations de Maxwell avec des conditions aux limites appliquées à la propagation dans les fibres optiques.^[494] Les ondes associées aux rayons lumineux réfléchis à l'interface interfèrent. Parmi tous les angles d'inclinaison, certains correspondent à une condition de phase qui construit une interférence constructive identique tout le long de l'axe : ce sont les modes guidés. Si on définit le paramètre $V = k \cdot a \cdot \text{NA}$ (où k est le vecteur d'onde $2\pi/\lambda$ et a le rayon de cœur), le nombre de modes est donné par $N = V^2/2$. Il y a donc un nombre limité de modes, qui dépend de la longueur d'onde. Globalement, pour une fibre monomode, $V < 2,4$ et seul le mode fondamental se propage. Si $V > 2,4$, plusieurs modes peuvent se propager, la fibre est multimode.^[494] En pratique, les modes se manifestent par les différents chemins optiques que peuvent effectuer les rayons lumineux dans la fibre. Dans une fibre monomode, la seule trajectoire possible de la lumière est suivant l'axe. Dans une fibre multimode, la lumière n'est donc pas confinée au voisinage de l'axe du cœur mais suit plusieurs trajectoires de longueurs différentes. Du fait de ces différences entre les chemins optiques, les modes ne se propagent donc pas à la même vitesse. De ce fait, même si les rayons lumineux ne portent qu'une seule et même information, celle-ci sera brouillée à la sortie d'une fibre multimode. Les fibres monomodes permettent d'éviter ce phénomène, et, de ce fait, cette catégorie de fibre est notamment utilisée pour la télécommunication.

II - Capteurs à fibre optique

Les fibres optiques ont grandement été utilisées à des fins analytiques. Elles présentent un intérêt majeur dans leur utilisation comme guide de lumière quand elles sont couplées avec les méthodes spectroscopiques. Dans ces dispositifs, leur objectif est de

guider un signal spectroscopique dans les milieux difficilement accessibles. En spectroélectrochimie, elle donne ainsi accès à un autre domaine d'information, une information optique, nouvelle et souvent complémentaire de l'information électrochimique. Nous présentons ici la notion de capteur à fibre optique, en s'appuyant plus précisément sur l'un des schémas de détection basé sur la fluorescence. En chimie analytique, les fibres optiques sont surtout utilisées comme support pour développer des capteurs chimiques (appelés "optrode") ou des biocapteurs. La fibre optique joue le rôle de transducteur optique, de même qu'une électrode est le transducteur électrique des capteurs électrochimiques. Une membrane possédant des propriétés de reconnaissance est le plus souvent déposée à l'extrémité de la fibre optique. Cette membrane est constituée généralement d'un matériel polymère ou sol-gel, stable, poreux et transparent, et qui piège physiquement ou chimiquement une molécule ayant une propriété optique. Cette propriété optique sert de témoin à la détection, le plus souvent en étant greffé comme marqueur sur les molécules de reconnaissance. L'un des principes les plus classiques est basé sur la variation d'intensité de la fluorescence du marqueur chimique immobilisé à l'intérieur de la membrane en réponse à la présence de l'analyte (Figure 1). Les variations enregistrées permettent de quantifier la quantité d'espèce chimique détectée sélectivement.

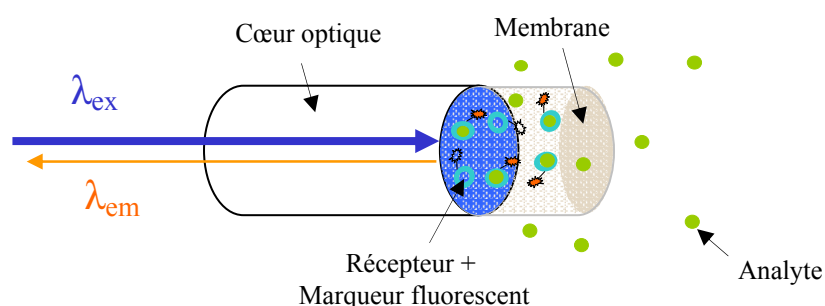


Figure 2 : Principe simplifié du fonctionnement d'un capteur chimique à fibre optique

En mode fluorescence, la fibre optique achemine la longueur d'onde excitatrice (λ_{ex}) spécifique aux marqueurs immobilisés dans la membrane (Figure 1). Ces marqueurs fluorescents émettent de la lumière à une longueur d'onde caractéristique (λ_{em}). Une partie de ce signal de fluorescence est captée en retour par la fibre optique. Suite à l'interaction entre le récepteur et l'analyte qui diffuse dans la membrane, la fluorescence du marqueur est modifiée. Le changement global de l'intensité de fluorescence, transmis *via* la fibre vers un détecteur optique, permet alors de quantifier la concentration locale en analyte localement présent et réagissant dans la couche sensible.

La gamme des capteurs à fibre optique est très riche : capteurs physiques, capteurs chimiques ou capteurs biologiques selon le principe de détection ou la provenance de la molécule utilisée comme marqueur. Les premiers capteurs optiques apparaissent au début des années 1980, principalement dans le but de détecter le pH ou l'oxygène par fluorescence, grâce à l'immobilisation de marqueurs comme la fluorescéine, le rouge phénol, ou les complexes de ruthénium avec des ligands phénantrolines par exemple.^[66,495,496] Les caractéristiques et applications des capteurs à fibre optique sont maintenant extrêmement variés.^[71, 497]

III - Les fibres d'imagerie

Une fibre optique unique permet de transmettre une intensité lumineuse ou une longueur d'onde. Cependant, elle ne peut transmettre une image globale du fait des réflexions totales internes. Dans ce but, un grand nombre de fibres optiques doivent être alignées et ordonnées de façon à former un faisceau cohérent. Dans cette configuration multifibre, une fibre optique individuelle est identifiée comme étant un cœur. Une fibre d'imagerie est un faisceau cohérent souvent souple comprenant des milliers de fibres optiques monomodes dont le diamètre de cœur est de quelques micromètres.^[498,499] Le diamètre total de la fibre d'imagerie varie d'environ 100 μm à 1 mm, dépendant bien sûr du nombre de cœurs qui les constituent (respectivement 2000 à 30000). La figure 3A ci-dessous présente la dimension d'une fibre d'imagerie 6000 cœurs comparée à la dimension d'un macro-objet usuel.

Chaque cœur est entouré d'une gaine optique d'indice de réfraction légèrement inférieur, de telle sorte que la lumière ne se propage que de manière confinée dans les cœurs. L'arrangement ordonné des cœurs optiques permet de transmettre très précisément une image. Chaque cœur capture la petite portion de l'image auquel il a accès et la transmet le long de la fibre. L'image entière collectée d'un côté est transmise à l'autre extrémité. Un capteur à deux dimensions tel qu'une caméra CCD la retranscrit en image.

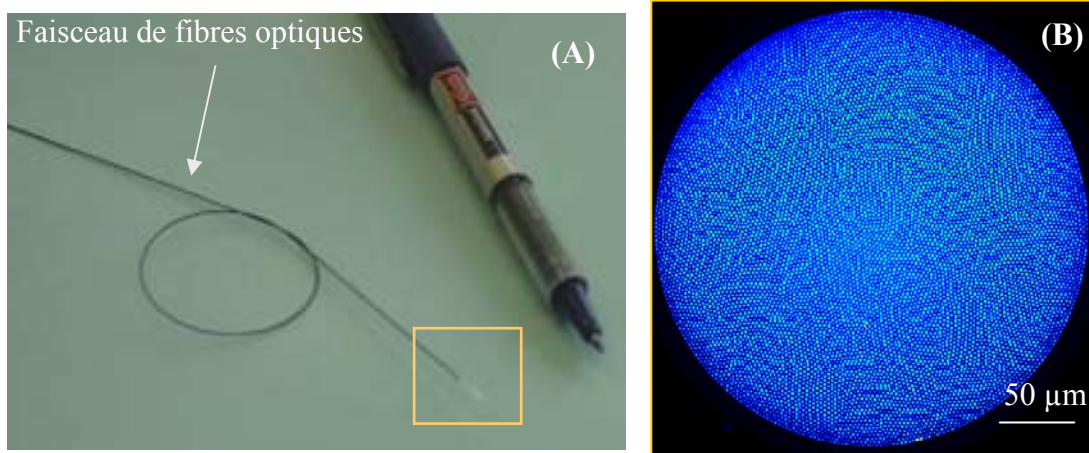


Figure 3 : (A) Dimension d'une fibre d'imagerie de 6000 cœurs comparée à celle d'un stylo. (B) Image en lumière blanche de la face d'un faisceau de fibres optiques.

L'image d'un faisceau cohérent de fibres optiques obtenue par transmission d'une lumière blanche avec une caméra CCD est présentée sur la figure 3B. Les spots de lumière nettement visibles correspondent à la distribution des 6000 cœurs individuels, ayant un diamètre de $3 \mu\text{m}$, et disposés dans une zone de transmission circulaire de $270 \mu\text{m}$ de diamètre.

La résolution spatiale optique est la propriété qui rend possible la visualisation de petits détails de l'image. Elle dépend du nombre de cœurs individuels, qui constitue alors des « pixels », de la distance entre les cœurs, de leur ouverture numérique et de leur diamètre. Une des causes de perte de résolution est la fuite de la lumière transportée par un cœur vers les cœurs parallèles voisins (ou « cross-talk »). Ce couplage inter-fibre est rendu négligeable si l'épaisseur de la gaine est suffisante où si le diamètre des cœurs varie légèrement tout au long du faisceau afin d'éviter des effets de résonance.^[499] Une autre qualité requise pour les faisceaux cohérents est relative à la quantité d'illumination (en mode émetteur) ou l'efficacité de collecte de lumière (en mode collecteur) permis par la propriété des cœurs optiques individuels. C'est principalement leur ouverture numérique qui influe sur cette caractéristique. Intuitivement, il est clair que pour illuminer ou collecter une quantité de lumière suffisante, l'ouverture numérique doit être relativement grande. Trouver le compromis entre une bonne résolution spatiale et une efficacité raisonnable de collecte de lumière est le premier paramètre recherché lorsque l'on conçoit un dispositif d'imagerie s'appuyant sur ces faisceaux cohérents d'imagerie.

L'instrumentation médicale est l'un des domaines les plus importants d'applications des faisceaux de fibres optiques. Ces objets constituent la pièce essentielle des endoscopes flexibles. Le premier "fibroscope" date de 1958. Il s'agissait d'un faisceau non cohérent destiné à l'illumination des tissus.^[500] Actuellement ils sont intégrés comme conduit d'image dans des dispositifs de microscopie pour l'observation *in situ* d'échantillons biologiques par exemple,^[501] ou encore juxtaposés à des microlentilles pour créer de véritables microscopes miniatures destinée spécifiquement à l'imagerie fluorescente dans des échantillons biologiques.^[502-504] D'une façon plus générale, ces fibres sont utilisées en routine pour l'observation ou la mesure en milieu industriel. Leurs atouts sont la résolution spatiale, la très petite dimension, la flexibilité, la résistance thermique ou encore la stabilité de mesure aux perturbations électromagnétiques.^[505]

Une approche très féconde a été d'utiliser ces faisceaux de fibres dans une approche combinant imagerie et détection chimique.^[72,347] L'image des détails d'un échantillon peut alors être visualisée simultanément avec une cartographie chimique des concentrations de surface locales.^[163] Pour réaliser cette nouvelle variété de capteurs chimiques, la face d'une fibre d'imagerie a été modifiée par immobilisation d'une sonde fluorescente possédant des propriétés de reconnaissance moléculaire. De nombreux résultats touchant à des domaines variés ont été décrit à partir de cette approche. Nous n'en citerons que quelques uns : l'utilisation des faisceaux cohérents comme plateforme pour la détection multi-sites de pH,^[506] ou la détection multi-analytes (glucose/oxygène,^[507] pénicilline/pH^[508]), le développement de nez artificiels^[295,509] et de réseaux de capteurs à ADN (www.illumina.com),^[294] la détection spatiale de phénomènes de corrosion localisée.^[348, 349] D'autres stratégies ont conduit au développement de réseaux de nanocapteurs sensibles au pH,^[291] ainsi qu'une sonde d'imagerie pour mesurer la consommation d'oxygène *in situ* dans le cœur de souris.^[350] D'autres applications potentielles prometteuses découlent d'architecture façonnée à la surface des faisceaux.^[289, 293]

Annexe 2 : Ru(bpy)₃²⁺

I - Structure électronique et états excités

Le complexe tris(2,2'-bipyridine) ruthénium(II) est une molécule possédant une remarquable combinaison de propriétés : solubilité, stabilité chimique et propriétés électrochimiques dans l'eau comme dans des solvants organiques, émission stable de photoluminescence et d'électrochimiluminescence, durée de vie et réactivité à l'état excité. Il est représenté sur la figure 1. Cette molécule présente une différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité émetteur située dans le domaine d'énergie de la lumière visible (380-780 nm), soit de 1,6 à 3,2 eV. Ce critère est rarement satisfait avec les métaux de la première période du bloc d, contrairement à ceux de la seconde et troisième période, et en particulier le ruthénium et l'osmium (configuration en d⁶).^[510] Des ligands de nature différente (bipyridine, phénantroline, imidazole, amine, chlorure etc.) occupent la sphère de coordination du métal ou de l'ion métallique central. Ils jouent un rôle primordial sur les propriétés luminescentes du complexe, en modulant la force du champ de ligand imposé au centre métallique. Les données spectroscopiques et photophysiques de Ru(bpy)₃²⁺ et de plusieurs centaines de dérivés ont été répertoriées dans une revue très complète.^[341] L'intérêt généré par l'étude de cette molécule et ses dérivés a stimulé plusieurs branches de la chimie pure ou appliquée. En particulier, ce complexe a eu un impact considérable dans le développement de la photochimie, de la photocatalyse, de la photo-électrochimie, de l'électrochimiluminescence ou de la conversion d'énergie solaire.^[162]

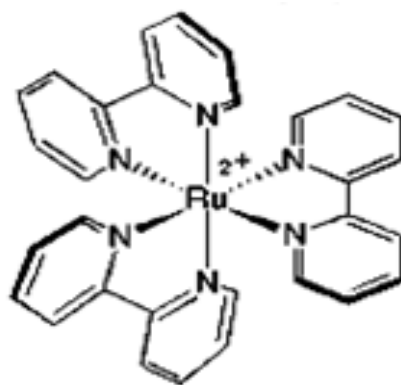


Figure 1 : Tris(2,2'-bipyridine)ruthénium(II)

Il possède des ligands neutres bidentates (ou chélates) constitués par trois molécules bipyridine. La bipyridine possède des orbitales σ donneuses d'électrons localisées sur les azotes, et des orbitales π donneuses et π^* acceptées plus ou moins délocalisées sur les noyaux aromatiques. La configuration électronique de l'ion Ru^{2+} est $[\text{Kr}]4d^6$. Dans la théorie du champ cristallin, les ligands aromatiques bipyridine (ligand à champs fort) lèvent la dégénérescence des orbitales d du métal : les trois orbitales t_{2g} (les orbitales atomiques d_{xy}, d_{zx} et d_{yz}), subissant la faible attraction électronique des ligands, sont stabilisées en énergie par rapport aux deux orbitales e_g (d_{z²} et d_{x²-y²}), dont les lobes sont directement dirigés vers les charges des ligands. Le remplissage électronique de l'ion Ru^{2+} est du type $t_{2g}^6 e_g^0$.

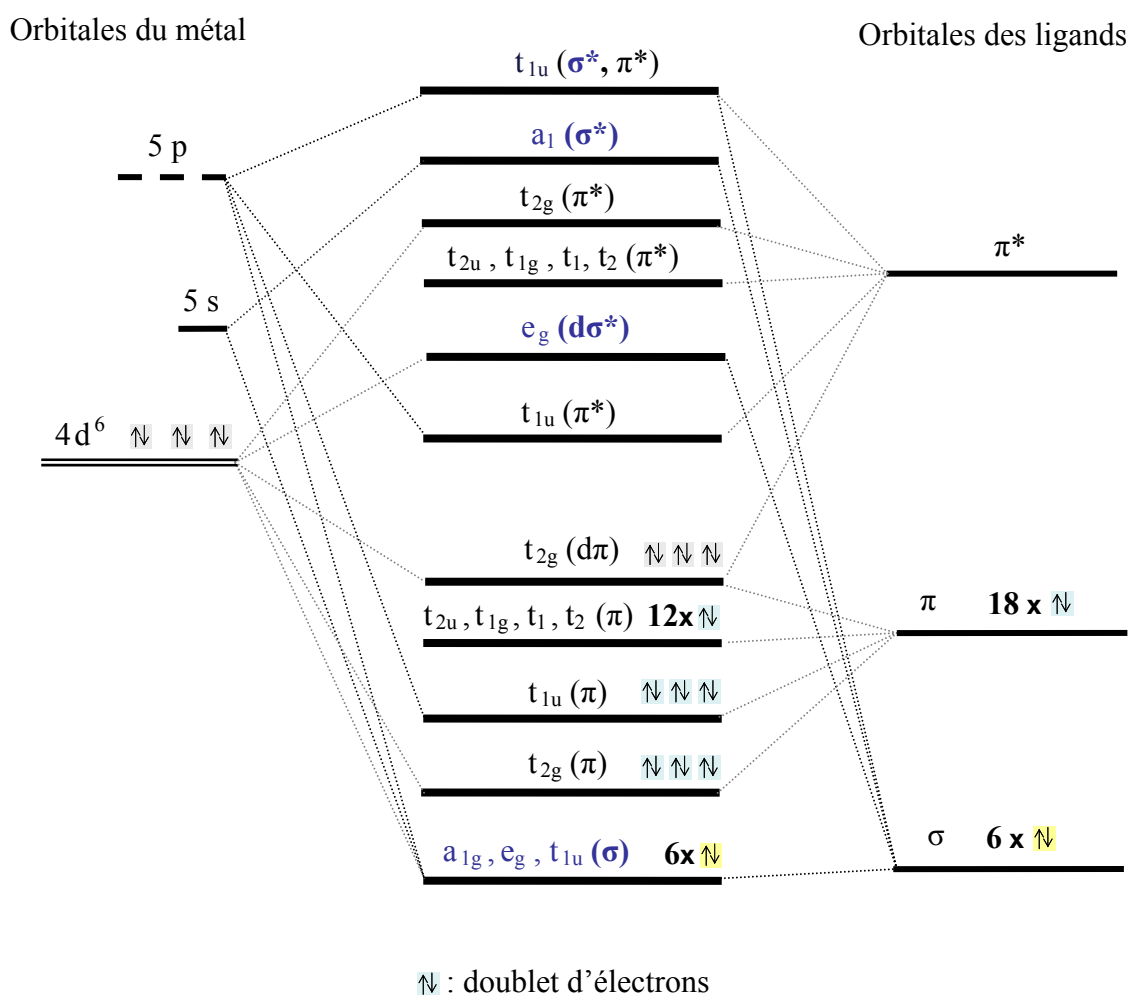


Figure 2 : Diagrammes des orbitales moléculaires du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ à l'état fondamental (microsymétrie octaédrique). Les 6 électrons 4d du métal, 12 électrons σ et 36 électrons π des ligands remplissent les orbitales jusqu'au niveau $t_{2g} (d\pi)$.

Cependant, la théorie électrostatique ne donne qu'une représentation incomplète de la configuration électronique de la molécule pour parvenir à décrire l'état excité émetteur. La théorie des orbitales moléculaires localisées est nettement plus appropriée. Les orbitales moléculaires de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et la structure électronique à l'état fondamental sont représentées sur le diagramme de la figure 2.^[181]

Les orbitales moléculaires permettent de rendre compte du caractère covalent partiel des liaisons métal-ligand. Les orbitales atomiques σ des ligands bpy possèdent chacune une symétrie propre à interagir avec des orbitales atomiques 4d du métal central hybridé d^2sp^3 et dont l'environnement est de symétrie octaédrique. Six liaisons σ métal-ligand sont ainsi assurées par le remplissage d'orbitales moléculaires liantes a_{1g} , e_g et t_{1u} avec les doublets qui se trouvaient dans les orbitales σ des ligands. A celles-ci sont associées six orbitales moléculaires antiliantes à haute énergie (σ^*). L'ion métallique central conserve les six électrons 4d dans trois orbitales non-liantes $d\pi$, formant le triplet dégénéré t_{2g} . Du fait de l'interaction avec le nuage d'électrons π des ligands bpy, le triplet t_{2g} perd le caractère purement métallique d'orbitale d. Par ailleurs, l'interaction métal/ligand lève la dégénérescence des orbitales moléculaires π et π^* portées principalement par les bipyridines, les orbitales liantes dégénérées étant occupées par les 18 doublets d'électrons. Dans l'état fondamental, les électrons occupent toutes les orbitales liantes jusqu'à t_{2g} ($d\pi$) (HOMO) (figure 2). La longueur de liaison Ru-N peut être estimée à 2,05 angströms.^[341]

L'acte premier de tous les phénomènes photoluminescents repose sur l'absorption d'un photon d'énergie quantifiée pour former un état excité. L'absorption est un processus photophysique qui provoque une transition affectant le nuage électronique de la molécule, par transfert d'un électron d'une orbitale liante vers une antiliante d'énergie supérieure. Pour faire une classification des types de transitions pouvant conduire à un état excité de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, la figure 3A montre un diagramme simplifié des orbitales moléculaires.^[162] La promotion d'un électron d'une orbitale t_{2g} , localisée sur l'ion métallique, vers une orbitale $t_{1u}(\pi^*)$ associée aux ligands (LUMO), forment un état excité par transfert de charge métal-ligand ($d \rightarrow \pi^*$: MLCT). Cette transition est présentée sur la figure 3B, en utilisant un diagramme plus détaillé sur les orbitales HOMO (t_{2g}) et les orbitales LUMO (t_{1u}). En effet, en symétrie D_3 utilisée dans certains travaux, ces deux orbitales triplement dégénérées sont chacune séparées en deux autres orbitales, dont l'une est doublement dégénérée (e_g).^[181, 511] Quatre transitions MLCT peuvent se produire : $e(d\pi) \rightarrow a_2(\pi^*)$, $e(d\pi) \rightarrow e(\pi^*)$, $a_1(d\pi) \rightarrow a_2$

(π^*) et $a_1(d\pi) \rightarrow e(\pi^*)$. Du fait de ces levées de dégénérescence, le niveau énergétique MLCT est décrit plus précisément comme un groupe d'états excités d'énergie très proche. Ces transitions provoquent une bande d'absorption large et intense dans le domaine visible. D'autres types de transfert d'électron peuvent se produire entre une orbitale t_{2g} du métal et une orbitale $e_g(d\sigma^*)$ également liée au métal. Il s'agit d'une transition confinée à l'ion métallique ($d \rightarrow d^*$: MC). L'électron promu peut posséder un spin soit parallèle soit antiparallèle par rapport à l'électron célibataire restant dans l'orbitale t_{2g} . Enfin, la promotion d'électrons entre orbitales plutôt localisées sur les ligands conduit à une transition centrée sur les ligands ($\pi_L \rightarrow \pi_L^*$: LC). Les niveaux d'énergie des états excités LC sont nettement plus élevés que pour ceux des états excités MLCT et MC. Les bandes figurant sur le spectre d'absorption correspondent aux longueurs d'onde des photons absorbés qui provoquent les transitions électroniques propres à la molécule. Le spectre d'absorption de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ montre 3 bandes dans l'UV (185, 208 et 285 nm) qui correspondent à des transitions LC ($\pi_L \rightarrow \pi_L^*$), étant donnée la correspondance avec le spectre de la bipyridine protonées.¹⁶² Deux bandes faibles à 238 et 250 nm, ainsi que deux épaulements à 323 et 345 nm semblent correspondre aux transitions MC. Aussi, des bandes intenses d'absorption à 240 et 452 nm correspondent à des transitions MLCT.

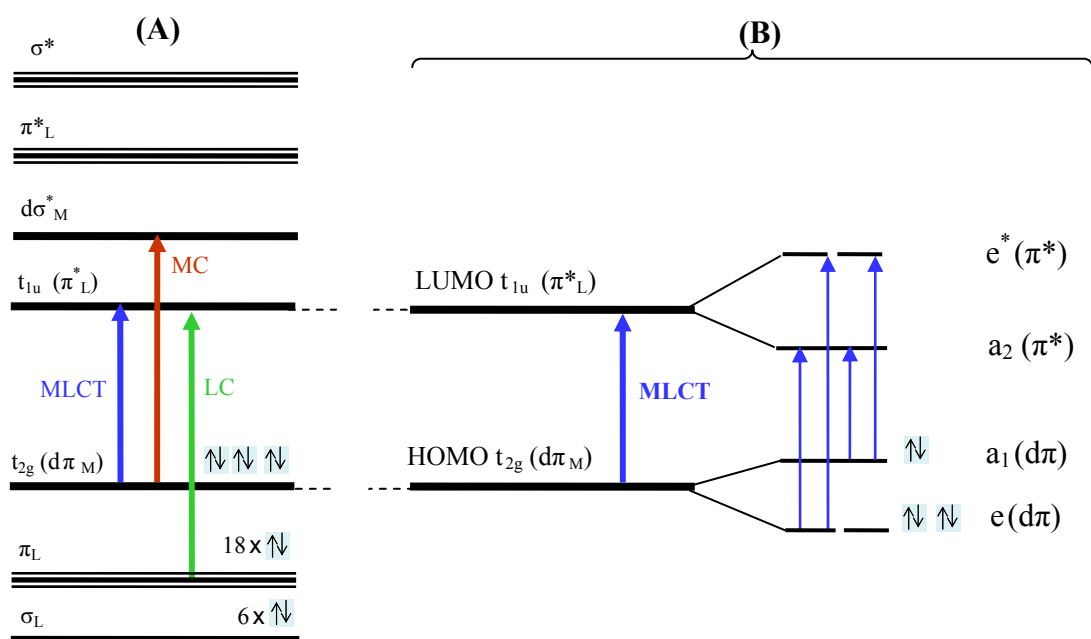


Figure 3: (A) Diagramme simplifié des orbitales moléculaires de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en symétrie octaédrique, montrant les trois types de transitions électroniques se produisant à faible énergie. Les indices L et M désignent les orbitales plutôt localisées sur les ligands et sur le métal, respectivement. (B) Représentation détaillée de la transition MLCT.

Sur le spectre d'émission de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, une large bande d'émission à 293 K centrée autour de 600 nm (rouge orangé) est observée.^[162] La nature orbitale et l'état de spin de l'état excité émetteur de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ont très longtemps fait l'objet d'une controverse.^[510, 511] Généralement, pour les complexes de ruthénium polypyridiniques, les états excités MC ne sont pas impliqués dans les propriétés de luminescence, car ils suivent surtout un processus de désactivation non radiative.^[341] Les états excités MLCT sont usuellement luminescent à température ambiante et en solution, alors que les états excités LC ne sont luminescents qu'en matrice solide et à très faible température. Il ne fait plus de doute aujourd'hui que c'est le système MLCT qui est responsable de la photoluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et de ses dérivés en solution aqueuse à 298 K.^[162] Par comparaison avec les systèmes LC et MC, ce système présente le plus faible niveau d'énergie (2,1 eV), celui d'où peut survenir un processus luminescent. De plus, s'il est généralement possible d'attribuer un nombre quantique de spin S précis aux états excités LC et MC (singulet $S=0$, ou triplet $S=1$), le nombre S n'est pas vraiment bien approprié pour décrire le spin de l'état excité MLCT. Ce dernier possède cependant un caractère plutôt triplet, c'est-à-dire qu'il est globalement issu d'un transfert de charge métal/ligand interdit d'après les règles de sélection liées aux transitions de spin. Généralement, la probabilité des transitions singulet/triplet dans une molécule est très faible, c'est-à-dire que le peuplement d'états excités triplets directement à partir de l'état fondamental singulet est inefficace. Il est par ailleurs très difficile d'observer ces transitions sur les spectres d'absorption. Dans le cas du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, l'existence d'un très fort couplage spin-orbite* induit par la présence de l'atome lourd (ruthénium) permet d'augmenter grandement la probabilité des transitions singulet/triplet.^[130] Le peuplement d'un état triplet MLCT est en fait rendu très efficace par un croisement intersystème exceptionnellement rapide grâce à l'effet du couplage spin-orbite.^[511] L'émission de la photoluminescence provient donc de niveaux d'énergie MLCT de multiplicité de spin mélangée (singulet/triplet), plus proche formellement du caractère triplet mais avec un nombre quantique de spin S pas spécifiquement égal à 1. Il a été par exemple estimé que l'état excité émetteur de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ contient au moins 10 % de caractère singulet.^[512]

* Le couplage spin-orbite peut être perçu de façon simple en considérant le mouvement orbital de l'électron. La rotation de l'électron autour du noyau donne naissance à un moment magnétique interne. Par ailleurs, l'électron tourne sur lui-même, ce qui génère un autre moment magnétique intrinsèque associé au spin du même électron. Le couplage spin-orbite résulte de l'interaction faible entre ces deux moments magnétiques.

C'est pourquoi, nous n'avons pas utilisé dans ce travail l'un des termes « fluorescence » ou « phosphorescence » pour qualifier le phénomène de photoluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Cette mixité sur la nature de l'émission se répercute également sur la valeur de la durée de vie de l'état excité qui est estimée à environ 0,6 μs dans l'eau et à 25°C.^[162] Ce temps caractéristique est anormalement plus court que les durées de vie généralement rencontrées pour des molécules purement phosphorescentes, et plus longue que celles des molécules purement fluorescentes.^[130]

II – Propriétés électrochimiques

D'un certain point de vue, la formation de l'état excité MLCT peut être assimilée à une « oxydation » de l'ion métallique (Ru^{3+}) et une « réduction » d'un ligand (bpy^{\bullet}). L'état excité peut alors être noté par $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})_2(\text{bpy}^{\bullet})]^{2+}$. Ce sont ces mêmes orbitales moléculaires ($d\pi$ et π^*_L) qui sont impliquées dans l'oxydo-réduction du complexe. Ces propriétés sont décrites à partir du diagramme des orbitales moléculaires (Figure 2).

L'oxydation est un processus électronique MC, avec la perte d'un électron de l'une des orbitales t_{2g} ($d\pi$) du métal, pour atteindre une configuration en $4d^5$ ($[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+}$). La forme oxydée $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ n'a donc pas de propriétés de photoluminescence.^[164] Par ailleurs, l'oxydation étant un processus centrée sur le métal, elle est fortement réversible. Le potentiel associé à cette réaction se situe autour de 1,25 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène.^[162] Par ailleurs, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ peut être réduit par l'eau, ce qui lui confère une relative instabilité en solution aqueuse à pH basique.^[164, 513] Il faut noter que, dans le cas où un ou plusieurs ligands bipyridine sont substitués par un autre ligand, le potentiel d'oxydation peut être considérablement modifié, selon le caractère du champ de ligand (π donneur ou π accepteur) et donc de son affinité pour les électrons du métal.

La réduction au contraire est un processus centrée sur les ligands (LC), l'électron supplémentaire étant accepté sur l'orbitale t_{1u} (π^*_L) d'un ligand en particulier. Ceci provient du fait que le champ de ligand est plutôt fort et du caractère oxydant des bpy. Donc, sous la forme réduite, le complexe est décrit comme étant un ion métallique Ru^{2+} (configuration d^6 conservée) contenant un radical ligand bpy^{\bullet} ($[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2(\text{bpy}^{\bullet})]^+$). La réduction est également réversible. Il est intéressant de remarquer que si la réduction était éventuellement

centrée sur le métal, le ruthénium serait dans une configuration $4d^7$ instable. Un tel système donnerait lieu à une dissociation des ligands du complexe, et donc la réduction serait irréversible. Un tel comportement n'est pas observé pour les complexes de ruthénium. La validation expérimentale de la localisation des orbitales engagées dans les réactions de transfert d'électron a le plus souvent employée la voltammétrie cyclique.^[341] Dans la littérature, cette méthode fut le plus souvent employée en solvants aprotiques non aqueux, mais des résultats similaires peuvent être obtenues en solution aqueuse.^[341]

III – Electrochimiluminescence du système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$

Dans le système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$, l'émission de lumière résulte de la formation de l'état excité MLCT $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$. Ce fait se justifie par la similitude du spectre d'électrochimiluminescence avec celui de photoluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ seul. Le mécanisme exact faisant intervenir TPrA (tri-*n*-propylamine $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$) n'est pas encore complètement éclairé. Différentes voies possibles, représentées sur la figure 4, ont été récemment résumées.^[344]

Pour les fortes concentrations de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (~ 1 mM), les 3 schémas ci-dessus permettent d'expliquer les observations expérimentales. Ces mécanismes sont dit « oxydant-réducteur », car ils permettent la formation d'un oxydant fort ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$) et d'un réducteur fort (TPrA^\bullet). La figure 4A représente « la voie catalytique », où TPrA est oxydé seulement par réaction homogène avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. TPrA^\bullet qui s'est formé par déprotonation de $\text{TPrA}^{\bullet+}$ transfère alors un électron dans une orbitale π^*_L d'une des bipyridines de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Elle génère ainsi l'état excité MLCT $[\text{Ru}^{(\text{III})}(\text{bpy})_2(\text{bpy}^\bullet)]^{2+}$ qui se désactive par luminescence. Au contraire du précédent, les schémas de la figure 4B et 4C impliquent l'oxydation de TPrA directement à l'électrode et, en concomitance avec l'oxydation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Ces deux voies diffèrent ensuite sur le mécanisme conduisant à l'état excité luminescent. Celui de la figure 4B montre la réaction classique de TPrA^\bullet avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, tandis que celui de la figure 4C propose la formation de la forme réduite $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$. Cette dernière réagit ensuite avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ pour générer la luminescence selon une réaction d'annihilation.^[340,514]

Lorsque la concentration de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est faible (~ 1 μM), la situation est plus complexe. En effet, l'émission électrochimiluminescente peut également être détectée même à un potentiel où $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ n'est pas oxydé directement à la surface de l'électrode. De

même, dans le système commercial IGEN, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est immobilisé à la surface de microbilles magnétiques de 2,8 μm de diamètre.^[355,356] Seule une petite fraction de ces $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ immobilisés peut directement être oxydée à la surface de l'électrode.^[344] Cependant, la sensibilité de la méthode étant excellente, la majorité des $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ présent à la surface doit intervenir pour générer un signal électrochimiluminescent intense.

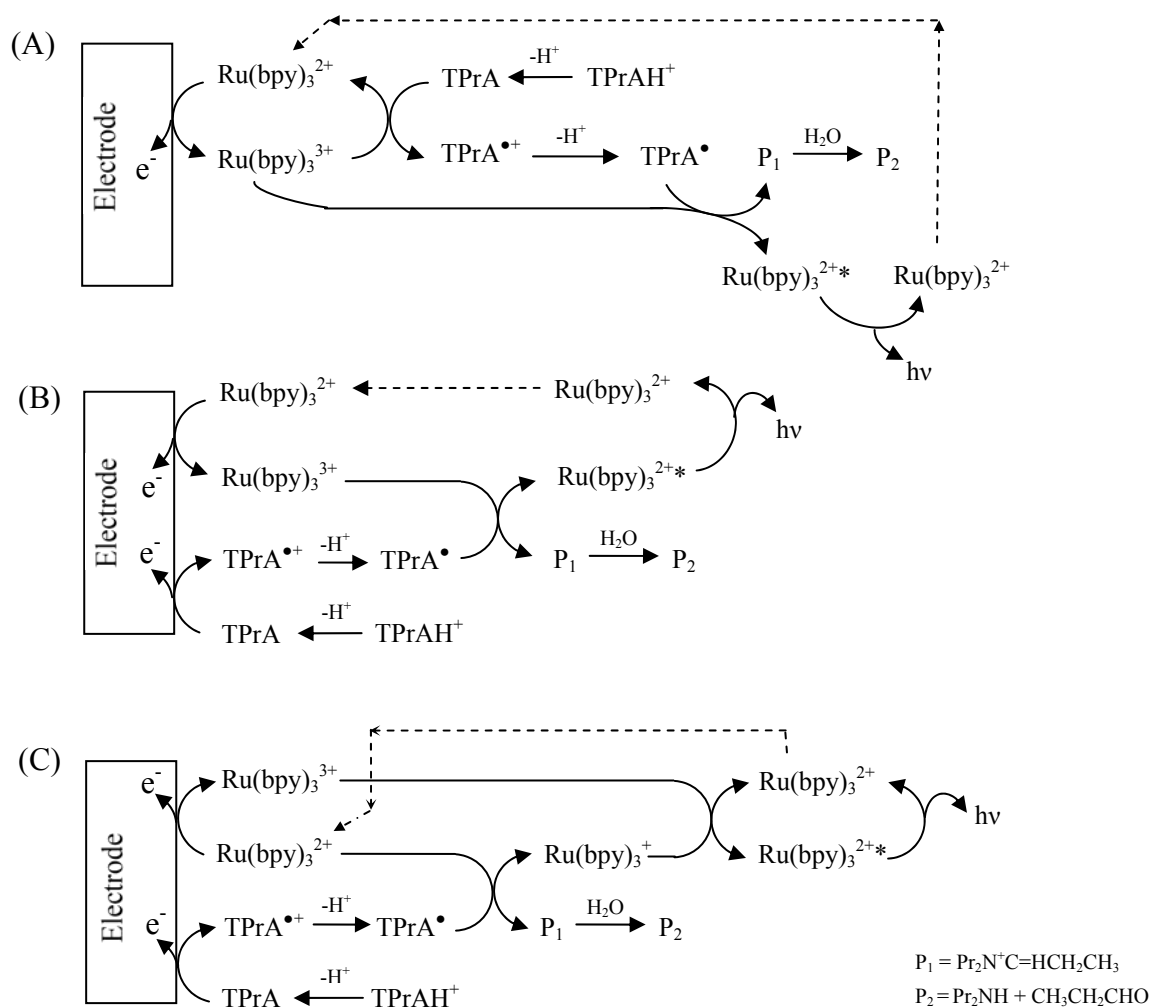


Figure 4: Mécanismes réactionnels proposés pour l'électrochimiluminescence du système $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$. (A) Mécanisme par oxydation homogène de TPrA avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (« route catalytique »). (B) Mécanisme par oxydation directe de TPrA à l'électrode et réaction avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. (C) Mécanisme par oxydation directe de TPrA à l'électrode et réaction avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ pour former $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Ce dernier réagit avec $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ pour générer l'émission de luminescence par annihilation.

Cela s'effectue probablement par une séquence réactionnelle faisant intervenir directement le co-réactif TPrA. Les études récentes se sont consacrées à proposer de nouveaux schémas réactionnels pouvant être en accord avec ces observations expérimentales, et donc aussi sur la caractérisation des espèces intermédiaires impliquées.

Dans l'eau, sur électrodes d'or et de platine, la formation d'oxydes à la surface de l'électrode inhibe l'oxydation directe de TPrA. Par contre, sur carbone vitreux, on observe une vague irréversible d'oxydation de TPrA dans l'eau et un signal électrochimiluminescent correspondant.

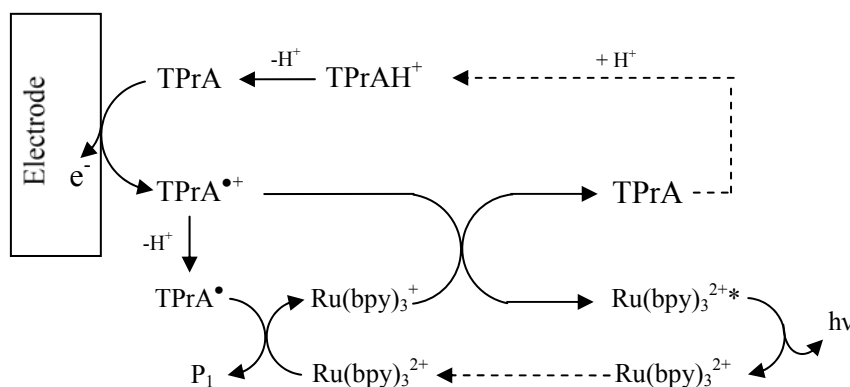


Figure 5 : Schéma réactionnel susceptible d'expliquer le phénomène d'électrochimiluminescence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ généré avant le potentiel d'oxydation directe du complexe à l'électrode

Afin d'expliquer l'émission observée à des potentiels où $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ne s'oxyde pas encore, une nouvelle voie a été proposée, où le co-réactif forme à la fois l'oxydant fort ($\text{TPrA}^{\bullet+}$) et le réducteur fort (TPrA^\bullet).^[344] Ce schéma est présenté sur la figure 5, montrant notamment le rôle direct de $\text{TPrA}^{\bullet+}$ qui serait une espèce suffisamment stable pour agir sur l'électrochimiluminescence. Suite à une oxydation à l'électrode, $\text{TPrA}^{\bullet+}$ perd un proton sur un carbone en α et forme le radical neutre très réducteur, TPrA^\bullet . Celui-ci réduit $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$, qui réagit finalement avec $\text{TPrA}^{\bullet+}$ pour générer l'état excité. La formation du cation radical $\text{TPrA}^{\bullet+}$ a été montrée par spectroscopie de résonance de spin électronique dans l'eau. La durée de vie estimée de l'espèce est relativement longue, $t_{1/2} \sim 0,2$ ms.^[344] Cependant, il n'y a pas de preuve électrochimique de formation de $\text{TPrA}^{\bullet+}$. En effet, même en voltampérométrie rapide (1000 V/s), aucune vague de réduction de $\text{TPrA}^{\bullet+}$ n'est obtenue.^[344] Cette absence est expliquée par le fait que l'oxydation de TPrA est un processus

ECE où le courant d'oxydation de TPrA^\bullet compense le courant de réduction de $\text{TPrA}^{\bullet+}$. Cette hypothèse est confortée par des simulations d'expériences SECM-ECL.^[344]

Des expériences plus récentes ont été réalisées dans l'acétonitrile sur électrode de platine.^[345, 355] En changeant de solvant, le but était notamment de s'affranchir de la formation des oxydes qui inhibent l'oxydation directe de TPrA dans l'eau et d'explorer une gamme de potentiel inaccessible dans l'eau. Dans ce cas, pour des concentrations micromolaires de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, l'émission électrochimiluminescente n'est pas observée au niveau de la vague de réduction de TPrA.^[355] Dans cette étude, 2 possibilités sont suggérées : soit le temps de vie de $\text{TPrA}^{\bullet+}$ est nettement plus court dans l'acétonitrile que dans l'eau, soit ce n'est pas un oxydant suffisamment puissant pour oxyder $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ et générer l'état excité. Cependant, le mécanisme dans l'eau devrait être similaire à celui dans l'acétonitrile.^[355]

Dans une autre étude récente, la voltampérométrie cyclique a été utilisée pour étudier le comportement électrochimique de TPrA sur électrode de platine dans l'acétonitrile (ou dans un mélange eau/acétonitrile).^[345] Après l'oxydation de TPrA vers 0,9 V/ECS, une vague réversible et stable est observée vers -1,005 V. Cette valeur est très proche d'autres radicaux similaires à TPrA^\bullet : $E_{1/2} \sim -1,03$ V/ECS pour $(\text{CH}_3)_2\text{NC}^\bullet\text{H}_2$ et $E_{1/2} \sim -1,12$ V/ECS pour $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NC}^\bullet\text{H}(\text{CH}_3)$ formé par photolyse.^[345] Cette vague réversible pourrait donc être la signature électrochimique de TPrA^\bullet . Mais, comme cette valeur est nettement plus anodique que celle du couple $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$, ($E_{1/2} \sim -1,48$ V), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ ne pourrait pas être généré par réduction de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ avec TPrA^\bullet (voir Figure 5). Par contre, la réduction de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ($E_{1/2} \sim -1,06$ V) en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ par cet hypothétique TPrA^\bullet serait possible. Cette hypothèse serait également en désaccord avec des expériences d'extinction d'électrochimiluminescence dans l'eau.^[363] Enfin, ce sujet a été étudié en utilisant la technique des sauts de potentiels rapides sur ultramicroélectrode dans l'eau.^[346, 363] D'après les simulations réalisées, la formation de l'état excité par réaction entre $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ avec $\text{TPrA}^{\bullet+}$ (Figure 5) ne constituerait pas une contribution significative à l'émission.^[346] Il est également montré que l'étape déterminante est la déprotonation du radical cation. En conclusion, le mécanisme n'est pas complètement élucidé, et le rôle de $\text{TPrA}^{\bullet+}$ n'est pas encore clairement établi. De même, il n'existe aucune preuve électrochimique véritable de la formation de TPrA^\bullet .

Bibliographie

- [1] Song, H.-J.; Poo, M.-M. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1999**, *9*, 355-363.
- [2] Mueller, B. K. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 351-388.
- [3] Wightman, R. M.; Runnels, P.; Troyer, K. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *400*, 5-12.
- [4] Amatore, C. In *Physical Electrochemistry*; Rubinstein, I., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1995.
- [5] Amatore, C.; Stulik, K.; Holub, K.; Marecek, V.; Kutner, W. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1483-1492.
- [6] Zoski, C. G. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1041-1051.
- [7] Zoski, C. G.; Simjee, N.; Guenat, O.; Koudelka-Hep, M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 62-72.
- [8] Adams, R. N. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1128.
- [9] Ponchon, J.-L.; Gonon, F.; Cespuaglio, R.; Jouvet, M.; Pujol, J.-F. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1483-1486.
- [10] Gonon, F.; Buda, M.; Cespuaglio, R.; Jouvet, M. *Brain Res.* **1981**, *223*, 69-80.
- [11] Schroeder, T. J.; Janjowski, J. A.; Kawagoe, K. T.; Wightman, R. M.; Lefrou, C.; Amatore, C. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 3077-3083.
- [12] Schroeder, T. J.; Borges, R.; Finnegan, J. M.; Pihel, K.; Amatore, C.; Wightman, R. M. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1061-1068.
- [13] Chen, T. K.; Luo, G.; Ewing, A. G. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3031-3035.
- [14] Amatore, C. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1996**, *323*, 757-771.
- [15] Stamford, J. A.; Justice, J. B. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 359A-363A.
- [16] Clark, R. A.; Zerby, S. E.; Ewing, A. G. In *Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., Rubinstein, I., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1998; Vol. 20, pp 227-294.
- [17] Hochstetler, S. E.; Wightman, R. M. In *Biophysics Textbook*; Bloomfield, V., Ed., 1998.
- [18] Engstrom, R. C.; Weber, M.; Wunder, D. J.; Burgess, R.; Winkquist, S. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 844-848.
- [19] Liu, H.-Y.; Fan, F.-R. F.; Lin, C. W.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3838-3839.
- [20] Bard, A. J.; Fan, F.-R. F.; Kwak, J.; Lev, O. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 132-138.
- [21] Bard, A. J.; Fan, F.-R. F.; Pierce, D. T.; Unwin, P. R.; Wipf, D. O.; Zhou, F. *Science* **1991**, *254*, 68-74.
- [22] Bard, A. J.; Denuault, G.; Lee, C.; Mandler, D.; Wipf, D. O. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 357-363.
- [23] Lee, C.; Kwak, J.; Anson, F. C. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1501-1504.
- [24] Zhou, F.; Unwin, P. R.; Bard, A. J. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 4917-1924.
- [25] Amatore, C.; Szunerits, S.; Thouin, L. *Electrochem. Comm.* **2000**, *2*, 248-253.
- [26] Amatore, C.; Szunerits, S.; Thouin, L.; Warkocz, J. S. *Electrochem. Comm.* **2000**, *2*, 353.
- [27] Wei, C.; Nagy, G.; Toth, K.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1346-1356.
- [28] Horrocks, B. R.; Mirkin, M. V.; Pierce, D. T.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1213-1224.
- [29] Wei, C.; Bard, A. J.; Mirkin, M. V. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 16033-16042.
- [30] Unwin, P. R.; Slevin, C. J. *Langmuir* **1997**, *13*, 4799-4803.
- [31] Unwin, P. R.; Slevin, C. J. *Langmuir* **1999**, *15*, 7361-7371.
- [32] Engstrom, R. C.; Meaney, T.; Tople, R.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2005-2010.

- [33] Küpper, M.; Schultze, J. W. *Electrochim. Acta* **1997**, *42*, 3023-3031.
- [34] Küpper, M.; Schultze, J. W. *Electrochim. Acta* **1997**, *42*, 3023-3031.
- [35] Amatore, C.; Pebay, C.; Scialdone, O.; Szunerits, S.; Thouin, L. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2933-2939.
- [36] Amatore, C.; Szunerits, S.; Thouin, L.; Warkocz, J.-S. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 646-652.
- [37] Amatore, C.; Szunerits, S.; Thouin, L.; Warkocz, J.-S. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *500*, 62-70.
- [38] Batles, N.; Thouin, L.; Amatore, C.; Heinze, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1431-1435.
- [39] Bard, A. J.; Fan, F.-R. R.; Mirkin, M. V. In *Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1994; Vol. 18, pp 243.
- [40] Bard, A. J.; Mirkin, M. V. In *Scanning Electrochemical Microscopy*; Marcel Dekker: New York, 2001.
- [41] Köster, O.; Schuhmann, W.; Vogt, H.; Mokwa, W. *Sensors Actuat. B* **2001**, *76*, 573-581.
- [42] Scott, E. R.; White, H. S.; Phipps, J. B. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1537-1545.
- [43] MacPherson, J. V.; Jones, C. E.; Barker, A. L.; Unwin, P. R. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1841-1848.
- [44] Lee, S.; Zhang, Y.; White, H. S.; Harrell, C. C.; Martin, C. R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6108-6115.
- [45] Liu, B.; Cheng, W.; Rotenberg, S. A.; Mirkin, M. V. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *500*, 590-597.
- [46] Feng, W.; Rotenberg, S. A.; Mirkin, M. V. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4148-4154.
- [47] Hengstenberg, A.; Blöchl, A.; Dietzel, I. D.; Schuhmann, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 905-908.
- [48] Treutler, T. H.; Wittstock, G. *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 2923-2932.
- [49] MacPherson, J. V.; Unwin, P. R. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 550-557.
- [50] Dobson, P. S. W.; J. M. R.; Holder, M. N.; Unwin, P. R.; MacPherson, J. V. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 424-434.
- [51] Bard, A. J.; Cliffel, D. E. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1993-1998.
- [52] Fan, F.-R. F.; Cliffel, D.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2941-2948.
- [53] Oyamatsu, D.; Kanaya, N.; Shiku, H.; Nishizawa, M.; Matsue, T. *Sensors Actuat. B* **2003**, *91*, 199-204.
- [54] Boldt, F.-M.; Heinze, J.; Diez, M.; Petersen, J.; Börsch, M. *Anal. Chem.* **2004**, *74*, 3473-3481.
- [55] McCreery, R. L.; Fleischmann, M.; Hendra, P. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 148-150.
- [56] Chong, C. K.; Shen, C.; Fong, Y.; Zhu, J.; Yan, F.-X.; Brush, S.; Mann, C. K.; Vickers, T. J. *Vibr. Spectrosc.* **1992**, *3*, 35-45.
- [57] Ingle, J. D. J.; Louch, J. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2537-2540.
- [58] McCreery, R. L.; Schwab, S. D. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2199-2204.
- [59] Zhu, J.; Yappert, C. *Appl. Spectro.* **1992**, *46*, 912-918.
- [60] Zhu, Z. Y.; Yappert, C. *Appl. Spectro.* **1992**, *46*, 919-924.
- [61] Greek, L. S.; Schulze, G.; Haynes, C. A.; Blades, M. W.; Turner, R. F. B. *Appl. Opt.* **1996**, *35*, 4086-4095.
- [62] Plaza, P.; Dao, N. Q.; Jouan, M.; Fevrier, H.; Saisse, H. *Appl. Opt.* **1986**, *25*, 3448-3454.
- [63] Lin, J., H.; Hart, S. J.; Kenny, J. E. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3098-3103.
- [64] Wright, A. O.; Pepper, J. W.; Kenny, J. E. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2582-2585.
- [65] Myrick, M. L.; Angel, S. M.; Desiderio, R. *Appl. Opt.* **1990**, *29*, 1333-1344.

- [66] Peterson, J. I.; Fitzgerald, R. V.; Buckhold, D. K. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 62-67.
- [67] Davis, M. D.; Schmidt, J. J. *J. Neuroscience Meth.* **2000**, *99*, 9-23.
- [68] Schwab, S. D.; McCreery, R. L.; Gamble, F. T. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2486-2492.
- [69] Ward, E. H.; Hussey, C. L. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 213-217.
- [70] Brewster, J. D.; Anderson, J. L. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 2560-2566.
- [71] Wolfbeis, O. S. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3269-3284.
- [72] Walt, D. R. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 267-278.
- [73] Tan, W.; Shi, Z.-Y.; Kopelman, R. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2985-2990.
- [74] Cullum, B. M.; Vo-Dinh, T. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 388-393.
- [75] Tan, W.; Kopelman, R.; Barker, S. L. R.; Miller, M. T. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 606A-612A.
- [76] Song, J. M.; Kasili, P. M.; Griffin, G. D.; Vo-Dinh, T. *Anal. Chem.* **2004**, 2591-2594.
- [77] Vo-Dinh, T. *J. Cell. Biochem.* **2002**, *39*, 154-161.
- [78] Lichtman, J. *Pour la Science* **1994**, *204*, 62-67.
- [79] Texier, F.; Servant, L.; Bruneel, J.-L.; Argoul, F. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *446*, 189-203.
- [80] Szunerits, S.; Garrigue, P.; Bruneel, J.-L.; Servant, L.; Sojic, N. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 548-555.
- [81] Reichert, U.; Linden, T.; Belfort, G.; Kula, M.-R.; Thömmes, J. *J. Membrane Sci.* **2002**, *199*, 161-166.
- [82] Yang, X. M.; Ajito, K.; Tryk, D. A.; Hashimoto, K.; Fujishima, A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 7293-7297.
- [83] Liu, G.-K.; Yao, J.-L.; Ren, B.; Gu, R.-A.; Tian, Z.-Q. *Electrochem. Comm.* **2002**, *4*, 392-396.
- [84] Ramsey, J. D.; McCreery, R. L. *J. Electrochem. Soc.* **1999**, *146*, 4076-4081.
- [85] Rey, I.; Bruneel, J.-L.; Grondin, J.; Servant, L.; Lassègues, J.-C. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 3034-3041.
- [86] Rey, I.; Lassègues, J.-C.; Baudry, P.; Majastre, H. *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 1539-1544.
- [87] Amatore, C.; Bonhomme, F.; Bruneel, J.-L.; Servant, L.; Thouin, L. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *484*, 1-17.
- [88] Amatore, C.; Bonhomme, F.; Bruneel, J.-L.; Servant, L.; Thouin, L. *Electrochem. Comm.* **2000**, *2*, 235-239.
- [89] Régis, A.; Hapiot, P.; Servagent-Noinville, S. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2216-2221.
- [90] Qian, W.-J.; Gee, K. R.; Kennedy, R. T. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3468-3475.
- [91] Corcuff, P.; Gonnord, G.; Pierard, G. E.; Leveque, J.-L. *Opt. Expr.* **1996**, *8*, 2-10.
- [92] Ljunglöf, A.; Hjorth, R. *J. Chrom. A* **1996**, *743*, 75-83.
- [93] Kim, H.-B.; Hayashi, M.; Nakatani, K.; Kitamura, N.; Sasaki, K.; Hotta, J.-I.; Masuhara, H. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 409-414.
- [94] Cannan, S.; Macklam, D.; Unwin, P. R. *Electrochem. Comm.* **2002**, *4*, 886-892.
- [95] Day, T. M.; Wilson, N. R.; Macpherson, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16724-16725.
- [96] Heineman, W. R.; Hawkrige, F. M.; Blount, H. N. In *Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1984; Vol. 13, pp 1-113.
- [97] Rudd, E. J. *Thin Sol. Films* **1977**, *43*, 1-39.
- [98] Lee, Y. F.; Kirchoff, J. R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3430-3434.
- [99] Anderson, J. L.; Bowden, E. F.; Pickup, P. G. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 379R-444R.
- [100] Toma, H. E.; Araki, K. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 21-34.
- [101] McCreery, R. L.; Pruiksmas, R. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 2253-2257.
- [102] McCreery, R. L.; Jan, C.-C.; Gamble, F. T. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1763-1765.

- [103] McCreery, R. L.; Jan, C.-C. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2771-2777.
- [104] McCreery, R. L.; Wu, H. P. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2347-2352.
- [105] Deputy, A.; Wu, H.-P.; McCreery, R. L. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 3620-3624.
- [106] Steudel, E.; Posdorfer, J.; Schindler, R. N. *Electrochim. Acta* **1995**, *40*, 1587-1594.
- [107] Posdorfer, J.; Olbrich-Stock, M.; Schindler, R. N. *Electrochim. Acta* **1994**, *39*, 2005-2013.
- [108] Rossi, P.; McCurdy, W.; McCreery, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2524-2529.
- [109] Jan, C.-C.; Lavine, B. K.; McCreery, R. L. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 752-758.
- [110] Harrison, D. J.; Li, X. *Anal. Chem.* **1991**, *63*.
- [111] Lindner, E.; Schneider, B.; Zwickl, T.; Federer, B.; Pretsch, E. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4342-4350.
- [112] Lindner, E.; Gyurcsanyi, R. E. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2132-2139.
- [113] Long, R.; Bakker, E. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *511*, 91-95.
- [114] O'Brien, R. N.; Rosenfield, C. *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 643-647.
- [115] Matysik, J.; Chmiel, J.; Cieszczyk-Chmiel, A. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *195*, 39-50.
- [116] Li, Q.; White, H. S. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 561-569.
- [117] Campbell, D. P.; McCloskey, C. J. In *Optical Biosensors: Present and Future*; Ligler, F. S., Rowe Taitt, C. A., Eds., 2002, pp 277-304.
- [118] Vieil, E.; Lopez, C. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *466*, 218-233.
- [119] Vorotyntsev, M. A.; Lopez, C.; Vieil, E. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *368*, 155-163.
- [120] Pawliszyn, J.; Weber, M. F.; Dignam, M. J.; Mandelis, A.; Venter, R. D.; Park, S.-M. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 236-239.
- [121] Pawliszyn, J.; Weber, M. F.; Dignam, M. J.; Mandelis, A.; Venter, R. D.; Park, S.-M. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 239-242.
- [122] Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1552-1555.
- [123] Plichon, V.; Even, R.; Beiner, G. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *305*, 195-204.
- [124] Kötz, R.; Barbero, C.; Haas, O. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *296*, 37-49.
- [125] Barbero, C.; Miras, M. C.; Kötz, R. *Electrochim. Acta* **1992**, *37*, 429-437.
- [126] Lopez, C.; Mendes Viegas, M. F.; Bidan, G.; Vieil, E. *Synth. Met.* **1994**, *63*, 73-78.
- [127] Deker, F.; Fracastoro-Decker, M. *J. Electroanal. Chem.* **1988**, *243*, 187-191.
- [128] Henderson, M. J.; Hillman, A. R.; Vieil, E.; Lopez, C. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *458*, 241-248.
- [129] Weng, L.; Lu, Y.; Shi, L.; Zhang, X.; Zhang, L.; Guo, X.; Xu, J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2807-2812.
- [130] Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- [131] Pharr, C. M.; Engstrom, R. C.; Tople, R. A.; Bee, T. K.; Unzelman, P. L. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *278*, 119-128.
- [132] Engstrom, R. C.; Pharr, C. M.; Koppang, M. D. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *221*, 251-255.
- [133] Engstrom, R. C.; Johnson, K. W.; Desjarlais, S. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 670-673.
- [134] Engstrom, R. C.; Pharr, C. M.; Bowling, R. J.; McCreery, R. L. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2763-2766.
- [135] Pharr, C. M.; Engstrom, R. C.; Klancke, J.; Unzelman, P. L. *Electroanalysis* **1990**, *2*, 217-221.
- [136] Pantano, P.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2452-2458.
- [137] Hopper, P.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1996-2004.
- [138] Collinson, M. M.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2576-2582.

- [139] Wightman, R. M.; Curtis, C. L.; Flowers, P. A.; Maus, R. G.; McDonald, E. M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9991-9996.
- [140] Maus, R. G.; McDonald, E. M.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4944-4950.
- [141] Engstrom, R. C.; Nohr, P. L.; Vitt, J. E. *Colloid. Surf. A: Physchem. Eng. Aspects* **1994**, *93*, 221-227.
- [142] Oyama, M.; Mitani, M.; Washida, M.; Masuda, T.; Okazaki, S. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *473*, 166-172.
- [143] Szunerits, S.; Tam, J. M.; Thouin, L.; Amatore, C.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4382-4388.
- [144] Szulbinski, W. S. *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *228*, 243-250.
- [145] Kalyanasundaram, K.; Grätzel, M. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *77*, 347-414.
- [146] Krishnan, M.; Zhang, X.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7371-7380.
- [147] Butler, J. M. *J. Electrochem. Soc.* **1984**, *131*, 2185-2190.
- [148] Peter, L. M. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 753-769.
- [149] Schaeberle, M. D.; Morris, H. R.; Turner II, J. F.; Treador, P. J. In *Anal. Chem. News & Features*; American Chemical Society, 1999, pp 175A-181A.
- [150] Schaeberle, M. D.; Karakatsanis, C. G.; Lau, C. J.; Treado, P. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4316-4321.
- [151] Ray, K.; McCreery, R. L. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4680-4687.
- [152] Morris, H. R.; Munroe, B.; Ryntz, R. A.; Treado, P. J. *Langmuir* **1998**, *14*, 2426-2434.
- [153] Pantano, P.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1413-1418.
- [154] Compton, R. G.; Winkler, J.; Riley, D. J.; Bearpark, S. D. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6818-6825.
- [155] Krishna, V.; Ho, Y.-H.; Basak, S.; Rajeshwar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3325-3333.
- [156] Moore, C. M.; Akers, N. L.; Hill, A. D.; Jonhson, Z. C.; Minter, S. D. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1241-1247.
- [157] Engstrom, R. C.; Ghaffari, S.; Qu, H. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2525-2529.
- [158] Bowyer, W. J.; Xie, J.; Engstrom, R. C. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2005-2009.
- [159] Vitt, J. E.; Engstrom, R. C. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1070-1076.
- [160] Fiedler, S.; Hagedorn, R.; Schnelle, T.; Richter, E.; Wagner, B.; Fuhr, G. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 820-828.
- [161] Pereira-Rodrigues, N.; Zurgil, N.; Chang, S.-C.; Henderson, J. R.; Bédoui, F.; McNeil, C. J.; Deutsch, M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2733-2738.
- [162] Kalyanasundaram, K. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, *46*, 159-244.
- [163] Bronk, K. S.; Michael, K. L.; Pantano, P.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2750-2757.
- [164] Woltman, S. J.; Even, W. R.; Weber, S. G. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1504-1512.
- [165] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, Wiley: New York ed.; John Wiley & Sons, Inc. Publishers, 2001.
- [166] Kanoufi, F.; Zu, Y.; Bard, A. J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 210-216.
- [167] Baker, W. S.; Crooks, R. M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10041-10046.
- [168] Deaton, T., University of California at Davis, 1984, Ph.D. dissertation.
- [169] Yuan, P.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2391-2394.
- [170] Gabor, G.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 793-796.
- [171] Tohda, K.; Lu, H.; Umezawa, Y.; Gratzl, M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2070-2077.
- [172] Holland, J. F.; Teets, R. E.; Kelly, P. M.; A., T. *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 706-710.
- [173] Leese, R. A.; Wehry, E. L. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1193-1197.
- [174] Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1751-1758.

- [175] Knight, A. W. *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 47-62.
- [176] Wilson, R.; Akhavan-Tafti, H.; DeSilva, R.; Schaap, A. P. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 1083-1092.
- [177] Dufford, R. T.; Nightingale, D.; Gaddum, L. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 1858-1864.
- [178] Harvey, N. *J. Phys. Chem.* **1929**, *33*, 1456-1459.
- [179] Faulkner, L. R.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6284-6290.
- [180] Crusser, S. A.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 267-275.
- [181] Tokel-Takvoryan, N. E.; Hemingway, R. E.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6582-6589.
- [182] Lee, W.-Y. *Mikrochim. Acta* **1997**, *127*, 19-39.
- [183] Fährnich, K. A.; Pravda, M.; Guilbault, G. G. *Talanta* **2001**, *54*, 531-559.
- [184] Jameison, F.; Sanchez, R. I.; Dong, L.; Leland, J. K.; Yost, D.; Martin, M. T. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1298-1302.
- [185] Richter, M. M. In *Optical Biosensors: Present and Future*; Ligler, F. S., Rowe Taitt, C. A., Eds.; Elsevier Science B.V., 2002, pp 173-205.
- [186] Shi, Y.; Slaterbeck, A. F.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3679-3686.
- [187] Kaval, N.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6334-6340.
- [188] Demaille, C.; Brust, M.; Tsionsky, M.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2323-2328.
- [189] Selzer, Y.; Mandler, D. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2383-2390.
- [190] Miles, D. T.; Knedlik, A.; Wipf, D. O. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1240-1243.
- [191] Zhao, G.; Giolando, D. M.; Kirchhoff, J. R. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2592-2598.
- [192] Dayton, M. A.; Brown, J. C.; Stutts, K. J.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 946-950.
- [193] Zhang, X.; Ogorevc, B. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1646-1651.
- [194] Arbault, S.; Pantano, P.; Jankowski, J. A.; Vuillaume, M.; Amatore, C. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3382-3390.
- [195] Kuhr, W. G.; Barrett, V. L.; Gagnon, M. R.; Hopper, P.; Pantano, P. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 617-622.
- [196] Netchiporouk, L. I.; Shul'ga, A. A.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Olier, R.; Cespeglio, R. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *303*, 275-283.
- [197] Collinson, M. M.; Zambrano, P. J.; Wang, H.; Taussig, J. S. *Langmuir* **1999**, *15*, 662-668.
- [198] Howells, A. R.; Zambrano, P. J.; Collinson, M. M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5265-5271.
- [199] Howell, J. O.; Wightman, R. M. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 3915-3918.
- [200] Bond, A. M.; Fleischmann, M.; Robinson, J. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *172*, 11-25.
- [201] Bartelt, J. E.; Deakin, M. R.; Amatore, C.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2167-2169.
- [202] Ghoroghchian, J.; Sarfarazi, F.; Dibble, T.; Cassidy, J.; Smith, J. J.; Russell, A.; Dunmore, G.; Fleischmann, M.; Pons, S. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2278-2282.
- [203] Amatore, C.; Lefrou, C. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *296*, 335-358.
- [204] Amatore, C.; Lefrou, C. *Portug. Electrochim. Acta* **1991**, *9*, 311-328.
- [205] Amatore, C.; Maisonhaute, E.; Simonneau, G. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *486*, 141-155.
- [206] Amatore, C.; Bouret, Y.; Maisonhaute, E.; Abruna, H. D.; Goldsmith, J. I. *C. R. Chim.* **2003**, *6*, 99-115.
- [207] Andrieux, C. P.; Hapiot, P.; Savéant, J.-M. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 5987-5992.
- [208] Norwall, W. B.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3583-3588.

- [209] Penner, R. M.; Martin, C. R. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2625-2630.
- [210] Ugo, P.; Moretto, L. M.; Vezzà, F. *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 917-925.
- [211] Schönenberger, C.; van der Zande, B. M. I.; Fokkink, L. G. J.; Henny, M.; Schmid, C.; Krüger, M.; Bachtold, A.; Huber, R.; Birk, H.; Staufer, U. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 5497-5505.
- [212] Zheng, M.; Li, G.; Zhang, X.; Huang, S.; Lei, Y.; Zhang, L. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3859-3861.
- [213] Williams, W. D.; Giordano, N. *Rev. Sci. Instrum.* **1984**, *55*, 410-413.
- [214] Ugo, P.; Moretto, L. M.; Bellomi, S.; Menon, V. P.; Martin, C. R. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4160-4165.
- [215] Menon, V. P.; Martin, C. R. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1920-1928.
- [216] Feeney, R.; Kounaves, S. P. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 677-684.
- [217] Fiaccabrino, G. C.; Koudelka-Hep, M. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 217-222.
- [218] Chidsey, C. E.; Feldman, B. J.; Lundgren, C.; Murray, R. W. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 601-607.
- [219] Silva, P. R. M.; El Khakani, M. A.; Chaker, M.; Champagne, G. Y.; Chevalet, J.; Gastonguay, L.; Lacasse, R.; Ladouceur, M. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 249-255.
- [220] Fiaccabrino, G. C.; Tang, X.-M.; Skinner, N.; de Rooij, N. F.; Koudelka-Hep, M. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *326*, 155-161.
- [221] Samuelsson, M.; Armgarth, M.; Nylander, C. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 931-936.
- [222] Wang, J.; Lu, J.; Tian, B.; Yarnitzky, C. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *361*, 77-83.
- [223] Belmont, C.; Tercier, M.-L.; Buffle, J.; Fiaccabrino, G. C.; Koudelka-Hep, M. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *329*, 203-214.
- [224] Thormann, W.; Van den Bosch, P.; Bond, A. M. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2764-2770.
- [225] Sandersen, D. G.; Anderson, L. B. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2388-2393.
- [226] Weber, S. G. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 295-302.
- [227] Belmont-Hébert, C.; Tercier, M.-L.; Buffle, J.; Fiaccabrino, G. C.; De Rooij, N. F.; Koudelka-Hep, M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2949-2956.
- [228] Nolan, M. A.; Kounaves, S. P. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2567-2573.
- [229] Moretto, L. M.; Pepe, N.; Ugo, P. *Talanta* **2004**, *62*, 1055-1060.
- [230] Schwake, A.; Cammann, R. K. *Sensors Actuat. B* **1998**, *46*, 242-248.
- [231] Ross, B.; Cammann, K.; Mokwa, W.; Rospert, M. *Sensors Actuat. B* **1992**, *7*, 758-762.
- [232] Brunetti, B.; Ugo, P.; Moretto, L. M.; Martin, C. R. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *491*, 166-174.
- [233] Kakerow, R.; Manoli, Y.; Mokwa, W.; Rospert, M.; Meyer, H.; Drewer, H.; Krause, J.; Cammann, K. *Sensors Actuat. A* **1994**, *43*, 296-301.
- [234] Morris, R. B.; Franta, D. J.; White, H. S. *Anal. Chem.* **1987**, *91*, 3559-3564.
- [235] Varco Shea, T.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2101-2111.
- [236] Bard, A. J.; Crayston, J. A.; Kittlesen, G. P.; Varco Shea, T.; Wrighton, M. S. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2321-2331.
- [237] Niwa, O.; Morita, M.; Tabei, H. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 447-452.
- [238] Tabel, H.; Takahashi, M.; Hoshino, S.; Niwa, O.; Horiuchi, T. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3500-3502.
- [239] Paul, E. W.; Ricco, A. J.; Wrighton, M. S. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1441-1447.
- [240] Thackeray, J. W.; White, H. S.; Wrighton, M. S. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5133-5140.
- [241] Kittlesen, G. P.; White, H. S.; Wrighton, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7373-7380.

- [242] Amatore, C.; Fosset, B.; Maness, K. M.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2311-2316.
- [243] Fiaccabrino, G. C.; De Rooij, N. F.; Koudelka-Hep, M. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *359*, 263-267.
- [244] Meyer, H.; Drewer, H.; Krause, J.; Cammann, K.; Kakerow, R.; Manoli, Y.; Mokwa, W.; Rospert, M. *Sensors Actuat. B* **1994**, *18*, 229-234.
- [245] Hayashi, K.; Horiuchi, T.; Kurita, R.; Torimitsu, K.; Niwa, O. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 523-529.
- [246] Meyer, H.; Drewer, H.; Gründing, B.; Cammann, K.; Kakerov, R.; Manoli, Y.; Mokwa, W.; Rospert, M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1164-1170.
- [247] Hintsche, R.; Albers, J.; Bernt, H.; Eder, A. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 660-665.
- [248] Jimbo, Y.; Robinson, H. P. C. *Bioelectrochem.* **2000**, *51*, 107-115.
- [249] Nordhausen, C. T.; Maynard, E. M.; Normann, R. A. *Brain Research* **1996**, *726*, 129-140.
- [250] Dias, A. F.; Dernick, G.; Valero, V.; Yong, M. G.; James, C. D.; Craighead, H. G.; Lindau, M. *Nanotechnol.* **2002**, *13*, 285-289.
- [251] Kurita, R.; Tabei, H.; Hayashi, K.; Horiuchi, T.; Torimitsu, K.; Niwa, O. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *441*, 165-174.
- [252] Frebel, H.; Chemnitz, G.-C.; Cammann, K.; Kakerov, R.; Rospert, M.; Mokwa, W. *Sensors Actuat. B* **1997**, *43*, 87-93.
- [253] Nagale, M. P.; Fritsch, I. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2902-2907.
- [254] Henry, C. S.; Fritsch, I. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 550-556.
- [255] Neugebauer, S.; Evans, S. R.; Aguilar, Z. P.; Mosbach, M.; Fritsch, I.; Schuhmann, W. *Anal. Chem.* **2004**, *76*.
- [256] Pyun, C.-H.; Park, S.-M. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 251-256.
- [257] Brewster, J. D.; Anderson, J. L. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 2560-2566.
- [258] Van Dyke, D. A.; Cheng, H.-Y. *Anal. Chem.* **1988**, *60*.
- [259] Kuhn, L. S.; Weber, A.; Weber, S. G. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1631-1636.
- [260] Cohen, C. B.; Weber, S. G. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 169-175.
- [261] Smith, P. J. S.; Haydon, P. G.; Hengstenberg, A.; Jung, S.-K. *Electrochim. Acta* **2001**, *47*, 283-292.
- [262] Lee, Y.; Amemiya, S.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2261-2267.
- [263] Lee, Y.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3626-3633.
- [264] Lee, Y.; Ding, Z.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3634-3643.
- [265] Zu, Y.; Ding, Z.; Zhou, J.; Lee, Y.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2153-2156.
- [266] Maus, R. G.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3993-3998.
- [267] James, P.; Casillas, N.; Smyrl, W. H. *J. Electrochem. Soc.* **1996**, *142*, 3853-3865.
- [268] Shi, G.; Garfias-Mesias, L. F.; Smyrl, W. H. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 2011-2016.
- [269] Wang, H.; Xu, G.; Dong, S. *Electrochem. Comm.* **2002**, *4*, 214-217.
- [270] Van Dyke, D. A.; Cheng, H.-Y. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 633-636.
- [271] Khan, S. S.; Jin, E. S.; Sojic, N.; Pantano, P. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *404*, 213-221.
- [272] Ederth, T. *Langmuir* **2001**, *17*, 3329-3340.
- [273] Marks, R. S.; Novoa, A.; Konry, T.; Kraus, R.; Cosnier, S. *Mat. Sci. Eng. C* **2002**, *21*, 189-194.
- [274] Konry, T.; Novoa, A.; Cosnier, S.; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2633-2639.
- [275] Konry, T.; Novoa, A.; Shemer-Avni, Y.; Hanuka, N.; Cosnier, S.; Lepellec, A.; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1771-1779.
- [276] Szunerits, S.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1718-1723.
- [277] Jin, E. S.; Norris, B. J.; Pantano, P. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 1287-1290.

- [278] Abbou, J.; Demaille, C.; Druet, M.; Moiroux, J. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6355-6363.
- [279] Sun, P.; Zhang, Z.; Guo, J.; Shao, Y. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5346-5351.
- [280] Essaidi, N.; Kottler, V.; Cambriil, E.; Mayeux, C.; Ronarch, N.; Vieu, C. *Appl. Opt.* **1998**, *37*, 609-615.
- [281] Lambelet, P.; Sayah, A.; Pfeffer, M.; Philipona, C.; Marquis-Weibe, F. *Appl. Opt.* **1998**, *37*, 7289-7292.
- [282] Hoffmann, P.; Dutoit, B.; Salathé, R.-P. *Ultramicros.* **1995**, *61*, 165-170.
- [283] Hecht, B.; Sick, B.; Wild, U. P.; Deckert, V.; Zenobi, R.; Martin, O. J. F.; Pohl, D. *W. J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 7761-7774.
- [284] Xiong, H.; Guo, J.; Kurihara, K.; Amemiya, S. *Electrochem. Comm.* **2004**, *6*, 615-620.
- [285] Betzig, E.; Trautman, J. K.; Harris, T. D.; Weiner, J. S.; Kostelak, R. L. *Science* **1990**, *251*, 1468-1470.
- [286] Valaskovic, G. A.; Holton, M.; Morisson, G. H. *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 1215-1228.
- [287] Ohtsu, M. *J. Lightwave Technol.* **1995**, *13*, 1200-1221.
- [288] Maheswari, U. R.; Mononobe, S.; Ohtsu, M. *J. Lightwave Technol.* **1995**, *13*, 2308-2313.
- [289] Pantano, P.; Walt, D. R. *Rev. Sci. Instrum.* **1997**, *68*, 1357-1359.
- [290] Dam, T. H.; Pantano, P. *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, *70*, 3982-3986.
- [291] Liu, Y.-H.; Dam, T. H.; Pantano, P. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *419*, 215-225.
- [292] Pangaribuan, T.; Yamada, K.; Jiang, S.; Ohsawa, H.; Ohtsu, M. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1992**, *31*, L1302.
- [293] Pantano, P.; Walt, D. R. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 2832-2835.
- [294] Fergusson, J. A.; Steemers, F. J.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5618-5624.
- [295] Albert, K. J.; Walt, D. R.; Gill, D. S.; Pearce, T. C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2501-2508.
- [296] Taylor, L. C.; Walt, D. R. *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 132-142.
- [297] Wygladacz, K.; Bakker, E. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *532*, 61-69.
- [298] Lewis, B. G.; Paine, D. C. *MRS Bulletin* **2000**, *25*, 22-27.
- [299] Kuwana, T.; Darlington, R. K.; Leedy, D. W. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 2023-2025.
- [300] Armistead, P. M.; Thorp, H. H. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3764-3770.
- [301] Xu, J.; Zhu, J.-J.; Huang, Q.; Chen, H.-Y. *Electrochem. Comm.* **2001**, *3*, 665-669.
- [302] Fang, A.; Ng, H. T.; Li, S. F. Y. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *00*, 1-7.
- [303] Tomonaga, H.; Morimoto, T. *Thin Solid Films* **2001**, *392*, 243-248.
- [304] Chopra, K. L.; Major, S.; Pandya, D. K. *Thin Solid Films* **1983**, *102*, 1-46.
- [305] Hamberg, I.; Granquist, G. *J. Appl. Phys.* **1986**, *60*, R123-R159.
- [306] Latz, R.; Michael, K.; Scherer, M. *Japan. J. Appl. Phys.* **1991**, *30*, L149-L151.
- [307] Popovich, N. D.; Wong, S.-S.; Yen, B. K. H.; Yeom, H.-Y.; Paine, D. C. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3127-3133.
- [308] Wu, W.-F.; Chiou, B.-S. *Thin Solid Films* **1994**, *247*, 201-207.
- [309] Tahar, R. B. H.; Ban, T.; Ohya, Y.; Takahashi, Y. *J. Appl. Phys.* **1998**, *83*, 2631-2645.
- [310] Slevin, C. J.; Gray, N. J.; Macpherson, J. V.; Webb, M. A.; Unwin, P. R. *Electrochem. Comm.* **1999**, *1*, 282-288.
- [311] Conyers, J. L. J.; White, H. S. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4441-4446.
- [312] Penner, R. M.; Heben, M. J.; Lewis, N. S. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1630-1636.
- [313] Xu, M.; Takano, Y.; Hatano, T.; Kimura, T.; Fujita, D. *Appl. Surf. Sci.* **2003**, *205*, 225-230.
- [314] Powell, C. L.; Jablonski, A.; Werner, W. S. M.; Smekal, W. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *239*, 470-480.

- [315] Wittkamp, M.; Cammann, K.; Amrein, M.; Reichelt, R. *Sensors Actuat. B* **1997**, *40*, 79-84.
- [316] Schneegans, O., Thèse de doctorat, Universités Paris VI, Paris, 1998.
- [317] Ravier, J.; Houzé, F.; Carmona, F.; Schneegans, O.; Saadaoui, H. *Carbon* **2001**, *39*, 314-318.
- [318] Shoup, D.; Szabo, A. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *140*, 237-245.
- [319] Shoup, D.; Szabo, A. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *160*, 19.
- [320] Lee, H. J.; Beriet, C.; Ferrigno, R.; Girault, H. H. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *502*, 138-145.
- [321] Zoski, C. G.; Mirkin, M. V. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1986-1992.
- [322] Martinez, M. A.; Herrero, J.; Abbou, Gutierrez, M. T. *Electrochim. Acta* **1992**, *37*, 2565-2571.
- [323] Amatore, C.; Savéant, J.-M.; Tessier, D. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *147*, 39.
- [324] Morf, W. E.; De Rooij, N. F. *Sensors Actuat. B* **1997**, *44*, 538-541.
- [325] West, A. C. *J. Electrochem. Soc.* **1993**, *140*, 134-139.
- [326] Morf, W. E.; De Rooij, N. F. *Sensors Actuat. B* **1995**, *51*, 89-95.
- [327] Morf, W. E. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *330*, 139-149.
- [328] Beriet, C.; Ferrigno, R.; Girault, H. H. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *486*, 56-64.
- [329] Strohben, W. E.; Smith, D. K.; Evans, D. H. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1709-1712.
- [330] Gueshi, T.; Tokuda, K.; Matsuda, H. *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *89*, 247-260.
- [331] Gueshi, T.; Tokuda, K.; Matsuda, H. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101*, 29-38.
- [332] Amatore, C.; Savéant, J.-M.; Tessier, D. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *146*, 37-45.
- [333] Weisshaar, D. E.; Tallman, D. E.; Anderson, J. L. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1809-1813.
- [334] Sleszynski, N.; Osteryoung, J.; Carter, M. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 130-135.
- [335] Cheng, I. F.; Hiteley, L. D.; Martin, C. R. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 762-766.
- [336] Hulteen, J. C.; Menon, V. P.; Martin, C. R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 4029-4032.
- [337] Amatore, C.; Fosset, B. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4377-4388.
- [338] Leland, J. K.; Powell, M. J. *J. Electrochem. Soc.* **1990**, *137*, 3127-3131.
- [339] Noffsinger, J. B.; Danielson, N. D. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 865-868.
- [340] Richter, M. M. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3003.
- [341] Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; Van Zelewsky, A. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 85-277.
- [342] Caspar, J. V.; Meyer, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5583-5590.
- [343] Zu, Y.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3223-3232.
- [344] Miao, W.; Choi, J.-P.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14478-14485.
- [345] Zhou, M.; Heinze, J.; Borgwarth, K.; Grover, C. P. *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 1241-1243.
- [346] Wightman, R. M.; Forry, S. P.; Maus, R. G.; Badocco, D.; Pastore, P. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19111-19125.
- [347] Pantano, P.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 481A-487A.
- [348] Panova, A. A.; Pantano, P.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1635-1641.
- [349] Szunerits, S.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 886-894.
- [350] Zhao, Y.; Richman, A.; Storey, C.; Radford, N. B.; Pantano, P. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3887-3893.
- [351] Miao, W.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5825-5834.
- [352] Xu, X.-H.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2627-2631.
- [353] Blackburn, G. F.; Shah, H. P.; Kenten, J. H.; Leland, L.; Kamin, R.; Link, A.; Peterman, J.; Powell, M. J.; Shah, A.; Talley, D. B.; Tyagi, S. K.; Wilkins, E.; Wu, T. G.; Massey, R. J. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 1534.

- [354] Bard, A. J.; Whitesides, G. M. In *U.S. Patent*; No 5,221,605, 1993.
- [355] Miao, W.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5379-5386.
- [356] Miao, W.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7109-7113.
- [357] Choi, J.-P.; Bard, A. J. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *541*, 143-150.
- [358] Fukuzumi, S.; Inada, O.; Suenobu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4808-4816.
- [359] Martin, A. F.; Nieman, T. A. *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 479-489.
- [360] Dong, L.; Martin, M. T. *Anal. Biochem.* **1996**, *236*, 344-347.
- [361] Liang, P.; Dong, L. i., Q; Martin, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9198-9199.
- [362] Danowski, K. L.; Pantano, P. *Microchem. J.* **2001**, *70*, 51-61.
- [363] Gross, E. M.; Pastore, P.; Wightman, R. M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8732-8738.
- [364] White, E. H.; Nash, E. G.; Roberts, D. R.; Zafirou, O. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5932-5933.
- [365] Marquette, C. A.; Blum, L. J. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *381*, 1-10.
- [366] Marquette, C. A.; Leca, B. D.; Blum, L. J. *Luminescence* **2001**, *16*, 159-165.
- [367] Leca, B.; Blum, L. J. *Analyst* **2000**, *125*, 789-791.
- [368] Wilson, R.; Kremeskötter, J., Abbou, J., S. D.; Wilkinson, J. S. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 805-810.
- [369] Wilson, R.; Schiffrin, D. J. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *448*, 125-130.
- [370] Steijger, O. M.; Kamminga, D. A.; Brummelhuis, A.; Lingeman, H. *J. Chromatogr. A* **1998**, *799*, 57-66.
- [371] Wang, Y.; Yeung, E. S. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 295-300.
- [372] Dequaire, M.; Limoges, B.; Moiroux, J.; Savéant, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 240-253.
- [373] Limoges, B.; Savéant, J.-M.; Yazidi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9192-9203.
- [374] Laespada, E. F.; Pavon, J. L. P.; Cordero, B. M. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *327*, 253-260.
- [375] Kikuchi, K.; Nagano, T.; Hayakawa, H.; Hirata, Y.; Hirobe, M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1794-1799.
- [376] Wang, P.; Zweier, J. L. *J. Bio. Chem.* **1995**, *271*, 29223-29230.
- [377] Arbault, S.; Pantano, P.; Sojic, N.; Amatore, C.; Best-Belpomme, M.; Sarasin, A.; Vuillaume, M. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 569-579.
- [378] Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, M.; Vuillaume, M. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4171-4179.
- [379] Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; De Oliveira, P.; Erard, M.; Sojic, N.; Vuillaume, M. *Analisis* **2000**, *28*, 506-516.
- [380] Jirka, G. P.; Martin, A. F.; Nieman, T. A. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *284*, 345-349.
- [381] Haapakka, K. E.; Kankare, J. J. *Anal. Chim. Acta* **1982**, *138*, 263-275.
- [382] Sakura, S. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *262*, 49-57.
- [383] Vitt, J. E.; Johnson, D. C.; Engstrom, R. C. *J. Electrochem. Soc.* **1991**, *138*, 1637-1643.
- [384] Knight, A. W.; Greenway, G. M. *Analyst* **1994**, *119*, 879-890.
- [385] Kraft, A.; Timnick; Hennig, H.; Herbst, A.; Heckner, K.-H. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *365*, 191-196.
- [386] Kearney, N. J.; Hall, C. E.; Jewsbury, R. A.; Timmis, S. G. *Anal. Comm.* **1996**, *33*, 269-270.
- [387] Taylor, C. E.; Creager, S. E. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *485*, 114-120.
- [388] Easton, P. M.; Simmonds, A. C.; Rakishev, A.; Egorov, A. M.; Candeias, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6619-6624.
- [389] Bucher, V.; Brunner, B.; Leibrock, C.; Schubert, M.; Nisch, W. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 205-210.

- [390] Bachelot, R.; Ecoffet, C.; Deloeil, D.; Ramsey J.; Royer, P.; Lougnot, D.-J. *Appl. Opt.* **2001**, *40*, 5860-5871.
- [391] Whitesides, G. M. *Small* **2005**, *1*, 172-179.
- [392] Joachim, C. *Nature Materials* **2005**, *4*, 107-109.
- [393] Zhu, Z.; Su, D.; Weinberg, G.; Jentoft, R. E.; Schlögl, R. *Small* **2005**, *1*, 107-110.
- [394] Holt, J. K.; Noy, A.; Huser, T.; Eagleshem, D.; Bakajin, O. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2245-2250.
- [395] Saranin, A. A.; Zotov, A. V.; Kotlyar, V. G.; Kasyanova, T. V.; Utas, O. A.; Okado, H.; Katayama, M.; Oura, K. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1469-1473.
- [396] Kobayashi, Y.; Martin, C. R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3665-3572.
- [397] Harrell, C. C.; Lee, S. B.; Martin, C. R. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6861-6867.
- [398] Zhang, G.; Wang, D.; Möhwald, H. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 143-146.
- [399] Lee, M.; Park, M.-H.; Oh, N.-K.; Zin, W.-C.; Jung, H.-T.; Yoon, D. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6465-6468.
- [400] Kang, M.; Yu, S.; Li, N.; Martin, C. R. *Small* **2005**, *1*, 69-72.
- [401] Scott, R. W. J.; Wilson, O. M.; Crooks, R. M. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 692-704.
- [402] Xi, G.; Yu, S.; Zhang, R.; Zhang, M.; Ma, D.; Qian, Y. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13200-13204.
- [403] Ohno, K.; K., K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2751-2754.
- [404] Garrigue, P.; Delville, M.-H.; Labrugère, C.; Cloutet, E.; Kulesza, P. J.; Morand, J.-P.; Kuhn, A. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 2984-2986.
- [405] Wu, Y.; Livneh, T.; Zhang, Y. X.; Cheng, G.; Wang, J.; Tang, J.; Moskovits, M.; Stucky, G. D. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2337-2242.
- [406] Goplakrishnan, G.; Segura, J.-M.; Stamou, D.; Ramsey J.; Gaillard, C.; Gjoni, M.; Hovius, R.; Schenk, K. J.; Stadelmann, P. A.; Vogel, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4957-4960.
- [407] Yang, H.; Shi, Q.; Tian, B.; Lu, Q.; Gao, F.; Xie, S.; Fan, J.; Yu, C.; Tu, B.; Zhao, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4724-4725.
- [408] Ramanathan, K.; Bangar, M. A.; Yun, M.; Chen, W.; Mulchandani, A.; Myung, N. V. *Nano Lett.* **2004**, *4*.
- [409] Vayssieres, L.; Graetzel, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3666-3670.
- [410] Xia, H.; Narayanan, J.; Cheng, D.; Xiao, C.; Liu, X.; On Chan, H. S. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 12677-12684.
- [411] Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2113-2117.
- [412] Shlyahosvsky, B.; Katz, E.; Xiao, Y.; Pavlov, V.; Willner, I. *Small* **2005**, *1*, 213-216.
- [413] Lin, V. S. Y.; Motesharei, K.; Dancil, K. P. S.; Sailor, M. J.; Ghadiri, M. R. *Science* **1997**, *278*, 840-843.
- [414] Murphy, C. J. *Anal. Chem.* **2002**, *520A*-526A.
- [415] Tokareva, I.; Minko, S.; Fendler, J. H.; Hutter, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15950-15951.
- [416] Clark, H. A.; Hoyer, M.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4831-4836.
- [417] Koo, Y.-E. L.; Cao, Y.; Kopelman, R.; Koo, S. M.; Brasuel, M.; Philbert, M. A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2498-2505.
- [418] Buck, S. M.; Xu, H.; Brasuel, M.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. *Talanta* **2004**, *63*, 41-59.
- [419] Powell, R. L.; Halsey, C. M. R.; Hainfeld, J. F. *Micros. Res. Tech.* **1998**, *42*, 2-12.
- [420] Ebbesen, T. W.; Lezec, H. J.; Ghaemi, H. F.; Thio, T.; Wolff, P. A. *Nature* **1998**, *391*, 667-669.
- [421] Andersen, P. C.; Rowlen, K. L. *Appl. Spectro.* **2002**, *56*, 124A-135A.

- [422] Jiang, P.; McFarland, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3710-3711.
- [423] Wang, X. D.; Graugnard, E.; King, J. S.; Wang, Z. L.; Summers, C. J. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2223-2226.
- [424] Deng, Z.; Mao, C. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1545-1548.
- [425] Binnig, G.; Rohrer, H. *Helv. Phys. Acta* **1982**, *55*, 726-735.
- [426] Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930-933.
- [427] Greene, M. E.; Kinser, C. R.; Kramer, D. E.; Pingree, L. S. C.; Hersam, M. C. *Mat. Sci. Eng. C* **2004**, *64*, 415-434.
- [428] Hsieh, S.; Meltzer, S.; Wang, C. R. C.; Requicha, A. A. G.; Thompson, M. E.; Koel, B. E. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 231-234.
- [429] Novy, L.; Gnecco, E.; Baratoff, A.; Alkauskas, A.; Bennewitz, R.; Pfeiffer, O.; Maier, S.; Wetzel, A.; Meyer, E.; Gerber, C. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2185-2189.
- [430] Abbé, E. *Archiv. Mikros. Anat.* **1873**, *9*, 413.
- [431] Lewis, A.; Taha, H.; Strinkovski, A.; Manevitch, A.; Khatchaturiants, A.; Dekhter, R.; Ammann, E. *Nature Biotech.* **2003**, *21*, 1378-1386.
- [432] Scorsone, E.; Christie, S.; Persaud, K. C.; Simon, P.; Kvasnik, F. *Sensors Actuat. B* **2003**, *90*, 37-45.
- [433] Rowe Taitt, C. A.; Ligler, F. S. In *Optical Biosensors: Present and Future*; Ligler, F. S., Rowe Taitt, C. A., Eds., 2002, pp 57-94.
- [434] Sapsford, K.; Rowe Taitt, C. A.; Ligler, F. S. In *Optical Biosensors: Present and Future*; Ligler, F. S., Rowe Taitt, C. A., Eds., 2002; pp. 95-121.
- [435] Synge, E. *Philos. Mag.* **1928**, *6*, 356.
- [436] Pohl, D. W.; Denk, W.; Lanz, M. *Appl. Phys. Lett.* **1984**, *44*, 651-653.
- [437] Lewis, A.; Isaacson, M.; Harootunian, A.; Murray, A. *Ultramicros.* **1984**, *13*, 227.
- [438] Harris, C. M. *Anal. Chem.* **2003**, *product review*, 223A-228A.
- [439] De Serio, M.; Zenobi, R.; Deckert, V. *Trends in Anal. Chem.* **2003**, *22*, 70-77.
- [440] Novotny, L.; Pohl, D. W.; Hecht, B. *Opt. Lett.* **1995**, *20*, 970-972.
- [441] Zenobi, R.; Deckert, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1746-1756.
- [442] Jahncke, C. L.; Hallen, H. D.; Paeskert, M. A. *J. Raman Spectrosc.* **1996**, *27*, 579-586.
- [443] Hallen, H. D.; Jahncke, C. L. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 655-662.
- [444] Dunn, R. C. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2891-2927.
- [445] Betzig, E.; Chichester, R. J. *Science* **1993**, *262*, 1422.
- [446] Croc, L.; Heine, M.; Cognet, L.; Brickley, K.; Stephenson, F. A.; Lounis, B.; Choquet, D. *Nature Neurosci.* **2004**, *7*, 695-696.
- [447] Kim, J.-M.; Ohtani, T.; Sugiyama, S.; Hirose, T.; Muramatsu, H. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5984-5991.
- [448] Kim, J.-M.; Hirose, T.; Sugiyama, S.; Ohtani, T.; Muramatsu, H. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2091-2097.
- [449] Shi, Y.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4819-4827.
- [450] Schkla, A. D.; Das, A.; van der Boom, M. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3257-3240.
- [451] Ohtsu, M. *Optoelectronics-Devices Technol.* **1995**, *10*, 147.
- [452] Watkins, J. J.; Chen, J.; White, H. S.; Abruna, H. D.; Maisonhaute, E.; Amatore, C. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3962-3971.
- [453] Szabo, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3108.
- [454] Bethe, H. A. *Phys. Rev.* **1944**, *66*, 163-182.
- [455] Bouwkamp, C. J. *Philips Res. Rep.* **1950**, *5*, 321-332.
- [456] Meixner, J.; Andrejewski, W. *Ann. Phys.* **1950**, *6*, 157.
- [457] Novotny, L.; Pohl, D. W.; Regli, P. J. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994**, *11*, 1768-1779.

- [458] Bouwkamp, C. J. *Philips Res. Rep.* **1954**, *5*, 401.
- [459] Petrov, N. I.; Woo, G. M.; Lee, M. B. *J. Microsc.* **2003**, *212*, 169-174.
- [460] Obermüller, C.; Karrai, K.; Kolb, G.; Abstreiter, G. *Ultramicros.* **1995**, *61*, 171-177.
- [461] Novotny, L.; Hafner, C. *Phys. Rev. E* **1994**, *50*, 4094-4106.
- [462] Obermüller, C.; Karrai, K. *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *67*, 3408-3410.
- [463] Shin, D. J.; Chavez-Pirson, A.; Lee, Y.-H. *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 171-173.
- [464] Drezet, A.; Woehl, J. C.; Huant, S. *Europhys. Lett.* **2001**, *54*, 736-740.
- [465] Drezet, A.; Woehl, J. C.; Huant, S. *J. Microsc.* **2001**, *202*, 359-361.
- [466] Shin, D. J.; Chavez-Pirson, A.; Lee, Y.-H. *J. Microsc.* **1999**, *194*, 353-359.
- [467] Seebacher, S.; Osten, W.; Veiko, V. P.; Voznessenski, N. B. *Opt. Lasers. Eng.* **2001**, *36*, 451-473.
- [468] Born, M.; Wolf, E. *Principles of Optics*; Pergamon: London, 1959.
- [469] Drezet, A.; Nasse, M. J.; Huant, S.; Woehl, J. C. *Europhys. Lett.* **2004**, *66*, 41-47.
- [470] Zenhausern, F.; O'Boyle, M. P.; Wickramasinghe, H. K. *Science* **1995**, *249*, 1083.
- [471] Bachelot, R.; Gleyzes, P.; Boccara, A. C. *Appl. Opt.* **1997**, *26*, 2160-2170.
- [472] Furukawa, H.; Kawata, S. *Opt. Comm.* **1998**, *148*, 221-224.
- [473] Sanchez, E. J.; Novotny, L.; Xie, X. S. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 4014.
- [474] Novotny, L.; Sanchez, E. J.; Xie, X. S. *Ultramicros.* **1998**, *71*, 21.
- [475] Zenhausern, F.; O'Boyle, M. P.; Wickramasinghe, H. K. *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *65*, 1623.
- [476] Hudlet, S.; Aubert, S.; Bruyant, A.; Bachelot, R.; Adam, P.-R.; Bijeon, J.-L.; Lérondel, G.; Royer, P.; Stashkevich, A. A. *Opt. Comm.* **2004**, *230*, 245.
- [477] Fragola, A.; Aigouy, L.; Mignotte, P. Y.; Formanek, F.; De Wilde, Y. *Ultramicros.* **2004**, *101*, 47.
- [478] Bozhevolnyi, S.; Vohnsen, B. *J. Opt. Soc. Am. B* **1997**, *14*, 1656-1663.
- [479] Atia, W. A.; Pilevear, S.; Güngör, A.; Davis, C. C. *Ultramicros.* **1998**, *71*, 379-382.
- [480] Müller, R.; Lienau, C. *J. Microsc.* **2000**, *202*, 339-346.
- [481] von Freymann, G.; Wegener, M.; Schimmel, T. *Surf.Interface Anal.* **1999**, *27*, 499-502.
- [482] Bachelot, R.; H'Dhili, F.; Barchiesi, D.; Lerondel, G.; Fikri, R.; Royer, P.; Landraud, N.; Peretti, J.; Chaput, F.; Lampel, G.; Boilot, J.-P.; Lahli, K. *J. Appl. Phys.* **2003**, *94*, 2060-2072.
- [483] Protasenko, V. V.; Gallagher, A. C. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1329-1332.
- [484] Minne, S. C.; Flueckiger, P.; Soh, H. T.; Quate, C. F. *J. Vac. Sci. Technol. B* **1995**, *13*, 1380.
- [485] Tsukamoto, S.; Siu, B.; Nakagiri, N. *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*, 1767.
- [486] Hsu, C.-H.; Lo, H.-C.; Chen, C.-F.; Wu, C. T.; Hwang, J.-S.; Das, D.; Tsai, J.; Chen, L.-C.; Chen, K.-H. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 471-475.
- [487] Jung, M. Y.; W., K. D.; Choi, S. S. *Microelectro. Eng.* **2000**, *53*, 399-402.
- [488] Sun, S.; Chong, K. L.; Leggett, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2414-2415.
- [489] Kurihara, K.; H., O.; Iwasaki, Y.; Tobita, T.; Niwa, O.; Suzuki, K. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, i433-i436.
- [490] Kurihara, K.; H., O.; Iwasaki, Y.; Niwa, O.; Tobita, T.; Suzuki, K. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *523*, 165-170.
- [491] Gerardi, R. D.; Barnett, N. W.; Jones, P. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *388*, 1-10.
- [492] Bach, C. E.; Nichols, R. J.; Beckmann, W.; Meyer, H.; Schulte, A.; Besenhard, J. O.; Jannakoudakis, P. D. *J. Electrochem. Soc.* **1993**, *140*, 1281.
- [493] Anderson, J. E.; Technical Memorandum, Fiber Optics: Theory and Application; Burle Technologies, Inc., 2001.
- [494] Lacroix, S.; <http://opt-fibres.phys.polymtl.ca>, 1995.

- [495] Peterson, J. I.; Goldstein, S. R.; Fitzgerald, R. V.; Buckhold, D. K. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 864-869.
- [496] Saari, L. A.; Seitz, W. R. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 821-823.
- [497] Biran, I.; Walt, D. R. In *Optical Biosensors: Present and Future*; Ligler, F. S., Rowe Taitt, C. A., Eds., 2002, pp 5-56.
- [498] Katzir, A. In *Lasers and Optical Fibers in Medicine*; Academic Press, I., Ed., 1993, pp 141-155.
- [499] Mogi, M.; Yoshimura, K. *Proc. SPIE* **1989**, *1067*, 172-181.
- [500] Hirschowitz, B. I.; Curtiss, L. E.; Peters, C. W.; Polland, H. M. *Gastroenterology* **1958**, *35*, 50-53.
- [501] Koschwanetz, J.; Holl, M.; Marquardt, B.; Dragavon, J.; Burgess, L.; Meldrum, D. *Rev. Sci. Instrum.* **2004**, *75*, 1363-1365.
- [502] Knittel, J.; Schnieder, L.; Buess, G.; Messerschmidt, B.; Possner, T. *Opt. Comm.* **2001**, *188*, 267-273.
- [503] Michael, K. L.; Taylor, L. C.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2766-2773.
- [504] Göbel, W.; Kerr, J. N. D.; Nimmerjahn, A.; Helmchen, F. *Opt. Lett.* **2004**, *29*, 2521-2523.
- [505] Ghigusa, Y.; Fujiwara, K.; Hattori, Y.; Matsuda, Y. *Optoelectronics - Devices and Technol.* **1986**, *1*, 203-216.
- [506] Barnard, S. M.; Walt, D. R. *Nature* **1991**, *353*, 338-3440.
- [507] Li, L.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3746-3752.
- [508] Healey, B. G.; Li, L.; Walt, D. R. *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 521-529.
- [509] Dickinson, T. A.; Michael, K. L.; Kauer, J. S.; Walt, D. R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2192-2198.
- [510] Crosby, G. A. *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 231-238.
- [511] Lytle, F. E.; Hercules, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 253-257.
- [512] Kober, E. M.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 3967-3977.
- [513] Ghosh, P. K.; Brunshwig, B. S.; Chou, M.; Creutz, C.; Sutin, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4772-4783.
- [514] Tokel, N. E.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2362.

Résumé

Mes travaux de recherche portent sur le développement de stratégies originales d'imagerie chimique de micro-environnements. Elles sont basées sur l'utilisation de faisceaux cohérents de fibres optiques associés aux méthodes de l'électrochimie. Dans un premier temps, nous avons développé une méthode d'imagerie dynamique des profils de concentration d'une couche de diffusion plane. Dans un second temps, nous avons réalisé un réseau ordonné de nanocapteurs transparents à la surface d'un faisceau de fibres optiques. Ce réseau aux propriétés opto-électrochimiques est notamment adapté à l'imagerie électrochimiluminescente à distance de composés d'intérêt bioanalytique. Une autre voie de recherche est orientée vers la fabrication et l'utilisation en microscopie à champ proche optique de réseaux de nano-ouvertures de dimension sub-longueur d'onde. Ces travaux sont notamment orientés vers le développement de réseaux de biocapteurs pour l'imagerie en milieu biologique.

Mots Clés

Imagerie chimique, réseau, ultramicroélectrode, nano-capteur optique, fluorescence, électrochimiluminescence, profils de concentration.

Abstract

My research interests are focused on the development of novel strategies for chemical imaging of micro-environments. This work uses a combination of different analytical concepts such as optical fiber bundle, electrochemistry or probe microscopies. On one hand, we developed a new method for remote epifluorescence imaging of dynamic planar-diffusion concentration profiles with micrometric resolution. On the other hand, we described the preparation of ordered opto-electrochemical arrays based on etched optical fiber bundle. According to different surface nano-architectures created at one extremity of the bundle, we prepare either a transparent nanosensors array and an optical gold nano-aperture array. Presented applications are focused on the development of biosensor arrays using redox fluorescence or electrochemiluminescence for remote chemical imaging. Nano-aperture arrays can be used as potential probes for the near-field optical microscopy or to combine the near-field optics with electrochemistry.

Keywords

Chemical imaging, array, ultramicroelectrode, optical nanoprobe, fluorescence, electrochemiluminescence, concentration profiles.