



THÈSE

PRÉSENTÉE A
L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par Catherine Adam
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR
SPÉCIALITÉ : Chimie-Physique

**Réseaux nanostructurés de fibres optiques pour la réalisation de capteurs
électrochimiques et luminescents**

Soutenue le : 29.11.2013

Devant la commission d'examen formée de :

MIOMANDRE Fabien

PIRO Benoît

UGO Paolo

McCLENAGHAN Nathan D.

SOJIC Neso

Maître de conférences, ENS Cachan

Professeur, Université Paris 7

Professeur, Università Ca' Foscari, Venezia

Directeur de recherche, CNRS, Université Bordeaux 1

Professeur, ENSCBP, Université Bordeaux 1

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président

Directeur de thèse

C'est en se moquant de l'assentiment de la réalité et des tristes usages que l'on élargit le monde.

Alexandre Jardin, *Les Coloriés*

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont issus du travail de thèse réalisé au sein du groupe NSysA (Nanosystèmes Analytiques) de l'ISM (Institut des Sciences Moléculaires) à l'Université de Bordeaux 1, sous la direction du Pr. Neso Sojic.

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ces travaux : Fabien Miomandre et Benoît Piro en tant que rapporteurs, Paolo Ugo en tant qu'examineur et Nathan McClenaghan en tant que Président.

Je souhaite remercier vivement le grand chef, Neso, de m'avoir permis d'embarquer dans le navire et de m'avoir fait confiance pendant ces trois ans. Tu m'as permis de travailler dans les meilleures conditions et donné l'opportunité de participer à de nombreuses collaborations nationales et internationales, qui ont toutes été très enrichissantes. Merci aussi pour ton exigence qui m'aura poussée à donner le meilleur et m'a permis d'évoluer et d'apprendre énormément en trois ans !

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler : l'équipe de M. Schmittel, et plus particulièrement Qinghai et Kun, pour les travaux réalisés ensemble à Bordeaux et à Siegen ; Emeline et Thierry du LAAS pour les quelques instants partagés autour de la bioplume ; Mathieu Etienne et Yannick pour m'avoir fait découvrir la SECM et le Shearforce ; F. Paolucci et Giovanni pour mon expérience bolognaise et pour finir l'équipe du professeur J. Lacour pour les travaux sur les acridiniums.

J'en viens à notre super équipe, la NSysA family. Un grand merci à Patrick, pour les 398658 fibres etchées et pour toute l'énergie que tu déploies à chaque « Paaat !! ça marche pas !! ». Bertrand, je te remercie pour toutes les heures de séances confocales et pour ton humour particulier. Je remercie Aline, pour la touche poétique que tu apportes dans ce monde de brutes. J'adresse aussi toute ma gratitude à Laurent Bouffier pour les différents travaux réalisés ensemble, mais également pour ta précision scientifique et ta capacité à transmettre et partager ton savoir. Un grand merci à Dodzi, pour toutes les discussions scientifiques, mais aussi pour tes critiques constructives qui nous ont permis d'avancer et d'évoluer. Je souhaite également remercier tous les membres permanents du labo : Stéphane, Alexander, Valérie et Véronique qui ont tous contribué à notre enrichissement personnel et scientifique au cours de ces trois ans.

J'en arrive maintenant à tous les étudiants de passage (plus ou moins long) au NSysA, en espérant n'en oublier aucun. Pour commencer, Suresh et Salem, mes deux acolytes qui sont devenus plus que des collègues, de vrais amis, des grands frères même ! Merci également à Zahra, la plus sage de la génération 2010-2013. Un grand merci à Milena, de m'avoir accueillie et guidée lors de mes premiers pas et pour ta bonne humeur à toute épreuve. Merci aux anciens : Gabi le grand frère, Matthias le casse bonbons, Lisa la deuxième maman, Laurent le casse bonbons aussi, Léa pour le coaching sportif et pour son soutien apporté surtout sur la dernière ligne droite, Yémima dans son rôle de tata Yémi. Merci aussi à ceux qui ont pris la relève, Florent, Milica et Aleks. Hvala à la team serbe pour leur énergie, pour les cours de Serbe et pour les soirées « typically freeeeeeench ». Je tiens également à remercier Maria, la B-sister, Nina pour ta folie et ton aide scientifique aussi parfois, Damla, la

sis-sis ! Merci à la Nsysa d-team, Jérôme, mon frère de binouze et Eugenio (prend soin du chalet) ! Kopunkah à la team thaï : Jah, Ple et Pum qui nous ont bien confirmé que leur pays était le pays du sourire ! Je remercie également les nouveaux : Damien et Pascal qui, j'en suis sûre, vont prendre la relève pour motiver les troupes ! Un remerciement tout particulier à Romain, le dico des synonymes, pour avoir été d'une aide incommensurable pendant la rédaction ! Merci également à Manu, Enikö, Serena, Lorenzo, Michaël, Kerry, Emeline, Naira et les stagiaires : Lou, Jonathan, Alex...

Je souhaite également remercier mes parents qui ont su m'offrir des racines et des ailes. Merci également au reste de la famille avec une mention spéciale pour sista Lélé. Merci aussi aux amis bordelais, qui ont rythmé ces trois ans : Robin, Juju et Alice, Hélène et Hélène, Ced et Chax... Un remerciement tout particulier à Kalou pour avoir été ma deuxième famille et m'avoir permis de survivre pendant la rédaction. Je remercie aussi les non-bordelais pour leur soutien malgré la distance : Ophélie qui m'a toujours remotivée dans les moments de doutes, Sylvia pour sa spontanéité, le canyoning et les lasagnes. Merci à la tortue et puis à Ray. Merci à Nanou et Tony, des vrais amis pour la vie comme on dit. Merci à Simon pour le défouloir et Adeline pour les moments de folie partagés. Et puis sans oublier, merci à Nicole pour toutes les péripéties.

Je ne finirai pas sans remercier celui qui m'a donné des ailes, même si cette aventure nous aura éloignés, je n'en serais pas là sans ton soutien.

Table des matières

Liste des abréviations.....	4
Introduction générale.....	5
<u>Chapitre 1 : Réseaux de fibres optiques et électrochimiluminescence pour la conception de capteurs</u>	
I. Fibres optiques.....	11
I.1. Généralités sur les fibres optiques	11
I.1.1. Historique	11
I.1.2. Principe de fonctionnement.....	12
I.2. Structuration des réseaux de fibres optiques	14
I.2.1. Réseaux de fibres optiques.....	14
I.2.2. Dissolution chimique sélective.....	15
I.2.3. Différentes géométries obtenues par attaque chimique	16
II. Electrochimie sur fibre optique	20
II.1. Réalisation d' « électroptodes »	20
II.1.1. Métallisation.....	20
II.1.2. Comportement électrochimique	21
II.1.3. Electropolymérisation	22
III. Electrochimiluminescence (ECL)	24
III.1. Présentation de l'électrochimiluminescence.....	25
III.2. Différents modes de génération de l'ECL	26
III.2.1. Génération d'ECL par annihilation.....	26
III.2.2. Utilisation de coréactifs pour la génération d'ECL.....	28
III.2.3. Système ECL modèle : $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ et la Tripropylamine (TPrA)	29
III.3. Applications de l'ECL.....	30
III.4. ECL sur réseaux de fibres optiques.....	33
IV. Capteurs sur fibres optiques.....	34
IV.1. Généralités sur les capteurs.....	34
IV.2. Biocapteurs sur fibres optiques.....	36
IV.3. Capteurs chimiques sur fibres optiques.....	39
IV.4. Analyses multiplexées	40

Chapitre 2 : Conception d'un capteur fluorescent sur réseau de fibres optiques pour la détection de Hg^{2+}

I.	Détection du Mercure.....	49
I.1.	Généralités, pollution et contrôle.....	49
I.2.	Méthodes de détection et de quantification du mercure	53
I.2.1.	Sondes biologiques	53
I.2.2.	Sondes chimiques	56
I.2.3.	Capteurs sur fibres optiques	60
II.	Détection de Hg^{2+} par les dérivés de la rhodamine	62
II.1.	Dérivés de la rhodamine spirocyclique	62
II.2.	Réalisation du capteur sur fibre optique.....	65
II.2.1.	Présentation du système	65
II.2.2.	Détection de Hg^{2+} en solution	66
III.	Fonctionnalisation sur le réseau	69
III.1.	Silanisation.....	69
III.2.	Photodéprotection et couplage avec la sonde	73
IV.	Détection sur le réseau.....	75

Chapitre 3 : Polymère électrochimiluminescent aux propriétés modulables pour la détection de Hg^{2+} à distance

I.	Détection de cations par électrochimiluminescence	86
I.1.	Présentation des éthers couronnes	86
I.2.	Sondes inorganiques	90
I.2.1.	Propriétés spectroscopiques	90
I.2.2.	Propriétés électrochimiques	93
I.3.	Détection de cation par ECL	94
I.4.	Laboratoire sur molécule.....	98
II.	Immobilisation de la sonde par électropolymérisation	100
II.1.	Généralités	100
II.2.	Electropolymérisation des complexes 1,2 et 3.....	103
II.3.	Transparence du film.....	106
II.4.	Electropolymérisation des complexes 1, 2 et 3 sur réseaux de fibres optiques	110
III.	Génération de l'ECL sur le réseau et détection de Hg^{2+}	114
IV.	Etude préliminaire pour la conception d'un capteur multianalyte	117
IV.1.	Polymère présentant des groupements photolabiles.....	117
IV.2.	Photodéprotection et fonctionnalisation globale de la plaque d'ITO.....	119
IV.3.	Photodéprotection et fonctionnalisation localisée.....	122

Chapitre 4 : Approche basée sur l'étude des forces de cisaillement pour la conception d'un réseau de nanoélectrodes collectives

I.	Microélectrodes, réseau de nanoélectrodes et SECM.....	130
I.1.	Microélectrodes	130
I.1.1.	Historique et terminologie.....	130
I.1.2.	Propriétés des microélectrodes	131
I.2.	Microscopie électrochimique (SECM)	132
I.3.	Positionnement basé sur l'étude des forces de cisaillement (Shearforce)	134
I.4.	Réseaux de micro-électrodes et de nano-électrodes	136
II.	Conception du réseau de nanoélectrodes	140
II.1.	Stratégie employée	140
II.2.	Positionnement du réseau dans la matrice de PDMS	143
II.3.	Dépôt de la peinture électrophorétique.....	146
Conclusion générale.....		153
Section expérimentale.....		157
Liste des publications.....		169

Liste des abréviations

Abréviations générales :

CCD	Dispositif à transfert de charge (<i>charged coupled device</i>)
HOMO	Orbitale la plus haute occupée (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
LUMO	Orbitale la plus basse vacante (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MLCT	Transfert de charge du métal vers le ligand (<i>metal to ligand charge transfer</i>)
SAM	Monocouche autoassemblée (<i>self assembled monolayer</i>)
u.a.	Unité arbitraire
PMT	Tube photomultiplicateur (<i>photomultiplier tube</i>)

Solvants et produits (chimiques et biologiques) :

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTES	(3-Aminopropyl)triéthoxysilane
CPDT	4 <i>H</i> -cyclopenta[2,1- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dithiophène
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
Fc	Ferrocène
FcdiMeOH	Ferrocène diméthanol
HEPES	Acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-yl]éthanesulfonique
HOBt	Hydroxybenzotriazole
ITO	Oxyde d'indium dopé à l'étain (<i>indium tin oxide</i>)
MeOH	Méthanol
NADH	Nicotinamide adenine dinucléotide
NVOC	Nitrovératryloxy-carbonyl
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate buffer saline</i>)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PVC	Polychlorure de vinyle (<i>Polyvinyl chloride</i>)
Ru(bipy) ₃ ²⁺	Ruthénium tris-2,2'-bipyridine
TPrA	Tri- <i>n</i> -propylamine

Techniques :

AFM	Microscopie à force atomique (<i>Atomic force microscopy</i>)
CD-SECM	Microscopie électrochimique à distance constante (<i>constant distance scanning electrochemical microscopy</i>)
ECL	Electrochimiluminescence (<i>elecrogenerated chemiluminescence</i>)
ELISA	Dosage d'immunosorption liée à une enzyme (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster (<i>Förster resonance energy transfert</i>)
ICT	Transfert de charge intramoléculaire (<i>intramolecular charge transfer</i>)
LIAR	Réponse de l'amplificateur lock-in (<i>lock-in amplifier response</i>)
MEB	Microscopie électronique à balayage
PET	Tranfert d'électron photoinduit (<i>photoinduced electron transfer</i>)
SECM	Microscopie électrochimique (<i>scanning electrochemical microscopy</i>)
SERS	Spectroscopie Raman exaltée de surface (<i>surface-enhanced Raman scattering</i>)
STM	Microscopie à effet tunnel (<i>scanning tunneling microscope</i>)
TEM	Microscopie électronique en transmission (<i>transmission electron microscopy</i>)
VC	voltamétrie cyclique

Introduction générale

Dans de nombreux domaines, le besoin d'analyser de façon quantitative et sélective la composition d'un milieu complexe, a conduit au développement de capteurs de plus en plus performants. Par exemple, la détection d'un polluant à l'état de trace dans l'environnement, ou encore d'une molécule d'intérêt biologique, nécessite la conception de capteurs sensibles et sélectifs. D'autres paramètres importants, tels que la stabilité, le coût et le temps de réponse sont des qualités essentielles pour le développement de ces technologies. La réalisation de capteurs nécessite l'utilisation d'outils facilement fonctionnalisables et capables de transmettre un signal analytique de façon efficace. Les fibres optiques sont communément utilisées dans ce domaine, puisqu'elles permettent de transmettre un signal optique le long de leur axe flexible par réflexion totale interne. Leurs excellentes propriétés de transmission ont été exploitées pour la réalisation de biocapteurs et de capteurs chimiques pour la détection de différents types d'analytes, sous forme gazeuse ou en solution. De plus, leur faible diamètre peut être exploité pour réaliser une analyse à distance dans des milieux inaccessibles, comme par exemple, pour la détection *in vivo* de biomolécules d'intérêt, de façon peu invasive.

Certaines caractéristiques du capteur, comme sa stabilité et le taux de recouvrement de la sonde à sa surface, sont directement influencées par le choix de la méthode de fonctionnalisation qui est un point clé de leur réalisation. Pour immobiliser la sonde à la surface des fibres optiques, plusieurs stratégies ont été envisagées et dépendent de la sonde utilisée, du choix de la méthode de détection et également du milieu d'analyse.

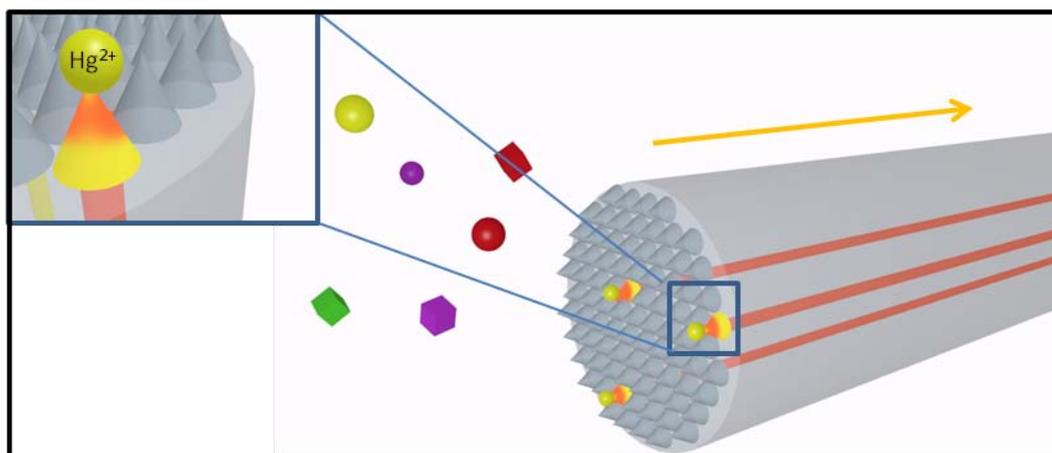
Au cours de cette thèse, des réseaux de fibres optiques, composés de plusieurs milliers de fibres individuelles assemblées de façon cohérente dans un même ensemble, ont été utilisés pour la réalisation de différents capteurs. Chacune des fibres peut transmettre un signal optique et ces réseaux sont donc capables de collecter plusieurs milliers d'informations simultanément. En adressant plusieurs sondes sur un même réseau, la réalisation de capteurs multianalytes, capables de détecter plusieurs espèces lors d'une seule mesure, peut être envisagée. Le développement de tels outils analytiques est un domaine de recherche très actif, puisqu'il répond aux demandes actuelles qui imposent l'analyse multiplexée d'échantillons complexes. De plus, ces réseaux peuvent être structurés en réseaux de nanopointes ou de microcavités en utilisant des procédés de dissolution chimique. L'obtention de ces structures intéressantes repose sur la différence de vitesse de dissolution entre le cœur et la gaine de

chaque fibre dans la solution utilisée. Ces structures trouvent de nombreuses applications et ont été exploitées dans cette thèse pour la réalisation de capteurs chimiques.

La structuration et la fonctionnalisation de ces réseaux ont permis d'élaborer deux capteurs pour la détection du mercure sous sa forme cationique. La recherche dans le domaine des sondes pour la détection et la quantification du mercure est importante, puisque sa forte toxicité nécessite de pouvoir le détecter sélectivement à très faible concentration dans un environnement complexe, où d'autres ions sont présents. La possibilité de le détecter à distance, en utilisant la technologie des fibres optiques, représente une perspective intéressante pour l'analyse d'un milieu pollué ou difficilement accessible.

Les deux capteurs présentés dans cette thèse utilisent deux méthodes de fonctionnalisation et de détection différentes qui ont été choisies en lien avec la sonde employée.

Le premier capteur utilise un dérivé de la rhodamine spirocyclique non fluorescente. En présence de Hg^{2+} , la rhodamine retrouve son aromaticité et un signal lumineux peut alors être mesuré, ce qui permet de quantifier le mercure en solution. Cette sonde a été immobilisée à la surface du réseau par silanisation. Cette méthode permet de fonctionnaliser de façon covalente directement la surface en verre des fibres avec des dérivés de silanes et la force des liaisons Si-O, qui sont alors formées confèrent une très bonne stabilité à ces couches. De plus, la transparence de la couche de silanes est essentielle pour la réalisation de capteurs luminescents sur réseaux de fibres optiques. La réalisation et l'utilisation de ce capteur pour la détection du mercure cationique en solution sont présentées dans le deuxième chapitre de cette thèse.



Une autre stratégie a été utilisée pour la réalisation du deuxième capteur. Celle-ci combine l'électrochimie sur ces réseaux de fibres optiques. Une fine couche conductrice peut

être déposée à la surface du réseau par pulvérisation cathodique, ce qui permet d'obtenir un outil capable de collecter deux signaux simultanément : un signal optique et un signal électrochimique. La fonctionnalisation de ces réseaux métallisés peut alors être réalisée par électropolymérisation. L'électropolymérisation est une méthode de choix pour la réalisation de capteurs, puisqu'elle permet de modifier des substrats conducteurs de façon homogène et contrôlée. De plus, le film de polymère obtenu de cette façon présente de nombreuses qualités : conductivité, stabilité, passivité chimique... La sonde utilisée est un complexe de Ruthénium modifié avec des éthers couronnes capables d'interagir avec le mercure Hg^{2+} en solution. L'utilisation de l'électrochimie sur ces réseaux permet d'envisager également une nouvelle méthode de détection : l'électrochimiluminescence (ECL) qui est la génération d'un état excité luminescent résultant d'une réaction électrochimique initiale. L'intensité du signal ECL de ce complexe est fortement augmentée en présence de mercure, ce qui permet de le détecter et de le quantifier en solution. Le film polymérique obtenu doit être transparent dans le domaine de longueur d'onde du signal ECL, pour permettre de collecter ce signal à distance au travers du réseau de fibres optiques. Le polymère choisi dans le cadre de ce projet présente des propriétés électrochromiques compatibles avec la réalisation de ce capteur. La détection du mercure à distance peut donc être réalisée, grâce aux propriétés modulables du polymère et son utilisation pour la détection du mercure est présentée dans le troisième chapitre de cette thèse.

En perspective à ces travaux, l'utilisation d'un polymère photolabile est envisagée pour la réalisation d'un capteur multianalyte. La photo-déprotection localisée du polymère et la refonctionnalisation avec différentes sondes est une stratégie intéressante pour la réalisation d'un tel capteur.

Dans le dernier chapitre, nous présenterons une nouvelle stratégie pour la préparation d'une sonde SECM (*Scanning ElectroChemical Microscopy*), à partir du réseau de fibres optiques structuré en réseau de nanopointes. L'isolation entre les pointes permet de réaliser un réseau de nanoélectrodes collectives. La stratégie employée dans ces travaux repose sur l'utilisation du positionnement du réseau par l'étude des forces de cisaillement dans une matrice polymère. Le comportement électrochimique du réseau de nanoélectrodes ainsi obtenu est discuté dans ce chapitre. La possibilité d'atteindre un régime stationnaire, comme dans le cas des microélectrodes, permet d'utiliser cette sonde en mode SECM. La création de réseaux denses de nanoélectrodes peut trouver son application, par exemple, pour la structuration de surface de façon parallélisée.

**Chapitre 1 : Réseaux de fibres optiques et
électrochimiluminescence pour la conception
de capteurs**

I.	Fibres optiques.....	11
I.1.	Généralités sur les fibres optiques	11
I.1.1.	Historique	11
I.1.2.	Principe de fonctionnement.....	12
I.2.	Structuration des réseaux de fibres optiques	13
I.2.1.	Réseaux de fibres optiques.....	13
I.2.2.	Dissolution chimique sélective.....	14
I.2.3.	Différentes géométries obtenues par attaque chimique	16
II.	Electrochimie sur fibre optique	19
II.1.	Réalisation d' « électroptodes ».....	19
II.1.1.	Métallisation.....	19
II.1.2.	Comportement électrochimique	21
II.1.3.	Electropolymérisation	22
III.	Electrochimiluminescence (ECL)	24
III.1.	Présentation de l'électrochimiluminescence.....	24
III.2.	Différents modes de génération de l'ECL	25
III.2.1.	Génération d'ECL par annihilation.....	25
III.2.2.	Utilisation de coréactifs pour la génération d'ECL.....	28
III.2.3.	Système ECL modèle : Ru(bipy) ₃ ²⁺ et la Tripropylamine (TPrA)	28
III.3.	Applications de l'ECL.....	30
III.4.	ECL sur réseaux de fibres optiques.....	32
IV.	Capteurs sur fibres optiques.....	34
IV.1.	Généralités sur les capteurs.....	34
IV.2.	Biocapteurs sur fibres optiques.....	36
IV.3.	Capteurs chimiques sur fibres optiques.....	39
IV.4.	Analyses multiplexées	40

Les fibres optiques permettent de transmettre un signal optique le long de leur axe flexible. Elles sont communément utilisées dans les domaines des télécommunications, de l'imagerie médicale, ainsi que dans la réalisation de capteurs. De nos jours des millions de kilomètres de fibres optiques transmettent tous les jours nos communications téléphoniques et Internet. Leurs principaux avantages sont la très faible atténuation du signal et l'immunité face aux perturbations extérieures (conditions climatiques, champs électro-magnétiques...). Les réseaux de fibres optiques sont composés de plusieurs centaines de fibres indépendantes qui sont rassemblées dans le même « câble ». L'utilisation de ces réseaux cohérents permet la division d'une image en « pixels » et ainsi l'acquisition d'une grande quantité d'informations simultanément. Dans ce chapitre, après une introduction présentant quelques généralités sur les fibres optiques, nous discuterons de la structuration et de la fonctionnalisation de ces réseaux permettant la conception de différents types de capteurs biologiques ou chimiques. Nous verrons également l'utilisation combinée de l'électrochimie et des réseaux de fibres optiques, ce qui ouvre la voie à de nouveaux moyens de fonctionnalisation et de détection sur ces réseaux.

I. Fibres optiques

I.1. Généralités sur les fibres optiques

I.1.1. Historique

L'une des premières applications des fibres optiques était de remplacer les systèmes médicaux d'endoscopie. En 1954, H. H. Hopkins introduit le terme de « fibrescope » et propose l'utilisation des fibres optiques pour remplacer les systèmes de l'époque composés de séries de lentilles.¹ Les fibres optiques présentent alors de nombreux avantages par rapport à ces systèmes, comme leur flexibilité, une meilleure qualité d'image et une meilleure efficacité de transmission. Précédemment, le brevet de John Logie Baird en 1927, proposait déjà l'idée de transmettre une image au travers d'un fil de verre flexible.² Les premières fibres optiques possèdent une très forte atténuation (250 dB/km) et ne permettent la transmission du signal que sur une distance de quelques mètres, ce qui empêche leur utilisation dans le domaine des télécommunications.³ Ce n'est qu'en 1966, grâce à la découverte de Charles K. Kao, alors ingénieur de la compagnie anglaise (*Standard Telephones and Cables-STC*), que la qualité des fibres a pu être améliorée. Il a pu identifier que la forte atténuation était due à la présence d'impuretés dans le verre, notamment des métaux lourds.⁴ Cette avancée a permis de diminuer

l'atténuation à une valeur remarquable de 20 dB/km en 1970, ce qui marque le début de l'utilisation des fibres optiques dans le domaine de la communication. Cette découverte a valu à C. K. Kao le prix Nobel de physique en 2009 et le surnom de « parrain du haut débit ». A l'heure actuelle, l'atténuation a pu être diminuée à une valeur inférieure à 0.15 dB/km.³

1.1.2. Principe de fonctionnement

Une fibre optique est en général un « fil » de verre constitué de deux matériaux de compositions différentes, un cœur et une enveloppe (Fig.1.1). Le signal lumineux est transmis d'un bout à l'autre de la fibre par réflexion totale interne dans le cœur. Ce phénomène repose sur la réflexion de la lumière entre deux matériaux d'indices de réfraction différents. Historiquement, les premières expériences sur la transmission de la lumière par réflexion totale interne ont été réalisées en 1840 par Daniel Colladon. « La fontaine lumineuse » (cf. Fig. 1.1a) démontre que l'interface entre les deux milieux (dans ce cas, l'air et l'eau) permet d'agir comme un miroir et ainsi de réfléchir la lumière. Par une série de réflexion à l'intérieur du filet d'eau, la lumière peut être transmise d'un bout à l'autre de la fontaine. Les premières fibres optiques étaient enveloppées d'une couche métallique afin de permettre la réflexion de la lumière. Puis cette couche métallique a été remplacée par une couche d'un matériau de plus faible indice de réfraction, ce qui permettait une meilleure transmission.¹ Dans le cas des fibres optiques actuelles, la différence de composition entre les deux verres formant le cœur et l'enveloppe de la fibre induit la différence d'indice de réfraction. Le signal lumineux est injecté dans le cœur de la fibre et réfléchi à l'interface entre le cœur et l'enveloppe.

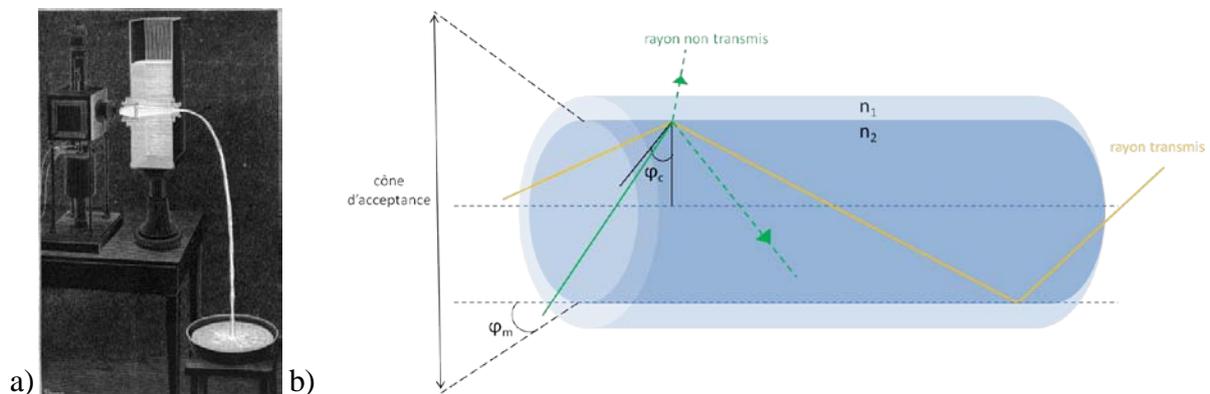


Figure 1.1 : a) fontaine lumineuse de D. Colladon (1840) b) schéma représentant le principe de réflexion totale interne dans une fibre optique

L'indice de réfraction du cœur (n_1) est plus grand que celui de l'enveloppe (n_2).³ Les différents paramètres optiques permettant de décrire le phénomène de transmission par réflexion totale interne sont : l'angle critique, le cône d'acceptance et l'ouverture numérique (Fig. 1.1b). L'angle critique (φ_c) correspond à l'angle d'incidence avec lequel doit arriver la lumière pour être réfléchi par l'interface cœur-enveloppe. Si l'angle d'incidence est supérieur à l'angle critique, la lumière sera totalement réfléchi. Si l'angle d'incidence est inférieur, la lumière sera partiellement réfractée dans l'enveloppe de la fibre. L'angle critique dépend des indices de réfraction du cœur et de l'enveloppe (n_1 et n_2) :

$$\varphi_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1}$$

Le cône d'acceptance (φ_m) représente l'angle par lequel la lumière doit entrer dans la fibre pour pouvoir être transmise par réflexion totale interne. Il dépend des indices de réfraction de la fibre, mais également de l'indice de réfraction du milieu environnant n_0 (par exemple l'air) :

$$\sin \varphi_m = \frac{\sqrt{(n_1^2 - n_2^2)}}{n_0}$$

L'ouverture numérique (NA) correspond, comme le cône d'acceptance, à la capacité de la fibre à collecter la lumière. L'ouverture numérique permet d'exprimer l'efficacité de la fibre à transmettre un signal optique et s'exprime selon l'équation :

$$NA = n_0 \sin \varphi_m$$

Elle peut varier entre 0.2 et 0.7, l'indice le plus fort représentant une fibre de meilleure qualité, c'est-à-dire qui permet de collecter le plus de lumière.

1.2. Structuration des réseaux de fibres optiques

1.2.1. Réseaux de fibres optiques

Les réseaux de fibres optiques sont composés de plusieurs centaines de fibres assemblées de façon cohérente dans un même ensemble (Fig. 1.2). Ils s'inspirent de la construction des yeux de certains insectes. Chaque fibre transfère individuellement une

information sous forme de signal lumineux. L'utilisation de ces réseaux permet donc l'acquisition de plusieurs centaines d'informations simultanément. En 1954, H. H. Hopkins décrivait déjà l'utilisation de ces réseaux pour la transmission d'image au travers du réseau cohérent.¹ Lors de la fabrication de ces réseaux, les fibres assemblées sont maintenues dans un câble, fondues et étirées de telle sorte que chaque fibre garde sa position dans le réseau. La position d'une fibre est conservée d'une extrémité à l'autre, ce qui permet le transfert d'une image. La face proximale est la face par laquelle le signal lumineux est collecté et la face distale correspond à l'autre extrémité du réseau. Les réseaux disponibles commercialement sont composés d'un assemblage de 3 000 à 100 000 fibres pour un diamètre allant jusqu'à 2 mm. La résolution du réseau dépend directement de la distance entre deux cœurs.

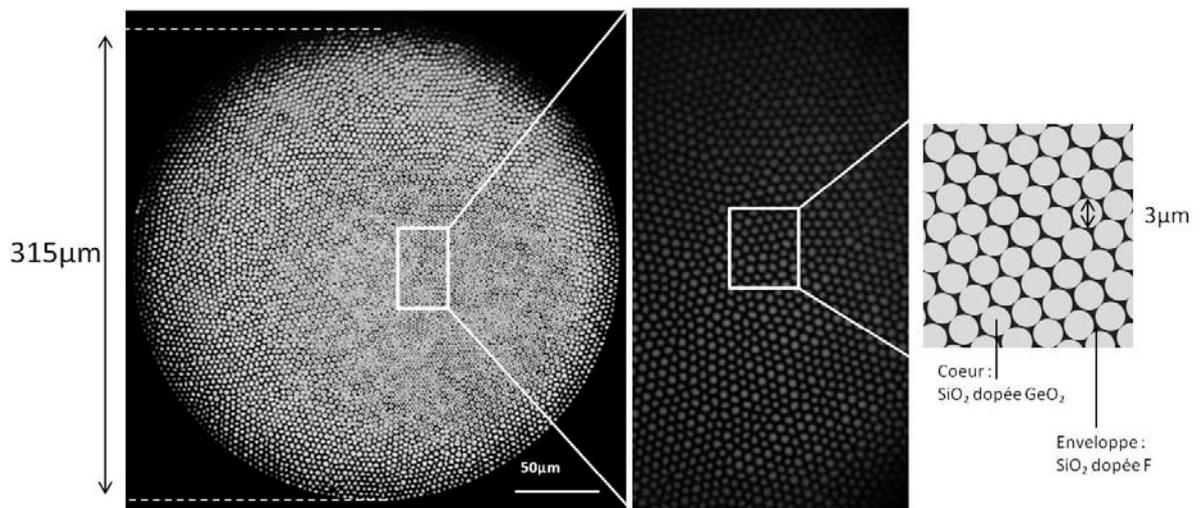


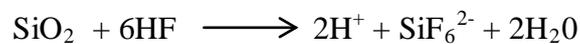
Figure 1.2 : image en lumière blanche d'un réseau de fibres optiques

1.2.2. Dissolution chimique sélective

Les réseaux de fibres optiques permettent également de fabriquer à leur surface des structures variées en utilisant des procédés de dissolution chimique. Ces procédés ont été mis au point tout d'abord sur des fibres optiques uniques, afin de réaliser des sondes d'optique en champ proche.⁵ La microscopie optique en champ proche utilise les ondes évanescentes confinées à la surface de l'objet à analyser et permet d'imager des détails dont la taille est inférieure à la longueur d'onde de la lumière. La conception de sondes de microscopie à champ proche nécessite l'utilisation d'ouvertures inférieures à la longueur d'onde. En 1983, D.R. Turner a déposé un brevet⁶ sur l'utilisation de la dissolution chimique par une solution d'acide fluorhydrique afin d'obtenir des pointes dont la taille du sommet était à l'échelle

nanométrique. Ensuite, le recouvrement des pointes en évitant le sommet, par exemple par un dépôt métallique, permet d'obtenir des sondes optiques avec des ouvertures comprises entre 20 et 500 nm.

La dissolution chimique se décompose en trois étapes : l'adsorption, qui correspond à l'interaction entre l'espèce réactive et la surface, la réaction chimique entre ces deux et la désorption.⁷ La dissolution de la silice est couramment utilisée dans le domaine de la micro-fabrication qui utilise des couches de silice sacrificielles afin de former différentes structures pour des applications diverses.⁷ La silice SiO_2 est composée d'unités tétraogonales SiO_4 , connectées entre elles par des liaisons siloxanes (Si-O) très fortes. Pour dissoudre la silice, ces quatre liaisons doivent être rompues, ce qui peut être réalisé en conditions acides ou basiques.⁷ La dissolution basique, utilisant des solutions d'ions hydroxydes ou carbonates, est peu utilisée. La dissolution acide, quant à elle, a été largement décrite et est très utilisée pour obtenir des structures originales sur les fibres optiques. Le seul acide capable de dissoudre la silice est l'acide fluorhydrique grâce à la forte électronégativité de l'ion fluorure, qui peut interagir avec le silicium pour former des liaisons Si-F assez fortes pour déplacer les liaisons Si-O. La dissolution peut être décrite selon l'équation suivante :



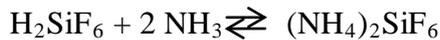
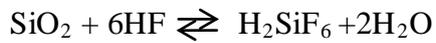
La dissolution de la silice ne se produit pas dans des solutions de NaF ou NH_4F , ce qui indique que F^- seul ne permet pas de dissoudre la silice et que la présence de protons est nécessaire. Il a été démontré que les espèces présentes dans la solution d'acide fluorhydrique et responsables de la dissolution de la silice sont : HF et HF_2^- .⁸ Ces espèces s'adsorbent à la surface de la silice et enrichissent les oxygènes du réseau en densité électronique les rendant plus basiques. Ils vont alors se protoner plus rapidement et favoriser la rupture des liaisons siloxanes. Différentes compositions de solutions peuvent être utilisées pour dissoudre la silice. Les solutions d'acide fluorhydrique concentrées, les solutions tamponnées (abrégiée BHF pour *buffered hydrofluoric acid*) ou alors un mélange d'acide fort et d'acide fluorhydrique.⁷

Ces différentes compositions permettent de faire varier la composition des solutions en molécules HF et HF_2^- et leur pH et donc d'influencer les constantes de vitesse de dissolution. Il a été démontré que la vitesse de dissolution augmente presque linéairement avec la concentration en HF.⁹ L'ajout de NH_4F dans les solutions tamponnées (BHF) permet

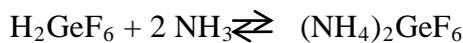
d'augmenter la concentration en HF_2^- , ce qui favorise la dissolution de la silice. Cet effet est limité car à trop haute concentration de NH_4F , HF_2^- peut être complexé et inactivé par NH_4^+ , ce qui ralentit à nouveau la vitesse de réaction. L'addition d'acide fort, quant à elle, augmente également la vitesse de dissolution grâce à l'activité catalytique des protons.⁸

1.2.3. Différentes géométries obtenues par attaque chimique

En 1992, l'équipe de M. Ohtsu¹⁰ décrit la dissolution sélective reposant sur la différence de solubilité du cœur de plus haut indice de réfraction (composé de silice dopée avec un oxyde de germanium GeO_2) et de l'enveloppe (SiO_2). Dans une solution tamponnée, la dissolution de la silice peut être décrite par les réactions :



Dans le cas de la silice dopée au germanium, on peut écrire les réactions suivantes :



La différence de solubilité et donc de vitesse de désorption des composés formés, $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$ et $(\text{NH}_4)_2\text{GeF}_6$, dans la solution d'attaque chimique va induire une différence de vitesse de dissolution. La dissolution de l'enveloppe sera plus rapide que celle du cœur (dopée au germanium) conduisant à la formation de pointes.

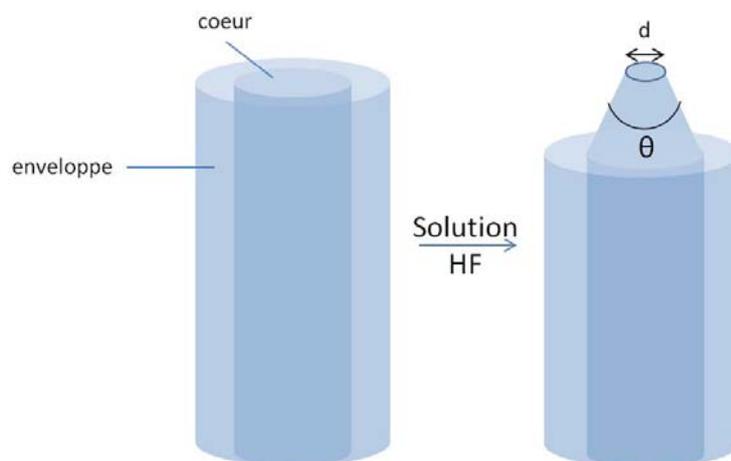


Figure 1.3.: dissolution chimique sélective de la silice

L'équipe de Ohtsu étudie l'influence du ratio de dopant dans le cœur et de la composition de la solution utilisée sur l'angle θ et le diamètre d (cf. Fig. 1.3) de la pointe et ils obtiennent alors une pointe de diamètre 10 nm et d'angle 20° .¹⁰

Lorsque la concentration de NH_4F diminue, la silice pure est moins facilement dissoute mais les liaisons Ge-O peuvent toujours être rompues par l'eau en pH acide. Cela conduit à une dissolution plus rapide du cœur et l'angle sera supérieur à 180° , ce qui conduit à la formation de « micro-cavités ». Il est donc possible de cibler les liaisons Ge-O ou Si-O en changeant la composition de la solution de dissolution et de créer des cavités ou des pointes.¹¹

L'utilisation de ces procédés à l'échelle des réseaux de fibres optiques permet l'obtention de structures originales.

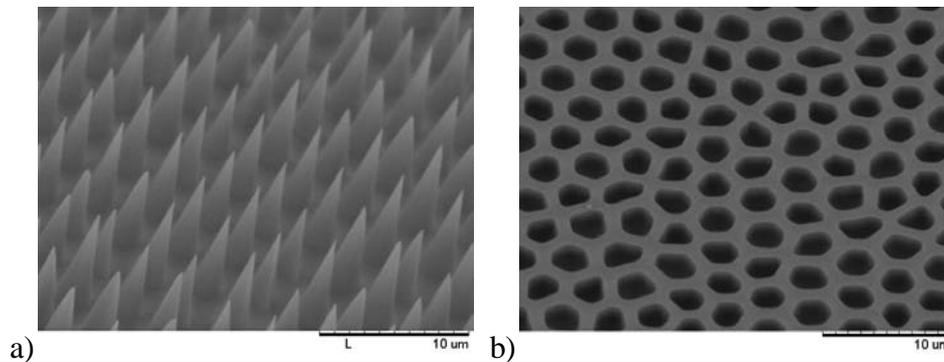
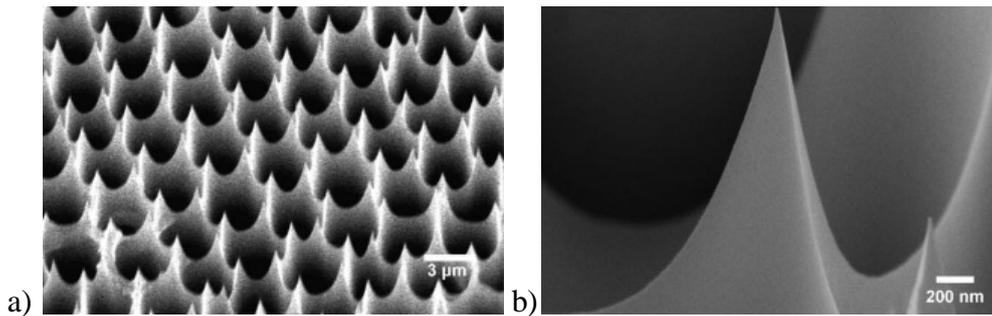


Figure 1.4 : Images en microscopie électronique à balayage d'un réseau de nanopointes (a) et de cavités (b) obtenus par dissolution chimique sélective d'un réseau de fibre optiques

Les images en microscopie électronique à balayage de la figure 1.4 ont été obtenues dans des solutions composées d'un mélange de NH_4F (40%), HF (48%) et H_2O dans différentes proportions. Les pointes ont été obtenues dans une solution 5:1:1 (proportions volumiques en $\text{NH}_4\text{F}:\text{HF}:\text{H}_2\text{O}$) et les cavités dans une solution 1:3:1. Dans cette deuxième solution, on diminue donc la concentration en ion fluorure ce qui va permettre de cibler les liaisons Ge-O plutôt que Si-O et donc induire une vitesse de dissolution plus rapide du cœur que de l'enveloppe et donc créer un réseau de micro-cavités.¹² Ces réseaux de microcavités peuvent également être obtenus en utilisant différentes fibres optiques qui présentent un dopage inverse entre le cœur et l'enveloppe. D.R. Walt utilise par exemple des fibres avec un cœur de silice pure et une enveloppe dopée au germanium afin de créer des micro-cavités.¹³

La première application des microcavités a été de créer des microlentilles afin d'améliorer le couplage entre les diodes laser et les fibres optiques.¹⁴ Leur utilisation a ensuite

été élargie à de nombreuses applications comme par exemple l'immobilisation de billes pour la création de biocapteurs à ADN,¹⁵ ou encore permettre l'étude de cellule unique dans un micro-volume de solution.¹⁶ Les réseaux de nanopointes ont été brevetés en 1997 par D. Walt et P. Pantano¹⁷ et trouvent de nombreuses applications, comme par exemple, la réalisation de sondes nanostructurées pour la microscopie en champ proche¹⁸ ou encore la microscopie SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*).¹⁹



*Figure 1.5 : dissolution chimique d'un réseau de fibres optiques en pointes ultra-fines obtenues à partir du réseaux de cavités pendant un temps de dissolution plus long à différentes échelles a) réseaux de microcavités entourées de pointes ultrafines b) pointe ultrafine seule*²⁰

Un temps de dissolution plus long permet d'obtenir des pointes ultra-fines (Fig. 1.5). Une limitation sur la reproductibilité de ces résultats est l'utilisation des très hautes températures (de l'ordre de 1500 K) lors de la fabrication des réseaux de fibres. Ces hautes températures influencent, en effet, la diffusion des dopants du verre du cœur vers l'enveloppe. L'équipe de Stoddart²¹ a publié une étude qui compare des modèles théoriques et des résultats expérimentaux sur l'influence du degré de diffusion des dopants sur la structure obtenue par dissolution chimique. Ils constatent que les températures plus hautes et donc la diffusion plus importante des dopants va limiter la formation des pointes ultrafines.²¹ La reproductibilité de la structure obtenue par dissolution chimique dépend donc directement des paramètres employés lors de la fabrication des réseaux.

La structure en pointes ultrafines est formée à partir des réseaux de microcavités en utilisant un temps de dissolution plus long. Les pointes sont alors obtenues sur la gaine de chaque fibre. Elles ont été développées pour la microscopie SERS. La microscopie Raman est reliée à l'étude du spectre vibrationnel d'un composé. Ce spectre est caractéristique d'un composé et peut être considéré comme son « empreinte digitale ». La microscopie Raman ne nécessite donc pas de marquer la cible avec un fluorophore. Cependant, cette technique

possède une très faible sensibilité, ce qui limite fortement son utilisation. L'utilisation de surfaces structurées pour la microscopie SERS (comme les réseaux de pointes) permet d'amplifier le signal Raman en modifiant les interactions électromagnétiques et chimiques entre la sonde et la surface.²⁰ L'utilisation des structures en pointes ultrafines est cependant limitée par la capacité de la fibre à transmettre le signal. En effet, la gaine de la fibre ne propage pas le signal lumineux. Une alternative pour la fabrication de sondes SERS, capables de collecter le signal à distance, est l'utilisation de réseau de nanopointes obtenues à partir du cœur de la fibre comme sur la figure 1.4a.^{12,22}

L'efficacité de la transmission de la lumière en fonction de la géométrie de la structure de la fibre a également été étudiée.²³ L'étude de l'intensité du signal collecté au travers du réseau en fonction de l'angle d'incidence ($I(\theta)$) démontre que la formation de pointes réduit le cône d'acceptance caractérisé par l'angle ϕ_m (cf. I.1.2) et donc la capacité de la fibre à collecter le signal optique. Cependant, la formation d'ouvertures de taille nanométrique, comme pour les sondes d'optique en champ proche, permet de transmettre la lumière selon un angle plus grand que les fibres non recouvertes grâce aux phénomènes de diffraction.^{23b}

II. Electrochimie sur fibre optique

II.1. Réalisation d' « électroptodes »

La combinaison de plusieurs méthodes analytiques offre une approche intéressante qui a été développée afin d'atteindre de meilleures performances (sélectivité, sensibilité...). Une approche innovante a été développée en combinant l'électrochimie et l'utilisation des réseaux de fibres optiques. La déposition d'une fine couche d'un matériau conducteur (métal ou semi-conducteur) sur la surface permet d'obtenir un objet capable de collecter simultanément un signal optique et un signal électrochimique. Cette stratégie a permis d'utiliser différentes méthodes pour la fonctionnalisation des réseaux et différentes techniques analytiques pour la détection. Les fibres optiques métallisées sont appelées « électroptodes » en référence aux deux types de signaux qu'elles sont capables de collecter (optique et électrochimique).

II.1.1. Métallisation

Différentes techniques peuvent être utilisées pour déposer une couche métallique à la surface des réseaux : la pulvérisation cathodique magnétron (*magnetron sputtering*), la

pulvérisation radiofréquence (*RF-sputtering*), la pulvérisation par faisceau d'ions ou d'électrons (*ion or electron beam deposition*), la déposition chimique en phase vapeur (*chemical vapor deposition*), la déposition par pyrolyse d'aérosol (*reactive evaporation spray pyrolysis*).²⁴ Nous avons choisi d'utiliser la pulvérisation cathodique pour déposer une fine couche d'or ou d'ITO sur la face distale de nos réseaux. La couche métallique doit permettre le transfert du signal optique et pour cela doit être suffisamment transparente. L'ITO (*Indium Tin Oxide*) est un oxyde d'indium (In_2O_3) dopé à 10% avec un oxyde d'étain (Sn_2O) afin d'améliorer ses qualités électriques. Le dopage avec l'oxyde d'étain va substituer certains atomes d'indium dans le réseau par des atomes d'étain. L'ITO est un semi-conducteur de type *n*, puisque l'étain a une valence plus importante que l'indium et va donc induire un enrichissement en électrons du réseau. La différence d'énergie entre la bande de valence et celle de conduction (*band gap*) de ce matériau est très grande (3.8 eV)²⁴ ce qui lui confère ses propriétés de transparence, dans le domaine visible du spectre électromagnétique. Pour cette raison, l'ITO est le matériau de choix pour la réalisation d' « électrodes ». L'ITO peut être déposé sur des épaisseurs dépassant 100 nm tout en restant transparent. A partir d'une certaine épaisseur, la rugosité de la couche va induire une diffusion de la lumière qui va diminuer la transparence du film.

Une fine couche d'or a pu également être utilisée. Cette couche, lorsqu'elle est déposée avec une épaisseur inférieure à 50 nm, n'empêche pas totalement le passage du signal optique dans le réseau. L'or présente l'avantage de pouvoir être déposé plus facilement que l'ITO (vide moins important, temps de préparation et de dépôt moins longs), mais ne peut pas être déposé sur une épaisseur très importante et pose donc des problèmes de stabilité.

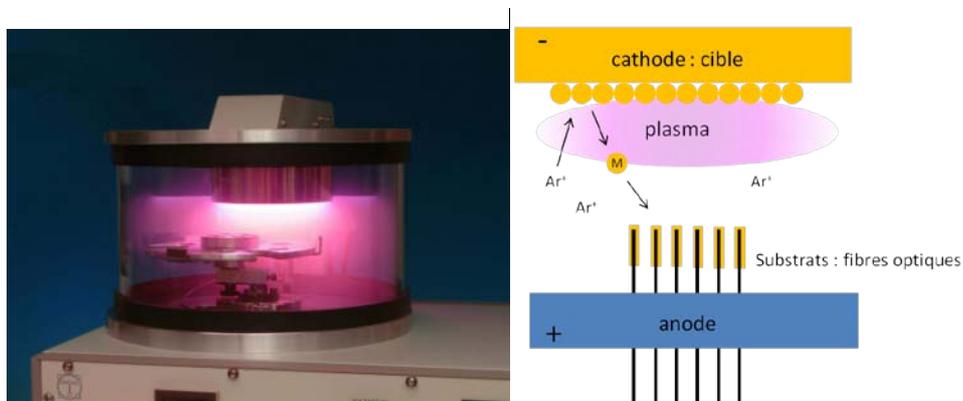


Figure 1.6 : dépôt de couche conductrice par pulvérisation cathodique sur réseau de fibres optiques

La pulvérisation cathodique utilise une cible métallique (cathode) sur laquelle vont être bombardés des atomes de gaz ionisés (Ar^+). Des atomes de métal sont alors arrachés de la cible. On observe la formation d'un plasma violet (*cf.* Fig. 1.6), qui correspond à la formation d'une « vapeur métallique » issue de la cible solide. Les atomes d'or ou d'ITO sont ainsi déposés sur les substrats (c'est-à-dire les réseaux de fibres optiques).

II.1.2. Comportement électrochimique

Les réseaux de fibres optiques sont composés de plusieurs milliers de fibres optiques individuelles et le diamètre total de ces réseaux est de l'ordre de quelques centaines de micromètres (Fig. 1.2). Leur comportement électrochimique se rapproche donc de ceux de microélectrodes. Les microélectrodes présentent de nombreux avantages comparés aux électrodes de taille plus importante, comme l'obtention d'un courant stationnaire, une chute ohmique plus faible et de meilleurs rapports signal sur bruit. Les propriétés électrochimiques de ces réseaux métallisés sont détaillées dans le chapitre 4, où nous proposons une voie de fabrication d'un réseau de nanoélectrodes collectives à partir des réseaux de fibres optiques structurés comme représenté sur la figure 1.7.

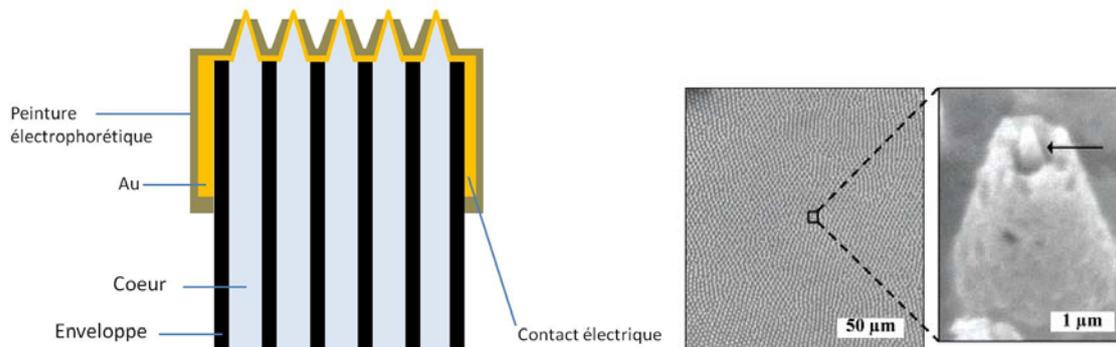


Figure 1.7 : Schéma d'un réseau de nanoélectrodes obtenues à partir d'un réseau de fibres optiques et images en microscopie électronique à balayage du réseau²⁵

Ces réseaux sont obtenus suite à la déposition d'une peinture électrophorétique sur leur surface en évitant le sommet des pointes. Les réseaux de nanoélectrodes ont un comportement électrochimique intéressant qui permet de les utiliser en microscopie électrochimique (SECM - *Scanning Electrochemical Microscopy*) et pour la structuration de surface (*cf.* chapitre 4).

II.1.3. Electropolymérisation

L'un des challenges pour la réalisation de capteurs réside dans l'élaboration de stratégies efficaces pour immobiliser les sondes à la surface d'un support solide. L'utilisation de fibres métallisées permet de fonctionnaliser les réseaux par électropolymérisation. Le polymère est obtenu de façon rapide et reproductible en une seule étape. L'avantage principal de l'électropolymérisation est que l'on peut déposer de façon contrôlée une sonde sur une surface de géométrie complexe. La déposition sera donc possible sur les réseaux structurés en nanopointes.

L'électropolymérisation est une méthode très modulable car elle peut être utilisée pour modifier différents types de matériaux conducteurs (platine, or, carbone, ITO...). Le choix de monomères oxydables (Fig. 1.8a) est très varié ce qui permet de jouer sur les propriétés du film obtenu.²⁶

Ces polymères multifonctionnels offrent de nombreuses propriétés intéressantes pour la réalisation de capteurs (Fig. 1.8b). Par exemple, leur bonne conductivité électrique permet de les utiliser comme capteurs ampérométriques.²⁷ Ils sont également utilisés pour obtenir des structures très originales à l'échelle micrométrique, voire nanométrique.²⁶

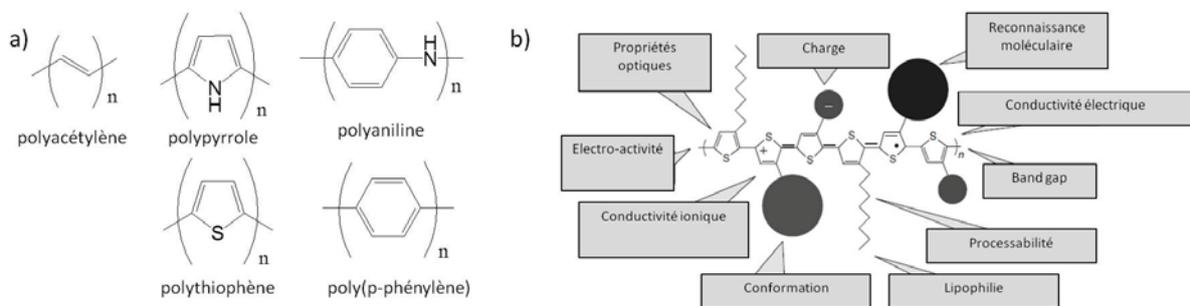


Figure 1.8 : a) Exemples de monomères électropolymérisables b) propriétés intéressantes des polymères conducteurs²⁸

Différents mécanismes ont été décrits dans la littérature pour l'électropolymérisation du pyrrole.²⁹ En bref, l'oxydation du monomère va conduire à la formation de chaînes polymériques qui vont précipiter et s'adsorber à la surface de l'électrode (Fig. 1.9).²⁹ Les propriétés du film vont dépendre du monomère utilisé mais également du contre-ion qui est emprisonné dans le film durant sa formation.³⁰ Le film de polymère obtenu est d'une épaisseur micrométrique et possède de nombreux avantages comme une bonne stabilité chimique et électrochimique.

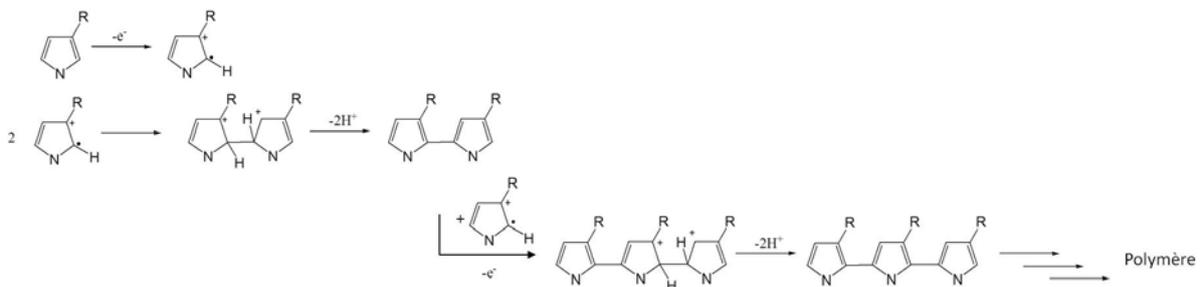


Figure 1.9 : mécanisme de l'électropolymérisation du pyrrole

Le pyrrole est communément utilisé pour l'immobilisation de sondes biologiques par électropolymérisation.^{15, 31} Par exemple, les groupes de R. S. Marks et S. Cosnier ont développé un capteur pour la détection du choléra.³² L'immobilisation de polypyrrole-biotine à la surface d'une fibre optique a pu être réalisée par électropolymérisation de la fonction pyrrole. Le complexe biotine-streptavidine est communément utilisé dans le domaine analytique en raison de la très forte reconnaissance entre ces deux protéines (constante d'affinité 10^{15} M^{-1}).^{33,32,34} Dans cet exemple, la formation de ce complexe permet de détecter une protéine du choléra, qui est ensuite révélée par une réaction de bioluminescence (Fig. 1.10).

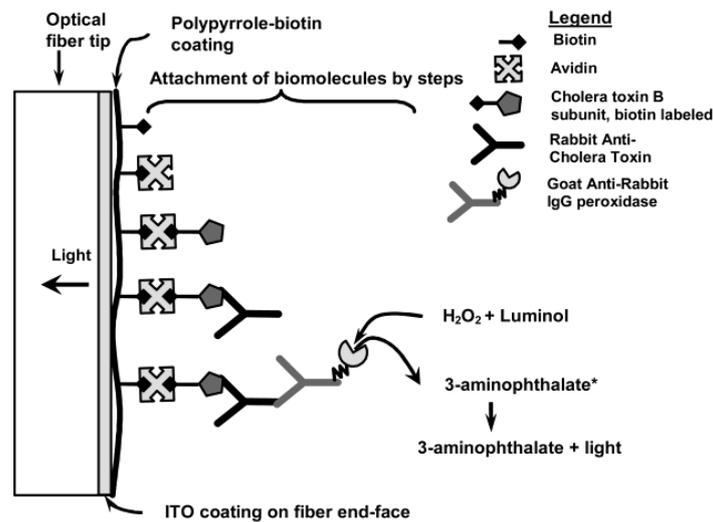


Figure 1.10 : Schéma de biocapteur décrivant les différentes étapes impliquées dans le test immunologique pour la détection de la toxine du choléra utilisant une fibre optique métallisée et fonctionnalisée avec le poly-(pyrrole-biotine)³²

Le pyrrole permet de réaliser des films conducteurs et biocompatibles en solution aqueuse. L'utilisation d'autres polymères comme par exemple le polythiophène permet, entre

autre, de moduler les valeurs de potentiels d'oxydation du monomère.²⁸ Le 4*H*-cyclopenta[2,1-*b*:3,4-*b'*]dithiophène (CPDT) a été utilisé dans le chapitre 3 de cette thèse pour sa bonne stabilité spécialement dans les solvants organiques.³⁵ Les polymères conducteurs sont également de bons électrochromes, c'est-à-dire que leurs propriétés optiques peuvent être modulées par réaction redox. Les propriétés électrochromes du poly-CPDT sont particulièrement intéressantes pour la réalisation de capteur sur fibres optiques, puisque son absorbance dans le domaine du visible peut être diminuée par oxydation. Cet effet et son utilisation dans la réalisation d'un capteur luminescent seront développés plus en détails dans le chapitre 3.

III. Electrochimiluminescence (ECL)

L'utilisation d'« électrodes » permet de modifier le réseau par des méthodes électrochimiques mais cette stratégie permet également d'utiliser des méthodes de détection qui combinent l'électrochimie et les mesures optiques. Par exemple, l'électrochimiluminescence (ECL), consiste en la génération d'un état excité par une réaction électrochimique, suivie de l'émission d'un photon. La luminescence pourra donc être produite sur la face distale de l'électrode puis être collectée à l'autre extrémité par transmission du signal par réflexion totale interne.

III.1. Présentation de l'électrochimiluminescence

L'électrochimiluminescence ou luminescence électrogénérée est « le procédé par lequel des espèces générées à la surface d'une électrode subissent une réaction de transfert d'électrons de haute énergie pour former un état excité qui émettra un photon ».³⁶ L'électrochimiluminescence correspond à la production de lumière par un état excité formé suite à une réaction électrochimique. La combinaison de l'électrochimie et de la luminescence permet de contrôler spatialement et temporellement la génération de l'état excité, puisqu'il est formé *in situ* au voisinage de la surface de l'électrode.

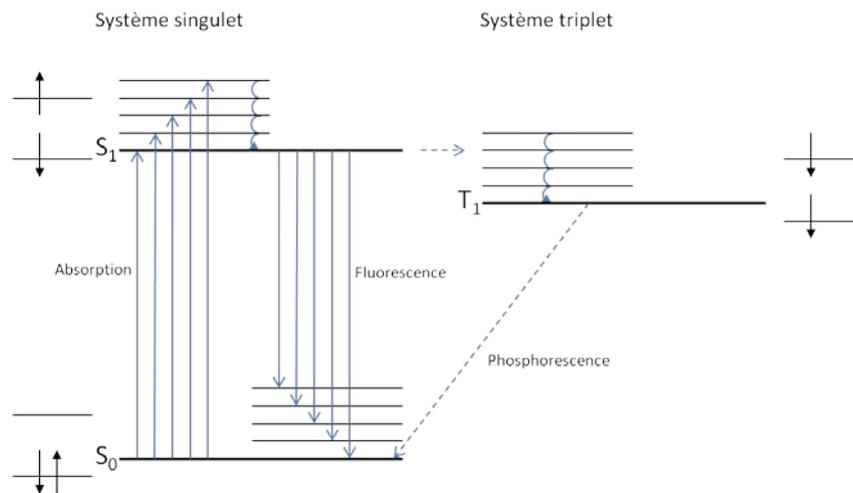


Figure 1.11 : diagramme d'énergie moléculaire

L'absorption d'un photon depuis l'état fondamental S₀ vers le premier état singulet S₁ génère un état excité qui en se désexcitant retourne soit à l'état fondamental en émettant un photon (fluorescence) soit par croisement intersystème génère l'état excité triplet T₁ qui se désexcitera avec un temps plus long (phosphorescence). Deux états T₁ peuvent également se recombiner par annihilation et générer un état singulet (S₁) qui émettra un photon de même longueur d'onde que celui obtenu par fluorescence. Ce phénomène s'appelle la fluorescence retardée.³⁷ L'émission ECL résultera de l'émission depuis les mêmes états excités que la photoluminescence. Comparée aux méthodes de photoluminescence, où l'état excité est généré par irradiation lumineuse, l'ECL présente l'avantage de ne pas utiliser de source d'excitation et donc de pouvoir éliminer le bruit de fond observé dans le cas des méthodes utilisant la fluorescence. Le ratio signal-sur-bruit est donc nettement amélioré ce qui permet de détecter des espèces à très faible concentrations. Par exemple, le complexe de Ruthénium tris-2,2'-bipyridine (Ru(bipy)₃²⁺) est un luminophore ECL très courant qui peut être détecté à des concentrations très faible (10⁻¹¹M).³⁸

III.2. Différents modes de génération de l'ECL

III.2.1. Génération d'ECL par annihilation

Les premières investigations sur l'ECL ont été faites en utilisant le mécanisme dit « par annihilation ».³⁹ La génération simultanée du cation et de l'anion d'une molécule à la surface de l'électrode et leur recombinaison génère l'état excité suivant le schéma réactionnel :



Les espèces sont générées dans la couche de diffusion, à proximité de la surface de l'électrode, en appliquant alternativement un potentiel positif (équation 1) et négatif (équation 2). L'équation 3 va mener à l'état excité A^* (état singulet S_1) de la molécule A par annihilation, qui va ensuite retourner à l'état fondamental en émettant un photon (équation 4).

Afin de pouvoir générer l'état excité, certaines conditions doivent être remplies. Les réactions d'oxydation et de réduction doivent être réversibles afin de pouvoir réaliser la réaction d'annihilation (équation 3). Ensuite, l'énergie disponible qui résulte de cette recombinaison doit être suffisante pour peupler le premier état excité. On peut calculer l'énergie disponible par la réaction d'annihilation ΔH_{ann} (en eV) et celle de l'état excité (E_S^{PL}) par les équations 5 et 6 :

$$-\Delta H_{ann} = \Delta G + T\Delta S = E_{p(ox)} - E_{p(red)} - 0.16 \quad (5)$$

$$E_S^{PL} \text{ (eV)} = hc/\lambda_{em} = 1239.81 / \lambda_{em} \quad (6)$$

Où E_p est le potentiel de pic de la réaction de réduction (équation 2) ou d'oxydation (équation 1) ; -0.16 eV est la valeur approximative du terme ($T\Delta S$) typique pour ce genre de systèmes (0.1 eV à 25°C) à laquelle on ajoute 0.057 eV qui correspond à la différence entre deux pics pour une réaction d'oxydo-réduction à un électron. La valeur d'énergie du premier état excité (E_S^{PL}) est calculée à partir de la longueur d'onde émise en fluorescence λ_{em} (en nm) avec l'équation 6, où h est la constante de Plank ($6.62 \cdot 10^{-34}$ J.s) et c est la vitesse de la lumière ($2.99 \cdot 10^8$ m.s⁻¹).

Dans le cas où $\Delta H_{ann} > E_{PL}$, l'énergie apportée par le système est suffisante pour peupler le premier état excité S_1 . Dans le cas où l'énergie apportée par le système n'est pas suffisante pour peupler l'état excité S_1 ($\Delta H_{ann} < E_{PL}$), mais suffisante pour peupler l'état T_1 (plus bas en énergie), on pourra parfois observer une émission de photon. Dans ce cas, c'est l'annihilation triplet-triplet qui va conduire à la génération de l'état excité (S_1) (équation 8).



Les deux voies d'excitation s'appellent la voie-S (génération directe de l'état singulet) et la voie-T (génération par l'intermédiaire des états triplets).

Un exemple classique de la génération d'ECL par voie T est le Rubrène (Fig. 1.12).³⁸ Sur la voltamétrie cyclique du Rubrène (RUB), on peut voir que les réactions d'oxydation et de réduction sont réversibles, condition nécessaire à la réaction d'annihilation. On peut déterminer les potentiels nécessaires à la génération du radical cation et du radical anion.

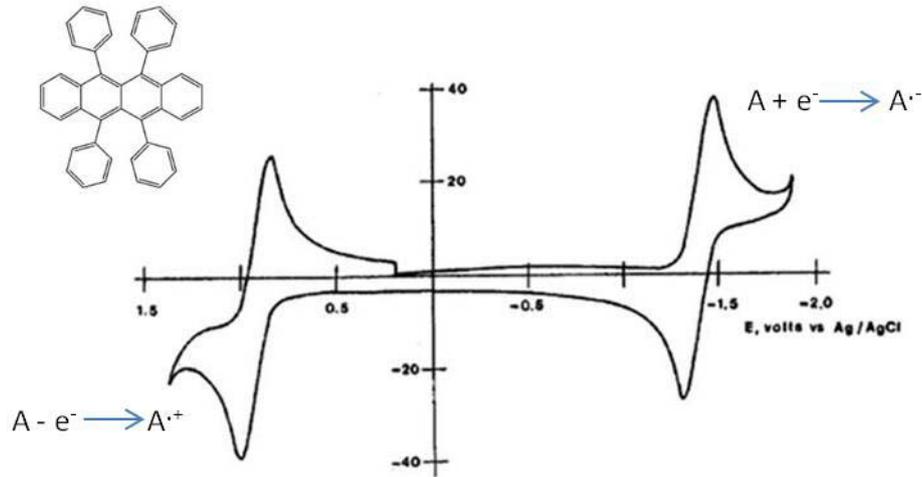


Figure 1.12 : structure chimique et voltamétrie cyclique du Rubrène³⁸



A partir de l'équation (5), on calcule $\Delta H_{\text{ann}} = 2.16 \text{ eV}$. Le spectre d'émission par photoluminescence du rubrène présente un maximum à 540 nm ce qui correspond à une énergie $E_{\text{PL}}(\text{eV}) = 2.3 \text{ eV}$ (calculée à partir de l'équation 6).⁴⁰ L'énergie apportée par le système est donc insuffisante pour peupler directement le premier état excité. On observe néanmoins l'émission de photon à une longueur d'onde de 540 nm confirmant l'existence de la voie T.⁴¹

L'annihilation a été la première technique étudiée pour la génération d'ECL, néanmoins elle présente plusieurs inconvénients. Les potentiels qui doivent être atteints pour générer les deux espèces cationiques et anioniques sont souvent élevés et les bornes des gammes de potentiels de l'électrolyte support et du solvant peuvent limiter son utilisation. Souvent les

expériences pour la génération d'ECL en annihilation nécessitent l'utilisation de solvants organiques distillés et de milieux dégazés.

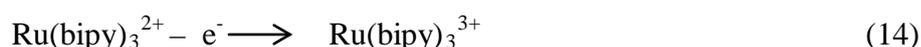
III.2.2. Utilisation de coréactifs pour la génération d'ECL

En 1977, une avancée importante a été réalisée avec la découverte de la génération de l'ECL avec l'utilisation de coréactifs.⁴² Dans ce cas, l'état excité est généré suite à l'application d'un seul saut de potentiel. Le coréactif est un composé qui, par oxydation ou réduction, va générer un intermédiaire très réactif qui va interagir avec le luminophore afin de former l'état excité. Souvent la réaction fait intervenir la formation d'un radical hautement réducteur ou oxydant qui résulte du clivage d'une liaison.

Le premier coréactif découvert est l'oxalate.⁴² L'oxalate est oxydé selon la réaction :



Il génère ainsi le radical $\text{CO}_2^{\cdot-}$ hautement énergétique. Simultanément, dans la même gamme de potentiel, le luminophore ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$) est oxydé selon l'équation :



Le radical anion $\text{CO}_2^{\cdot-}$ va ensuite réduire le $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ pour générer le $^*\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ luminescent. Cette voie réactionnelle est appelée « oxydative-réductive », puisqu'une réaction d'oxydation est réalisée et celle-ci génère un réducteur fort qui va alors réduire le luminophore. D'autres coréactifs dits « réductif-oxydatifs » vont permettre, au contraire, de générer un oxydant fort par une réaction de réduction (par exemple, avec le peroxyde de benzoyle).⁴³

III.2.3. Système ECL modèle : $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ et la Tripropylamine (TPrA)

Le couple le plus communément utilisé en ECL est le complexe de $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ et la tri-*n*-propylamine (TPrA) comme coréactif. Ce système est de type « oxydatif-réductif » puisque l'oxydation de la TPrA permet de former un fort réducteur.

Miao et A.J. Bard proposent plusieurs mécanismes qui font intervenir différentes voies capables de générer l'état excité du $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ (Fig. 1.13).³⁶

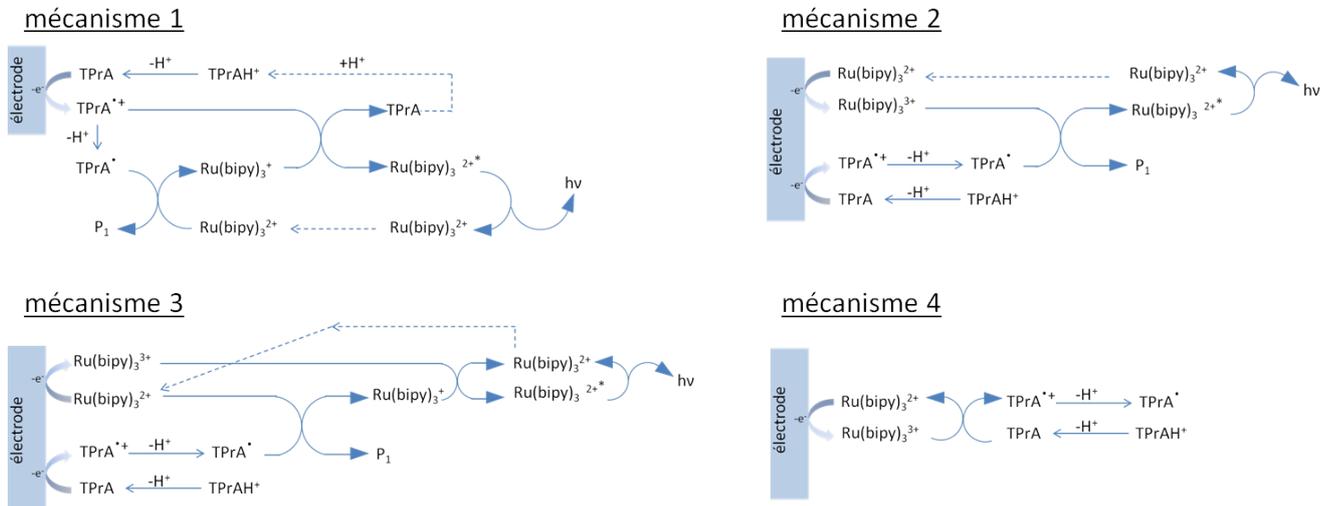


Figure 1.13 : mécanisme de la réaction d'ECL³⁶

Dans le premier mécanisme proposé, la TPrA seule est oxydée à la surface de l'électrode et l'état excité du Ruthénium sera généré par son intermédiaire. Dans les mécanismes 2 et 3, la TPrA et le Ruthénium sont oxydés à l'électrode. Dans le quatrième, la TPrA est oxydée de façon catalytique par l'intermédiaire du $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$.⁴⁴ L'état excité du Ruthénium ($^*\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$) peut donc être généré de plusieurs façons et le passage par l'une ou l'autre des voies va dépendre de la concentration en $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ dans la solution mais également du matériel de l'électrode. A faible concentration de Ruthénium, la TPrA est oxydée de façon directe à la surface de l'électrode. L'hydrophobicité de la surface de l'électrode va aussi avoir une importance cruciale sur la voie réactionnelle. Les électrodes en carbone vitreux permettent l'oxydation de la TPrA par voie directe plus facilement que les électrodes en or ou en platine. La formation d'une couche d'oxydes, lors d'application de potentiels positifs, pour ces deux matériaux bloque en effet l'oxydation de la TPrA.⁴¹ Certaines méthodes peuvent contourner cette limitation, comme par exemple l'addition de tensio-actifs qui va favoriser l'interaction entre la TPrA et la surface de l'électrode et donc de faciliter l'oxydation du coréactif et augmenter l'intensité du signal ECL.⁴⁵

D'autres coréactifs moins nocifs que la TPrA à base d'amines tertiaires ont été étudiés (comme par exemple le dibutylaminoéthanol).⁴⁶ Les amines aliphatiques qui possèdent un proton en alpha de l'azote peuvent se déprotonner après oxydation et former un radical

fortement réducteur comme dans le cas de la TPrA. Ces radicaux peuvent alors réduire le $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ et produire l'état excité. Le choix du coréactif va permettre d'influencer les propriétés du système comme par exemple l'intensité du signal, la solubilité ou encore le potentiel red-ox etc...

De nombreux luminophores peuvent être considérés pour leurs applications en ECL. Au cours de cette thèse j'ai également participé à la caractérisation d'une nouvelle famille de luminophores ECL, formés à partir du motif acridinium, en collaboration avec l'équipe de J. Lacour de l'Université de Genève, mais ces travaux ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

III.3. Applications de l'ECL

L'intégration de l'ECL dans différents systèmes analytiques a pu être développée, comme par exemple avec l'électrophorèse capillaire (CE - *capillary electrophoresis*), la chromatographie liquide (HPLC - *high performance liquid chromatography*), et l'analyse par injection en flux continu (FIA - *flow injection analysis*).⁴¹ L'utilisation de l'ECL comme méthode de détection apporte de nombreux avantages pour le développement de ces techniques : sensibilité, contrôle spatial et temporel, faible bruit de fond, temps de réponse rapide, et analyse en faible volume. Le plus souvent le luminophore utilisé est le complexe de $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ (cf. III.2.3) et permet la détection de nombreux composés à activités biologiques (par exemple certaines drogues et médicaments).⁴¹

Des méthodes utilisant l'immobilisation du Ruthénium sur un support solide ont également été réalisées. Les analyses immunologiques et la détection sélective et spécifique de l'ADN pour les diagnostics médicaux représentent les principales applications utilisant l'ECL sur support solide. Par exemple, Miao et Bard ont développé des sondes à ADN utilisant des billes magnétiques.⁴⁷

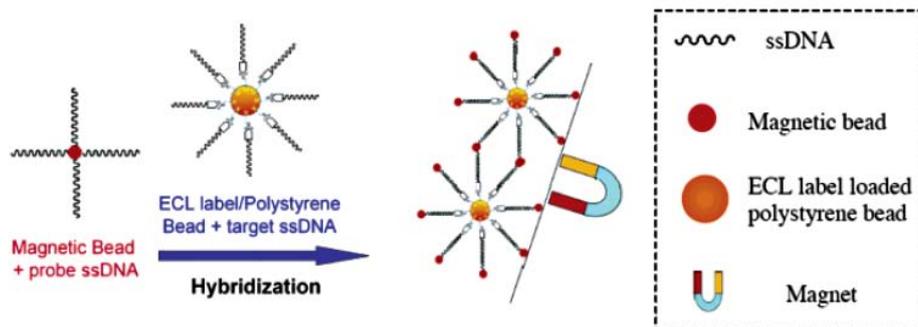


Figure 1.14 : sondes pour la détection de l'ADN utilisant l'ECL⁴⁷

Les billes magnétiques fonctionnalisées avec un brin d'ADN sont séparées du milieu après hybridation avec le brin d'ADN cible en utilisant un aimant. Le brin d'ADN cible fonctionnalisé avec un luminophore est ensuite révélé par ECL (Fig. 1.14).

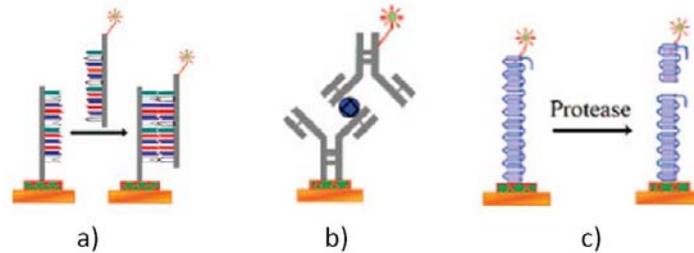


Figure 1.15 : différents modes de reconnaissance utilisés pour l'analyse ECL en phase solide ⁴¹ : a) hybridation d'ADN immobilisé, b) test immunologique de type sandwich et c) test d'activité de la protéase.

La figure 1.15 présente quelques exemples des différentes possibilités d'analyses exploitées avec l'utilisation de l'ECL sur support solide. L'immobilisation d'ADN (a) comme dans l'exemple des travaux de Bard et Miao⁴⁷ mais également la possibilité de développer des détecteurs pour la détection d'antigènes (b)⁴⁸ et de protéines(c). Par exemple, Roche diagnostique⁴⁹ et Meso Scale Discovery⁵⁰ ont élaboré plusieurs analyseurs utilisant la détection par ECL. SECTOR IMAGER 6000® (Fig. 1.16 : Meso Scale Discovery)⁵⁰ permet l'analyse multiplexée de centaines d'échantillons en une mesure en utilisant des plaques avec plusieurs puits contenant chacun plusieurs sondes biologiques.



Figure 1.16 : SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery) et la plaque multi-puits ⁵⁰

Le couplage de L'ECL avec d'autres techniques permet de développer des stratégies innovantes et intéressantes, par exemple avec l'électrochimie bipolaire qui a été utilisée pour la réalisation de nageurs luminescents.⁵¹

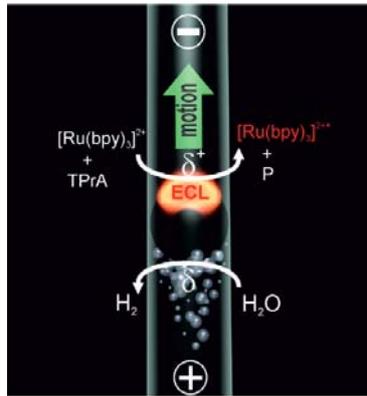


Figure 1.17 : Représentation schématique de la production simultanée de luminescence et d'un mouvement par électrochimie bipolaire sur une bille de carbone⁵¹

L'électrochimie bipolaire repose sur la polarisation de l'interface entre un objet conducteur et la solution environnante par l'application d'un champ électrique extérieur. Si le champ appliqué est assez grand, des réactions électrochimiques sont observées aux deux extrémités de l'objet. Par exemple dans l'exemple de la figure 1.17, une bille de carbone est utilisée pour réaliser un nageur luminescent. Sur le pôle négatif de la bille, une réaction de réduction (ici celle de l'eau) est observée et simultanément, au pôle positif l'oxydation du complexe de ruthénium et de la TPrA nécessaire à la génération de l'ECL se produit.

L'électrochimie bipolaire permet donc à la fois de générer le mouvement de la bille résultant de la production des bulles de gaz d'hydrogène, mais également la génération du signal électrochimiluminescent sans contact électrique. La mise en mouvement d'objets à l'échelle micrométrique trouve de nombreuses applications, comme par exemple, pour la réalisation de micromoteurs ou encore en médecine pour la libération localisée d'espèces actives. La génération simultanée de lumière sur le même objet présente des perspectives très intéressantes pour le développement de ces systèmes. Cette méthodologie a été développée dans notre laboratoire et j'ai pu participer, au cours de cette thèse, à l'extension de ces travaux à partir d'un autre système ECL basé sur l'émission du luminol, mais ces travaux ne seront pas présentés dans cette thèse.⁵²

III.4. ECL sur réseaux de fibres optiques

Le premier exemple d'utilisation de l'ECL sur des réseaux de fibres optiques métallisées a été présenté par P. Pantano en 2001.⁵³ Dans ces travaux, le réseau est modifié avec le complexe de Ruthénium emprisonné dans un film de Nafion. L'image de la figure 1.18 représente les images ECL collectées par une camera CCD après l'immersion du réseau

modifié dans une solution de triéthylamine ou de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). Les deux molécules sont des coréactifs pour la génération d'ECL et vont donc induire un fort signal ECL lors de l'application d'un potentiel anodique à la surface de l'électrode.

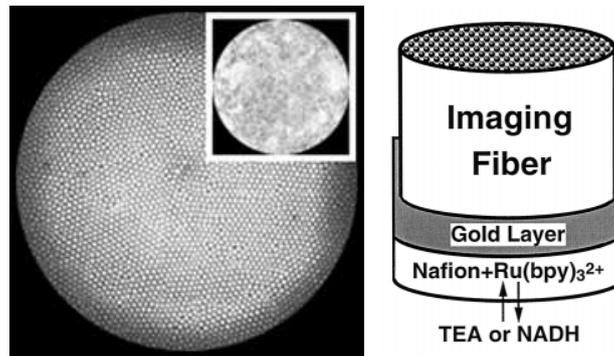


Figure 1.18 : premier capteur ECL sur fibre optique⁵³

D'autres exemples ont été publiés sur l'utilisation de l'ECL sur fibres optiques. Par exemple, la création d'un réseau de sondes opto-électrochimiques sur un réseau de nanopointes utilisant les fibres optiques a été étudiée par ECL.⁵⁴ Dans ces travaux, l'utilisation d'une peinture électrophorétique a été déposée sur les réseaux en évitant le sommet des pointes. Cette stratégie sera étudiée en détail dans le chapitre 4 où une autre méthode a été développée pour produire ce type de structure.

D'autres capteurs ont été créés par exemple pour l'analyse immunologique multiplexée¹⁵ (cf. Fig. 1.19). Les sondes, c'est-à-dire les anticorps, sont liés sur des billes de silice de façon covalente par silanisation. La silanisation est une méthode courante pour fonctionnaliser des surfaces de silice et sera détaillée dans le chapitre 2, pour la réalisation d'un capteur fluorescent pour la détection de Hg^{2+} . Les billes de silice sont ensuite simplement déposées aléatoirement dans le réseau de micro cavités du réseau. Chaque bille est recouverte de plusieurs copies de l'anticorps et pourra reconnaître l'antigène complémentaire dans un échantillon à analyser. Les antigènes complémentaires sont ensuite fonctionnalisés avec un complexe de Ruthénium et révélés par ECL.

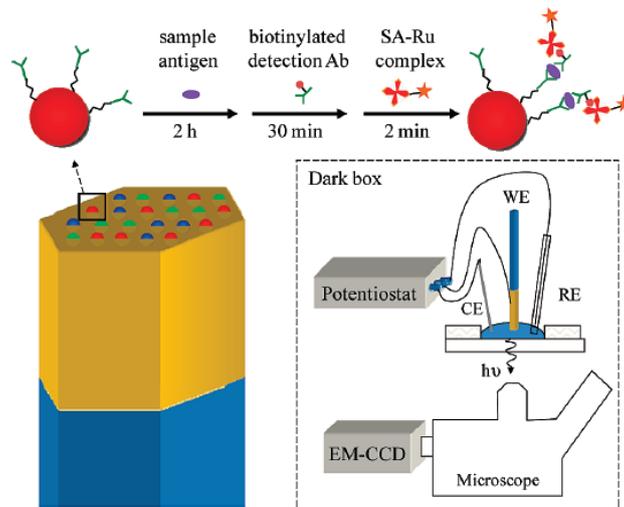


Figure 1.19 : test immunologique sur fibre optique utilisant l'ECL comme méthode de détection¹⁵

IV. Capteurs sur fibres optiques

IV.1. Généralités sur les capteurs

Les fibres optiques sont largement utilisées dans la réalisation de différents types de capteurs. Dans la littérature, l'utilisation abusive du mot « capteur » a élargi sa définition à de nombreux systèmes, y compris à certaines sondes moléculaires, qui ne présentent pourtant pas les caractéristiques nécessaires pour pouvoir être définies ainsi. Il semble donc important de rappeler, ici, la définition et la composition d'un capteur.

Un capteur est un outil miniaturisé qui permet de traduire une valeur physique (température, concentration...) en un signal observable par un observateur ou un instrument.

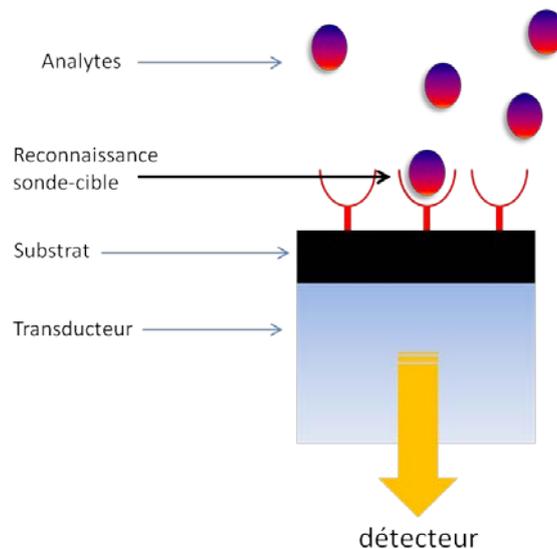


Figure 1.20 : schéma explicatif du principe d'un capteur

Il est composé de plusieurs parties : une *sonde* capable d'interagir spécifiquement avec l'analyte que l'on cherche à mesurer ; le *substrat* qui permet d'immobiliser notre sonde à la surface du transducteur ; le *transducteur* qui transmet le signal à l'observateur.⁵⁵ Dans le cas des capteurs réalisés dans le cadre de cette thèse, le transducteur sera notre réseau de fibres optiques. Les réseaux de fibres présentent de nombreux avantages comme par exemple leur excellente transmission et leur flexibilité. La transmission du signal par réflexion totale interne permet de réaliser de la détection à distance ce qui peut être très intéressant dans le cas de l'étude de zones dangereuses ou inaccessibles. Grâce à leur petit diamètre elles peuvent également être utilisées pour l'analyse *in vivo* de façon peu invasive. De plus, l'utilisation de la transduction optique et de la détection par exemple avec une caméra CCD (*charge couple device*) permet de collecter plusieurs milliers d'informations simultanément de façon simple. En effet contrairement aux réseaux de microélectrodes, les fibres optiques du réseau n'ont pas besoin d'être adressées individuellement et l'enregistrement de l'image par la caméra suffit pour collecter les différentes informations. L'immobilisation de différentes sondes à la surface du réseau peut donc permettre de détecter plusieurs espèces simultanément. Le multiplexage (c'est-à-dire la détection simultanée de plusieurs analytes sur le même outil) constitue un domaine de recherche très actif car l'analyse de milieux complexes et la détection de différentes espèces en une mesure est souvent nécessaire (comme l'analyse environnementale, médicale etc...). Il existe plusieurs types de capteurs sur fibres optiques qui dépendent de la sonde utilisée. Les biocapteurs font intervenir une biomolécule qui est immobilisée à la surface du réseau comme par exemple un brin d'ADN, une enzyme, ou même des cellules entières. Les capteurs chimiques reposent, quant à eux, sur une sonde de type moléculaire.

Il existe différentes méthodes pour immobiliser les sondes à la surface du réseau et quelques exemples de réalisation de capteurs utilisant la technologie des fibres optiques sont présentés dans cette partie du chapitre.

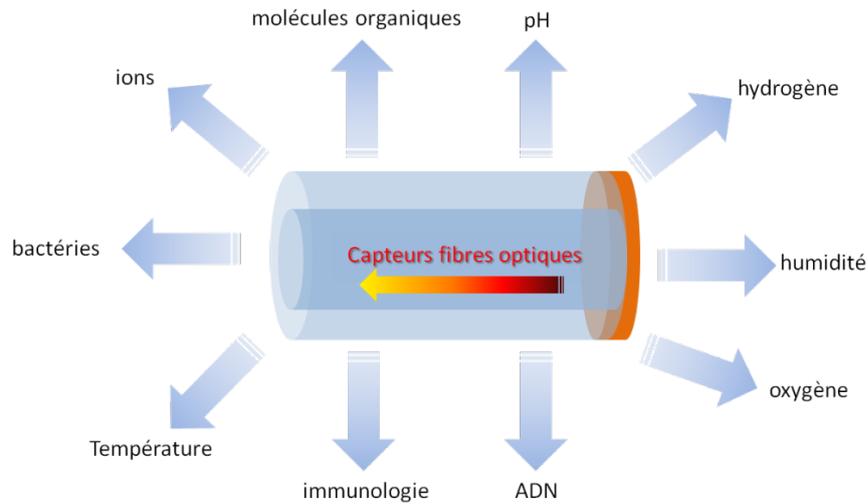


Figure 1.21 : exemples d'applications des capteurs basés sur des fibres optiques.

IV.2. Biocapteurs sur fibres optiques

L'une des applications les plus répandues des réseaux de fibres optiques est la réalisation de biocapteurs pour la détection de brins d'ADN, l'intérêt étant de pouvoir détecter plusieurs brins d'ADN simultanément. L'identification de séquences ADN est essentielle dans le domaine du diagnostic médical ou encore de la sécurité alimentaire. L'équipe de D. R. Walt a développé une méthode qui utilise les réseaux de cavités pour immobiliser des billes fonctionnalisées avec différents brins d'ADN.^{56,57} Ce procédé a permis de développer des capteurs très performants qui ont pu être exploités commercialement.⁵⁸ La stratégie utilisée ici est similaire à celle déjà présentée dans la partie II.2.3. L'immobilisation des brins d'ADN est faite par silanisation sur les billes de silice qui sont déposées de façon aléatoire dans le réseau de micro-cavités. Sur la figure 1.22, on observe les points fluorescents correspondant aux billes fonctionnalisées avec le brin d'ADN révélé.

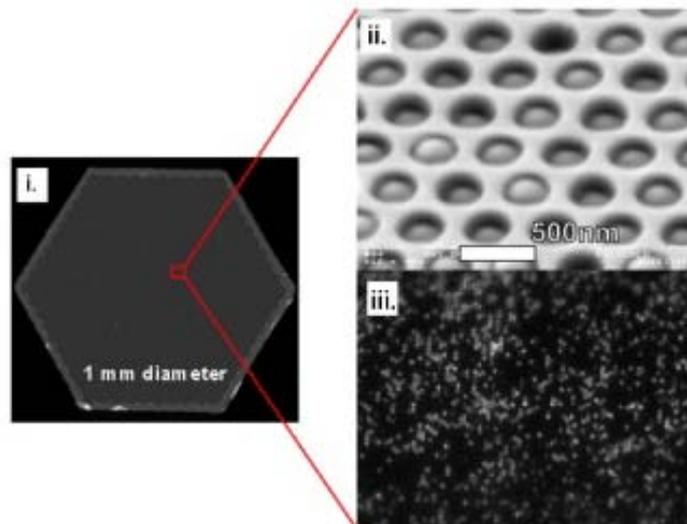


Figure 1.22 : i. vue globale du réseau de fibres optiques utilisé pour la réalisation du biocapteur à ADN, ii. image en microscopie électronique à balayage des micro-billes immobilisées dans le réseau de microcavités, iii. image des billes fluorescentes^{56b}

Cette technique ne permet pas de contrôler le positionnement des billes qui sont simplement déposées de façon aléatoire à la surface de la fibre et une étape de décodage est nécessaire.

Au cours de ma thèse, j'ai participé au développement d'une autre méthode pour l'immobilisation de brins d'ADN, en collaboration avec le LAAS de Toulouse et l'équipe de Thierry Livache à Grenoble. Cette méthode utilise une « bioplume », c'est-à-dire un micro-levier conducteur en silice et en or (Fig. 1.23a). Ce micro-levier peut être manipulé précisément et permet de déposer une goutte de solution de façon contrôlée à la surface d'un réseau de nanopointes (Fig. 1.23b).⁵⁹ Ce réseau de nanopointes est tout d'abord métallisé par pulvérisation d'une fine couche d'or ou d'ITO, ce qui permet de fonctionnaliser le réseau par électropolymérisation. Les brins d'ADN sont liés de façon covalente à un groupement pyrrole qui peut être oxydé par l'application d'un potentiel anodique ce qui va conduire à la polymérisation et à la précipitation du poly-pyrrole fonctionnalisé avec le brin d'ADN à la surface de l'électrode. Une matrice de plots d'ADN est déposée par la bioplume⁵⁹ sur la surface du réseau. Un potentiel anodique est appliqué entre la surface de la fibre et la bioplume. Lors du contact entre la goutte de la bioplume et la surface conductrice de la fibre optique le circuit électrique est alors fermé ce qui permet d'oxyder le pyrrole qui va polymériser à la surface du réseau. Le poly-pyrrole est déposé sur un plot de diamètre égal à la surface qui a été « mouillée » par la goutte de solution (Fig. 1.23c). Dans ce projet, un

potentiel de 2 V est appliqué pendant 100 ms et le diamètre de la goutte formé est d'environ 10 μm , ce qui permet de déposer plusieurs centaines de plots à la surface du réseau. La taille des plots correspond donc au recouvrement de plusieurs fibres du réseau dont le diamètre est de 3 μm . Le capteur est ensuite mis en contact avec un échantillon d'ADN à étudier. Les brins d'ADN sont fonctionnalisés avec la biotine. La révélation de l'hybridation est réalisée par formation du complexe ADN biotinylé avec une streptavidine modifiée avec un fluorophore (Streptavidine-R-phycoérythrine). L'image obtenue correspond à la matrice de plots qui ont été déposés par la bioplume. L'hybridation révélée par fluorescence a été également imagée au niveau de la face distale de la fibre (Fig. 1.23d).

Cette technique présente l'avantage de pouvoir contrôler l'adressage des plots ADN à l'endroit désiré de la fibre avec une précision de l'ordre du micromètre.

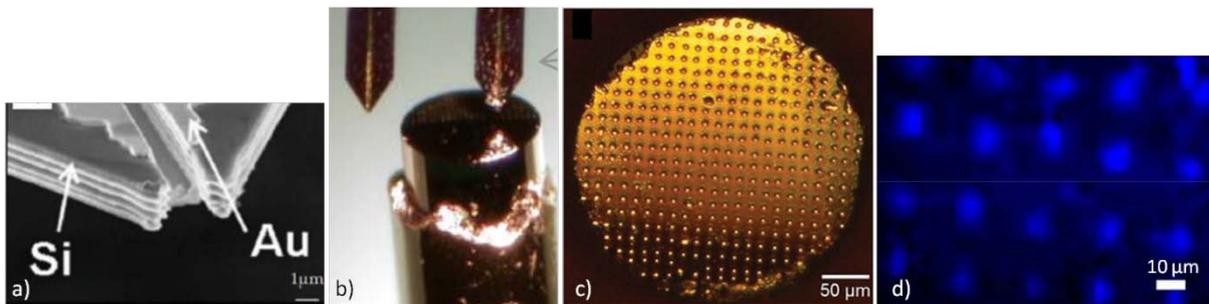


Figure 1.23 : a) image MEB de la bioplume b) manipulation de la bioplume à la surface du réseau c) matrice de gouttes de solution déposées sur la fibre d) matrice de plots d'ADN hybridés révélés par fluorescence^{33, 59}

Les fibres optiques ont été largement utilisées dans le domaine des biocapteurs. L'immobilisation d'anticorps (pour la détection d'explosifs⁶⁰ ou de protéines³²), d'enzymes⁶¹ (la glucose oxydase pour la mesure du glucose) ou même de cellules entières (des bactéries pour la détection de polluants⁶²) ont également été développées.

Les réactions de reconnaissances entre biomolécules sont souvent hautement spécifiques et très efficaces ce qui rend ces systèmes très performants. Cependant les différentes sondes biologiques nécessitent souvent un soin particulier (condition de température, durée de vie...). La stabilité des capteurs biologiques est donc un défaut récurrent qui est observé dans ce domaine.

IV.3. Capteurs chimiques sur fibres optiques

Les capteurs chimiques utilisent des sondes moléculaires immobilisées à la surface de la fibre optique. Ils présentent comme principal avantage d'avoir une meilleure stabilité que les capteurs biologiques.

La détection de gaz comme par exemple l'hydrogène ou le méthane dans l'atmosphère présente un intérêt du fait de leur nature explosive. La détection par l'intermédiaire de méthodes optiques étant plus sûre qu'une détection par des méthodes électriques,⁶³ de nombreux capteurs sur fibres optiques ont été développés dans ce but. L'hydrogène interagit fortement avec le palladium et le platine. La réalisation de capteurs pour la détection du dihydrogène sur fibre optique repose sur l'utilisation d'une couche de métal⁶⁴ (ou encore d'oxydes ou d'alliages) déposée sur la face distale ou encore sur l'enveloppe de la fibre. L'interaction de l'hydrogène avec le métal va induire un changement spectral (appelé gasochromisme) qui va permettre de quantifier l'hydrogène présent dans un milieu.

En fonction des domaines du spectre électromagnétique étudié, on peut cibler différents gaz en fonction de leur spectre d'absorbance, par exemple les molécules organiques⁶⁵ (domaine infrarouge) ou l'ozone⁶⁶ (domaine UV-visible). Le principe des capteurs à oxygène repose sur l'inhibition de la fluorescence de certains fluorophores.⁶³ Le fluorophore est souvent immobilisé à la surface de la fibre optique par formation d'une matrice sol-gel.⁶⁷

L'immobilisation de certains fluorophores permet également la réalisation de capteurs à pH et à oxygène, disponibles commercialement⁶⁸ (Oceanoptics, Presens,..).

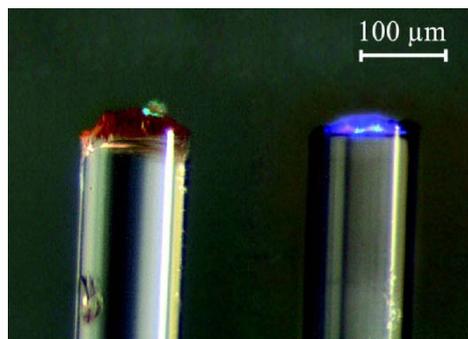


Figure 1.24 : photographies de capteurs sur fibre optique pour la détection d'oxygène et la mesure de la température (gauche), et pour la mesure du pH et pour la détection d'oxygène (droite)⁶⁹

L'immobilisation de sondes de couleurs différentes (Fig. 1.24) permet la détection de deux espèces simultanément.⁶⁹ Le capteur de gauche est sensible à la présence d'oxygène et à

la température. Il présente une couleur verte due à la LED de longueur d'onde 505 nm utilisée et une fluorescence rouge qui résulte du signal du capteur. Celui de droite est sensible au pH et à la présence d'oxygène. Il présente une couleur bleue due à la LED de longueur d'onde 470 nm utilisée dans ce capteur et une fluorescence verte et rouge dues au capteur. Dans ces deux capteurs, les sondes sont immobilisées par simple adsorption du composé à la surface de la fibre. Cette méthode est pratique et rapide mais doit probablement être améliorée pour une utilisation industrielle.

La détection d'ions a également été étudiée sur des capteurs basés sur l'utilisation de fibres optiques. Par exemple un semicarbazone sensible à la présence de cuivre a été immobilisé dans une matrice de PVC (polychlorure de vinyle).⁷⁰ Ce capteur est capable de détecter le cuivre avec une limite de détection de l'ordre du nanomolaire.

IV.4. Analyses multiplexées

L'immobilisation de différentes sondes à la surface du même réseau représente un challenge très intéressant pour la réalisation de capteurs multianalytes. Certains exemples ont déjà été présentés dans ce chapitre. L'utilisation des billes modifiées avec une sonde biologique^{56a} permet d'immobiliser un grand nombre de sondes sur le réseau mais la répartition de ces sondes se fait de façon aléatoire et une étape de décodage est nécessaire. L'autre stratégie présentée est l'utilisation d'une bioplume,⁵⁹ qui permet d'adresser de façon contrôlée des plots de pyrrole.

Les groupes de R. S. Marks et S. Cosnier ont proposé une stratégie innovante pour l'immobilisation de biomolécules sur des fibres optiques. Cette approche repose sur la réactivité de la benzophénone qui peut se lier à une macromolécule de façon covalente après irradiation lumineuse (Fig. 1.25).⁷¹ La réalisation de plusieurs capteurs sur fibres optiques est basée sur cette méthodologie.^{72,73} L'équipe de R. S. Marks a actuellement le projet de réaliser un « lab-in-a-pen » (laboratoire sur stylo) qui utiliserait la combinaison de plusieurs fibres optiques modifiées avec différentes sondes. Le BioPen aurait la possibilité de détecter un éventail important de pathologies (Hépatite B et C, fièvre de dengue, virus Ebola, différents cancers...) en utilisant la reconnaissance immunologique entre antigène et anticorps du test ELISA.

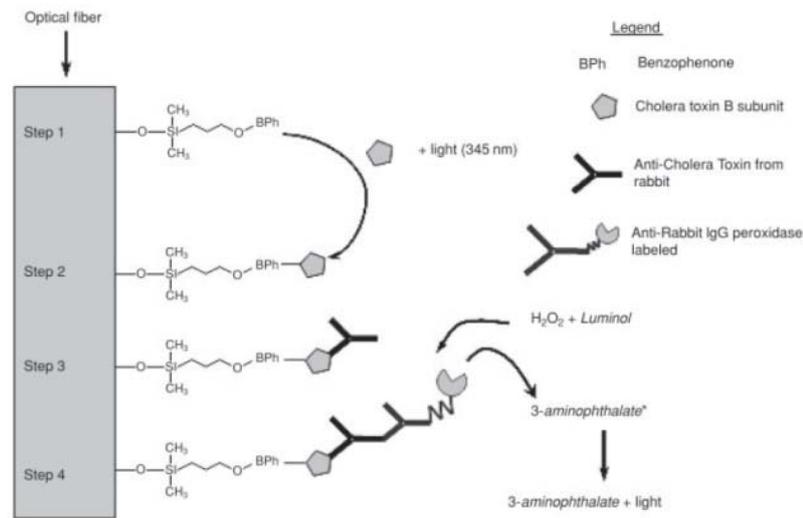


Figure 1.25 : principe de la réalisation d'un capteur pour la détection de la toxine du choléra par l'immobilisation du silane-benzophénone suivie d'une fonctionnalisation par irradiation lumineuse ⁷¹

Les différentes méthodes présentées dans ce chapitre pour la réalisation de capteurs multianalytes se concentrent principalement sur des capteurs de types biologiques.

Dans le chapitre 3, nous présenterons une stratégie innovante pour la réalisation d'un capteur chimique multianalyte. Cette stratégie repose sur l'utilisation de polymères possédant des groupes photo-labiles qui permettent la fonctionnalisation du réseau avec différentes sondes au travers d'une réaction de couplage peptidique.

Conclusion

Les réseaux de fibres optiques permettent de transmettre des informations sous forme d'un signal lumineux avec très peu d'atténuation sur des distances pouvant aller jusqu'à plusieurs milliers de kilomètres. Depuis les années 1950, leur utilisation dans le développement de nouvelles technologies ne cesse d'augmenter. Leurs applications dans des domaines très variés vont de la télécommunication à la réalisation de capteurs. Ces capteurs, dont certains sont disponibles commercialement, sont utilisés couramment dans le domaine industriel et dans le domaine médical pour la détection de substances chimiques ou biologiques dans des milieux difficilement accessibles. Dans l'industrie chimique, le suivi en continu de certaines réactions nécessite l'utilisation de ces capteurs pour l'accès à des zones dangereuses. Dans le domaine médical, c'est le faible diamètre des fibres optiques qui est

intéressant pour l'analyse *in vivo* de façon peu invasive. La structuration de ces réseaux à l'aide de procédés de dissolution chimique sélective en réseaux de nano-pointes ou de micro-cavités peut être obtenue de façon très reproductible. Ces structures trouvent leur utilité dans de nombreuses techniques comme la microscopie SERS, la microscopie en champ proche pour les nanopointes ou pour l'étude de cellules uniques en milieu confiné dans de très faibles volumes pour les micro-cavités. Ces structures permettent également de faciliter la fonctionnalisation des réseaux de fibres optiques. Différentes méthodologies ont été présentées dans ce chapitre pour la fonctionnalisation de ces réseaux, dans le cadre de la réalisation de capteurs. Les procédés sol-gel ou la formation de membranes permettent de piéger certaines molécules, tandis que la silanisation ou l'électropolymérisation permettent de lier directement les sondes à la surface des réseaux. La gamme de longueurs d'ondes utilisée pour ces capteurs va de l'infra-rouge au domaine du visible et la technique analytique la plus souvent employée est la fluorescence, pour ces avantages expérimentaux. L'utilisation de l'électrochimie sur les fibres optiques ouvre la voie à une nouvelle stratégie de détection : l'ECL. Cette technique très sensible n'est encore que très peu utilisée pour le développement de capteurs sur fibres optiques mais présente une perspective prometteuse. Dans cette thèse, la réalisation de deux capteurs utilisant des méthodes différentes de fonctionnalisation et de détection est présentée. Dans un premier temps, la réalisation d'un capteur par silanisation d'un dérivé de la rhodamine directement sur le réseau de fibres optiques utilisera la fluorescence pour détecter et quantifier la présence de mercure sous sa forme cationique. Le second capteur utilise la technologie des « électroptodes » pour fonctionnaliser le réseau avec un complexe de Ruthénium par électropolymérisation. Ce complexe permet de détecter le mercure Hg^{2+} et le quantifier de façon sélective en utilisant l'électrochimiluminescence.

Le développement de méthodes pour l'analyse de différentes espèces simultanément sur le même réseau de fibres optique représente un challenge intéressant. Une nouvelle stratégie a été développée au cours de cette thèse. Cette stratégie utilise un polymère possédant des groupements photo-labiles qui peuvent être refunctionalisés par une réaction de couplage avec différentes sondes. L'originalité de ce projet réside dans la possibilité de fonctionnaliser le réseau de fibres avec une grande variété de sondes biologiques ou chimiques de façon contrôlée. Les résultats préliminaires obtenus pour ce projet sont présentés à la fin du chapitre 3.

1. Hopkins, H. H.; Kapany, N. S., A Flexible Fibrescope, using Static Scanning. *Nature* **1954**, *173* (4392), 39.
2. Baird, J. L., US Patent 1800044. **1931**.
3. Rogers, A., Distributed optical-fibre sensing. *Measurement Science and Technology* **1999**, *10* (8), R75.
4. Kao, K. C.; Hockham, G. A., Dielectric-fibre surface waveguides for optical frequencies. *Proceedings of the Institution of Electrical Engineers* **1966**, *113* (7), 1151-1158.
5. Reddick, R. C.; Warmack, R. J.; Ferrell, T. L., New form of scanning optical microscopy. *Physical Review B* **1989**, *39* (1), 767.
6. Turner, D. R., US Patent 4469554 A : Etch procedure for optical fibers. **1983**.
7. Bühler, J.; Steiner, F. P.; Baltes, H., Silicon dioxide sacrificial layer etching in surface micromachining. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1997**, *7* (1), R1.
8. Spierings, G., Wet chemical etching of silicate glasses in hydrofluoric acid based solutions. *J Mater Sci* **1993**, *28* (23), 6261-6273.
9. Tenney, A. S.; Ghezzi, M., Etch Rates of Doped Oxides in Solutions of Buffered HF. *Journal of The Electrochemical Society* **1973**, *120* (8), 1091-1095.
10. Pangaribuan, T.; Yamada, K.; Jiang, S.; Ohsawa, H.; Ohtsu, M., Reproducible Fabrication Technique of Nanometric Tip Diameter Fiber Probe for Photon Scanning Tunneling Microscope. *Japanese Journal of Applied Physics* **1992**, *31*, L1302 - L1304.
11. Ohtsu, M., Progress of high-resolution photon scanning tunneling microscopy due to a nanometric fiber probe. *Journal of Lightwave Technology* **1995**, *13* (7), 1200-1221.
12. Deiss, F.; Sojic, N.; White, D.; Stoddart, P., Nanostructured optical fibre arrays for high-density biochemical sensing and remote imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *396* (1), 53.
13. Walt, D. R., Fibre optic microarrays. *Chemical Society Reviews*, **2010**, *39* (1), 38.
14. Kotsas, A.; Ghafouri-Shiraz, H.; Maclean, T. S. M., Microlens fabrication on single-mode fibres for efficient coupling from laser diodes. *Opt Quant Electron* **1991**, *23* (3), 367-378.
15. Deiss, F.; LaFratta, C. N.; Symer, M.; Blicharz, T. M.; Sojic, N.; Walt, D. R., Multiplexed Sandwich Immunoassays Using Electrochemiluminescence Imaging Resolved at the Single Bead Level. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (17), 6088.
16. Rissin, D. M.; Walt, D. R., Digital Readout of Target Binding with Attomole Detection Limits via Enzyme Amplification in Femtoliter Arrays. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (19), 6286-6287.
17. D.R., W.; P., P. Superresolution Imaging Fiber for Subwavelength Light Energy Generation and Near-Field Optical Microscopy. **1997**.
18. Paul, P.; David, R. W., Toward a near-field optical array. *Review of Scientific Instruments* **1997**, *68* (3), 1357-1359.
19. White, D. J.; Mazzolini, A. P.; Stoddart, P. R., Fabrication of a range of SERS substrates on nanostructured multicore optical fibres. *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38* (4), 377-382.
20. Guieu, V.; Lagugné-Labarthe, F.; Servant, L.; Talaga, D.; Sojic, N., Ultrasharp Optical-Fiber Nanoprobe Array for Raman Local-Enhancement Imaging. *Small* **2008**, *4* (1), 96-99.
21. Daniel J. White, A. P. M., Paul R. Stoddart, First-approximation simulation of dopant diffusion in nanostructured silica optical fibres. *Proc. SPIE 7102, Optical Fabrication, Testing, and Metrology III*, 710202 **2008**, 7102, 1.

22. Guieu, V.; Garrigue, P.; Lagugn -Labarthe, F.; Servant, L.; Sojic, N.; Talaga, D., Remote surface enhanced Raman spectroscopy imaging via a nanostructured optical fiber bundle. *Opt. Express* **2009**, *17* (26), 24030-24035.
23. (a) Chovin, A.; Garrigue, P.; Pecastaings, G.; Saadaoui, H.; Manek-H nninger, I.; Sojic, N., Microarrays of near-field optical probes with adjustable dimensions. *Ultramicroscopy* **2006**, *106* (2), 57-65; (b) Chovin, A.; Garrigue, P.; Manek-H nninger, I.; Sojic, N., Fabrication, Characterization, and Far-Field Optical Properties of an Ordered Array of Nanoapertures. *Nano Letters* **2004**, *4* (10), 1965-1968.
24. Marks, R. S.; Novoa, A.; Konry, T.; Kraus, R.; Cosnier, S., Indium tin oxide-coated optical fiber tips for affinity electropolymerization. *Materials Science and Engineering: C* **2002**, *21* (12), 189.
25. Chovin, A.; Garrigue, P.; Manek-H nninger, I.; Sojic, N., Fabrication, Characterization, and Far-Field Optical Properties of an Ordered Array of Nanoapertures. *Nano Letters* **2004**, *4* (10), 1965.
26. Li, C.; Bai, H.; Shi, G., Conducting polymer nanomaterials: electrosynthesis and applications. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (8), 2397-2409.
27. Cosnier, S., Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, *14* (5), 443-456.
28. Wallace, G. G.; Spinks, G. M.; Kane-Maguire, L. A. P.; Teasdale, P. R., *Conductive Electroactive Polymers*. **2009**.
29. Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G., The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *Chemical Society Reviews* **2000**, *29* (5), 283-293.
30. Schrebler, R.; Grez, P.; Cury, P.; Veas, C.; Merino, M.; G mez, H.; C rdova, R.; del Valle, M. A., Nucleation and growth mechanisms of poly(thiophene) Part 1. Effect of electrolyte and monomer concentration in dichloromethane. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, *430* (1-2), 77-90.
31. Konry, T.; Heyman, Y.; Cosnier, S.; Gorgy, K.; Marks, R. S., Characterization of thin poly(pyrrole-benzophenone) film morphologies electropolymerized on indium tin oxide coated optic fibers for electrochemical and optical biosensing. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (16), 5128.
32. Konry, T.; Novoa, A.; Cosnier, S.; Marks, R. S., Development of an Electroptode Immunosensor: Indium Tin Oxide-Coated Optical Fiber Tips Conjugated with an Electropolymerized Thin Film with Conjugated Cholera Toxin B Subunit. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (11), 2633.
33. Deiss, F.; Laurent, S.; Descamps, E.; Livache, T.; Sojic, N., Opto-electrochemical nanosensor array for remote DNA detection. *Analyst* **2010**, *136* (2), 327.
34. Dupont-Filliard, A.; Billon, M.; Livache, T.; Guillerez, S., Biotin/avidin system for the generation of fully renewable DNA sensor based on biotinylated polypyrrole film. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *515* (2), 271-277.
35. Cosnier, S.; A., K., *Electro-polymerization: Concepts, Materials and Applications*. 2010.
36. Miao, W.; Choi, J.-P.; Bard, A. J., Electrogenated Chemiluminescence of the Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)₃²⁺)/Tri-n-propylamine (TPrA) System Revisited: A New Route Involving TPrA^{•+} Cation Radicals. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (48), 14478-14485.
37. Bard, A. J., Electrogenated Chemiluminescence. **2004**.
38. Richter, M. M., Electrochemiluminescence (ECL). *Chemical Reviews* **2004**, *104* (6), 3003-3036.

39. Visco, R. E.; Chandross, E. A., Electroluminescence in Solutions of Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86* (23), 5350-5351.
40. Polo, F.; Rizzo, F.; Veiga-Gutierrez, M.; De Cola, L.; Quici, S., Efficient Greenish Blue Electrochemiluminescence from Fluorene and Spirobifluorene Derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (37), 15402-15409.
41. Miao, W., Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (7), 2506-2553.
42. Tokel, N. E.; Bard, A. J., Electrogenerated chemiluminescence. IX. Electrochemistry and emission from systems containing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (8), 2862-2863.
43. Valenti, G.; Bruno, C.; Rapino, S.; Fiorani, A.; Jackson, E. A.; Scott, L. T.; Paolucci, F.; Marcaccio, M., Intense and Tunable Electrochemiluminescence of Corannulene. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (45), 19467-19472.
44. Zu, Y.; Bard, A. J., Electrogenerated Chemiluminescence. 66. The Role of Direct Coreactant Oxidation in the Ruthenium Tris(2,2')bipyridyl/Tripropylamine System and the Effect of Halide Ions on the Emission Intensity. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (14), 3223-3232.
45. Xu, G.; Pang, H.-L.; Xu, B.; Dong, S.; Wong, K.-Y., Enhancing the electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(ii) by ionic surfactants. *Analyst* **2005**, *130* (4), 541-544.
46. Liu, X.; Shi, L.; Niu, W.; Li, H.; Xu, G., Environmentally Friendly and Highly Sensitive Ruthenium(II) Tris(2,2' -bipyridyl) Electrochemiluminescent System Using 2-(Dibutylamino)ethanol as Co-Reactant. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (3), 421-424.
47. Miao, W.; Bard, A. J., Electrogenerated Chemiluminescence. 77. DNA Hybridization Detection at High Amplification with [Ru(bpy)₃]²⁺-Containing Microspheres. *Analytical Chemistry* **2004**, *76* (18), 5379-5386.
48. Miao, W.; Bard, A. J., Electrogenerated Chemiluminescence. 80. C-Reactive Protein Determination at High Amplification with [Ru(bpy)₃]²⁺-Containing Microspheres. *Analytical Chemistry* **2004**, *76* (23), 7109-7113.
49. <http://www.rocche.com>.
50. www.meso-scale.com.
51. Sentic, M.; Loget, G.; Manojlovic, D.; Kuhn, A.; Sojic, N., Light-Emitting Electrochemical "Swimmers". *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (45), 11284-11288.
52. Bouffier, L.; Zigah, D.; Adam, C.; Sentic, M.; Fattah, Z.; Manojlovic, D.; Kuhn, A.; Sojic, N., Lighting Up Redox Propulsion with Luminol Electrogenerated Chemiluminescence. *ChemElectroChem* **2013**.
53. Jin, E. S.; Norris, B. J.; Pantano, P., An Electrogenerated Chemiluminescence Imaging Fiber Electrode Chemical Sensor for NADH. *Electroanalysis* **2001**, *13* (15), 1287.
54. Chovin, A.; Garrigue, P.; Vinatier, P.; Sojic, N., Development of an Ordered Array of Optoelectrochemical Individually Readable Sensors with Submicrometer Dimensions: Application to Remote Electrochemiluminescence Imaging. *Analytical Chemistry* **2003**, *76* (2), 357.
55. Jaffrezic-Renault, *Chemical Sensors and Biosensors* ISTE-Wiley: London, **2012**.
56. (a) Ferguson, J. A.; Steemers, F. J.; Walt, D. R., High-Density Fiber-Optic DNA Random Microsphere Array. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (22), 5618-5624; (b) Tam, J. M.; Song, L.; Walt, D. R., DNA detection on ultrahigh-density optical fiber-based nanoarrays. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (8), 2488.

57. Epstein, J. R.; Lee, M.; Walt, D. R., High-Density Fiber-Optic Genosensor Microsphere Array Capable of Zeptomole Detection Limits. *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (8), 1836-1840.
58. www.illumina.com.
59. Descamps, E.; Duroure, N.; Deiss, F.; Leichle, T.; Adam, C.; Mailley, P.; Ait-Ikhlef, A.; Livache, T.; Nicu, L.; Sojic, N., Functionalization of Optical Nanotip Arrays with an Electrochemical Microcantilever for Multiplexed DNA Detection. *Lab on a Chip* **2013**.
60. Bakaltcheva, I. B.; Ligler, F. S.; Patterson, C. H.; Shriver-Lake, L. C., Multi-analyte explosive detection using a fiber optic biosensor. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *399* (1-2), 13-20.
61. Kuswandi, B.; Andres, R.; Narayanaswamy, R., Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes. *Analyst* **2001**, *126* (8), 1469-1491.
62. Ivask, A.; Green, T.; Polyak, B.; Mor, A.; Kahru, A.; Virta, M.; Marks, R., Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *22* (7), 1396-1402.
63. Wolfbeis, O. S., Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (12), 4269.
64. Zalvidea, D.; Díez, A.; Cruz, J. L.; Andrés, M. V., Hydrogen sensor based on a palladium-coated fibre-taper with improved time-response. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, *114* (1), 268-274.
65. Khijwania, S. K.; Tiwari, V. S.; Yueh, F.-Y.; Singh, J. P., A fiber optic Raman sensor for hydrocarbon detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *125* (2), 563-568.
66. O'Keeffe, S.; Fitzpatrick, C.; Lewis, E., An optical fibre based ultra violet and visible absorption spectroscopy system for ozone concentration monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *125* (2), 372-378.
67. Sánchez-Barragán, I.; Costa-Fernández, J. M.; Sanz-Medel, A.; Valledor, M.; Ferrero, F. J.; Campo, J. C., A ratiometric approach for pH optosensing with a single fluorophore indicator. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *562* (2), 197-203.
68. Wang, X.-D.; Wolfbeis, O. S., Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors (2008-2012). *Analytical Chemistry* **2012**, *85* (2), 487-508.
69. Kocincova, A. S.; Borisov, S. M.; Krause, C.; Wolfbeis, O. S., Fiber-Optic Microsensors for Simultaneous Sensing of Oxygen and pH, and of Oxygen and Temperature. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (22), 8486-8493.
70. Oter, O.; Ertekin, K.; Kirilmis, C.; Koca, M., Spectral characterization of a newly synthesized fluorescent semicarbazone derivative and its usage as a selective fiber optic sensor for copper(II). *Analytica Chimica Acta* **2007**, *584* (2), 308-314.
71. Leshem, B.; Sarfati, G.; Novoa, A.; Breslav, I.; Marks, R. S., Photochemical attachment of biomolecules on fibre optics for construction of a chemiluminescent immunosensor. *Luminescence* **2004**, *19* (2), 69-77.
72. Konry, T.; Novoa, A.; Shemer-Avni, Y.; Hanuka, N.; Cosnier, S.; Lepellec, A.; Marks, R. S., Optical Fiber Immunosensor Based on a Poly(pyrrole benzophenone) Film for the Detection of Antibodies to Viral Antigen. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (6), 1771-1779.
73. Liebes, Y.; Amir, L.; Marks, R. S.; Banai, M., Immobilization strategies of Brucella particles on optical fibers for use in chemiluminescence immunosensors. *Talanta* **2009**, *80* (1), 338-345.

**Chapitre 2 : Conception d'un capteur
fluorescent sur réseau de fibres optiques pour
la détection de Hg²⁺**

I.	Détection du Mercure.....	49
I.1.	Généralités, pollution et contrôle.....	49
I.2.	Méthodes de détection et de quantification du mercure	53
I.2.1.	Sondes biologiques	53
I.2.2.	Sondes chimiques	56
I.2.3.	Capteurs sur fibres optiques	60
II.	Détection de Hg ²⁺ par les dérivés de la rhodamine	62
II.1.	Dérivés de la rhodamine spirocyclique	62
II.2.	Réalisation du capteur sur fibre optique	65
II.2.1.	Présentation du système	65
II.2.2.	Détection de Hg ²⁺ en solution	66
III.	Fonctionnalisation sur le réseau	69
III.1.	Silanisation.....	69
III.2.	Photodéprotection et couplage avec la sonde	73
IV.	Détection sur le réseau.....	75

Dans ce chapitre, nous proposons une méthodologie pour la réalisation d'un capteur sur réseaux de fibres optiques modifiés en réseaux de nanopointes pour la détection du mercure Hg^{2+} . Le mercure présente une toxicité importante et sa détection et sa quantification sont donc des enjeux importants dans le domaine environnemental. L'utilisation des fibres optiques pour la conception de capteurs permet d'envisager la possibilité de réaliser une détection à distance dans un milieu confiné. Les principales qualités recherchées lors du développement d'un capteur sont la sensibilité, la sélectivité, la stabilité, un temps de réponse court et un bas coût. La combinaison de ces différents paramètres est souvent difficile à atteindre et de nombreuses techniques pour la détection du mercure existent déjà et sont décrites dans la première partie de ce chapitre. Dans ce projet, la sonde utilisée est un fluorophore dérivé de la rhodamine dont l'intensité de fluorescence augmente en présence de mercure (Hg^{2+}). L'immobilisation de cette sonde, à la surface du réseau, est réalisée par silanisation. Cette méthode a été largement étudiée et permet l'immobilisation de la sonde de façon covalente, directement sur le verre constituant la fibre. Dans ce chapitre, après avoir introduit les différentes méthodes existantes pour la détection du mercure, une étude de la sonde en solution est présentée. Ensuite, l'immobilisation de la sonde ainsi que l'utilisation du capteur ainsi obtenu seront décrites.

I. Détection du Mercure

I.1. Généralités, pollution et contrôle

Le mercure est un élément fortement toxique présent de façon naturelle dans la croûte terrestre. Il est véhiculé dans l'environnement par les volcans, les rivières et il est fortement bioaccumulé au travers de la chaîne alimentaire (Fig. 2.1). Le développement de l'industrie (les activités minières, le raffinage, les combustions fossiles...) a causé une augmentation de la concentration en mercure dans l'atmosphère par un facteur 3 à 6.¹ Cette augmentation a conduit à de sérieux problèmes environnementaux et de santé publique.

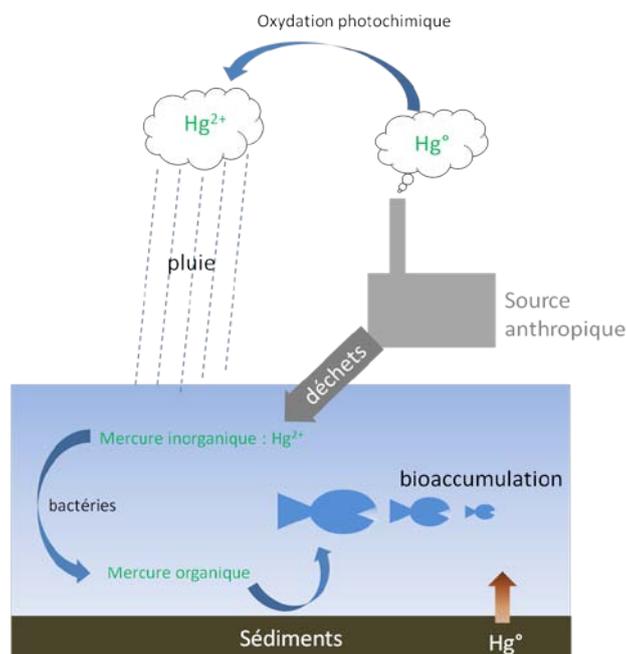


Figure 2.1 : cycle du Mercure dans l'environnement

Dans certains pays, la première cause de pollution au mercure dans l'environnement est l'orpaillage, où le mercure liquide est utilisé par les chercheurs d'or pour sa capacité à amalgamer les métaux. Le mercure est alors évaporé dans l'atmosphère sans précaution et crée des zones fortement polluées, comme en Amazonie. Les premières inquiétudes face à la pollution au mercure remontent aux années 1950, lorsque de graves cas d'empoisonnements dus à la consommation de poissons contaminés ont été découverts à Minamata au Japon. De nos jours, les principaux rejets de mercure dans l'environnement sont dus à l'activité industrielle par exemple lors de son utilisation dans les procédés de fabrication du chlore qui utilise des cathodes en mercure. Le mercure existe sous différentes formes, dont les plus communes sont le mercure élémentaire Hg^0 , le mercure ionique Hg^{2+} , et sous forme de composés de mercure organique dont le méthylmercure (CH_3Hg^+), sa forme la plus toxique.² Il peut être trouvé sous ces différentes formes et transformé dans l'une ou l'autre en fonction des conditions environnementales. Le mercure élémentaire est le seul métal qui peut être présent dans l'atmosphère sous forme gazeuse. Il pénètre le corps humain principalement par les voies respiratoires et peut facilement passer la barrière hémato-encéphalique causant de graves problèmes neurologiques. Il est facilement transformé en mercure ionique par oxydation dans l'atmosphère. Le mercure ionique Hg^{2+} existe sous formes de différents sels ou complexes (sulfure, acétate, chlorure) et est présent particulièrement dans les eaux. Dans l'eau de mer, du fait de la forte concentration en ions chlorures, on le trouve majoritairement

sous la forme de chlorure de mercure, [HgCl₄]²⁻ par exemple. Il peut pénétrer le corps humain par voie orale et peut passer la barrière gastro-intestinale en fonction de la solubilité du sel. Il ne peut pas passer la barrière hémato-encéphalique du fait de sa faible liposolubilité, mais il atteint particulièrement les reins. Le méthylmercure est formé par activité bactérienne, cette forme est la plus toxique, car elle peut facilement passer la barrière hémato-encéphalique à cause de sa forte liposolubilité. Le mercure peut donc pénétrer dans le sang par différentes voies et sous différentes formes qui sont toutes fortement bioaccumulées. L'empoisonnement au mercure est très grave et peut conduire rapidement à la mort. Les symptômes d'un empoisonnement au mercure sont multiples : nausées, diarrhées, grande fatigue, éruptions cutanées, pertes de sensations et l'attaque du système nerveux peut aller jusqu'au développement de troubles psychotiques.³ L'expression anglaise « *mad as a hatter* » (« fou comme un chapelier ») s'inspire d'ailleurs des chapeliers qui utilisaient le mercure pour la fabrication de certains matériaux pour les chapeaux. Les chapeliers présentaient alors de nombreux symptômes de l'intoxication au mercure dont l'apparition de troubles psychotiques (hallucinations...).⁴ Cette expression inspira également Lewis Carroll pour le personnage du chapelier fou dans son très fameux roman, *Alice au pays des merveilles*.

La détection du mercure dans l'environnement et sa quantification sont donc des enjeux importants. De nombreuses réglementations ont été votées au niveau mondial et européen dans le but de diminuer son utilisation et son impact sur la santé publique. En 2003, le PNUE (Programme des Nations Unies pour l'Environnement) a voté le « plan mercure » qui vise à limiter l'utilisation du mercure au niveau mondial.⁵ En 2008, la commission du parlement européen et du conseil se réunit et établit de nouvelles limites de concentration de différents polluants.⁶ Ils fixent la norme de qualité environnementale (valeur maximale autorisée) pour les composées du mercure à une valeur de 0.05 µg/L (ce qui correspond à une concentration molaire de 0.25 nM). Les quantités observées dans les eaux océaniques varient entre 2 ng/L et 90 ng/L pour les zones polluées.¹ Dans les eaux de rivière, la concentration est plus importante et peut aller jusqu'à plusieurs centaines de microgrammes par litre.

De nombreuses techniques analytiques ont été développées pour la quantification du mercure, dont les plus courantes sont la spectrométrie d'émission ou d'absorption atomique en vapeur froide⁷ (CVAAS-*cold vapor atomic absorption spectrometry* et CVAFS-*cold vapor*

atomic fluorescence spectrometry) et les techniques couplées à la spectroscopie de masse (ICP-MS-*inductively coupled plasma mass spectrometry*).⁸

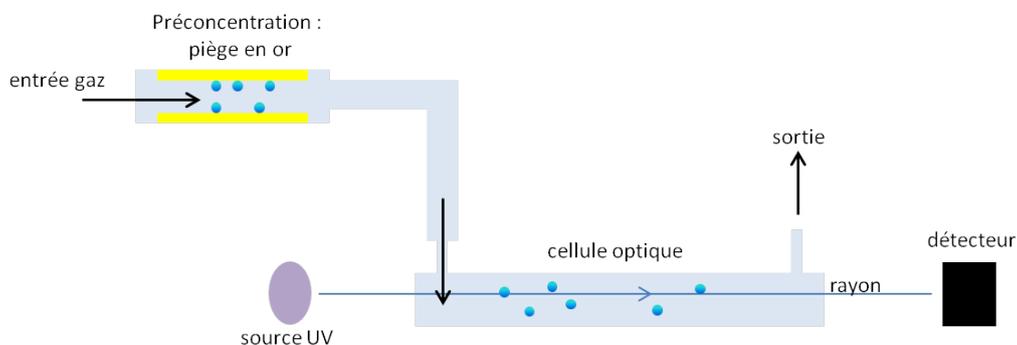


Figure 2.2 : principe de la spectrométrie d'absorption atomique en vapeur froide

La CVAAS et la CVAFS permettent de détecter les traces de mercure sous forme gazeuse. Un gaz inerte (Argon) va transporter les atomes de mercure qui seront détectés, soit par absorbance atomique (CVAAS), soit par fluorescence (CVAFS) (Fig. 2.2). L'échantillon à analyser peut être pré-concentré par l'utilisation de pièges en or, qui vont retenir le mercure qui est ensuite relâché dans le système par chauffage.

Les appareils disponibles commercialement pour la détection du mercure utilisent le plus souvent la CVAAS, qui permet de réaliser des appareils portables et qui détectent le mercure à l'état de trace. La spectroscopie de masse est une technique plus puissante, car elle permet d'atteindre une limite de détection plus basse, mais nécessite des équipements très coûteux. La plupart des analyseurs commerciaux comme par exemple le Tracker 3000 IP (de Mercury Instruments), le Hg253 portable analyzer (de Genesis Laboratory Systems), le JeromeJ405 (de TRS Environmental) ou encore le détecteur portable Mercure MVI (de ES France) permettent d'analyser des échantillons sous forme gazeuse. Le peu d'analyseurs, qui permettent d'analyser les échantillons sous forme liquide, transforment le mercure en solution (le mercure ionique ou les composés de mercure organique) en mercure élémentaire par réduction par l'intermédiaire de sels d'étain (SnCl_2) et analysent ensuite l'échantillon par la même technique que les échantillons gazeux. Ces techniques ne permettent donc pas de différencier les différentes formes de mercure et quantifient une concentration globale de mercure.

La réalisation de capteurs spécifiques reste donc un challenge actuel. La toxicité du mercure étant très forte, la difficulté dans la réalisation de capteurs pour la détection du mercure ionique réside dans la capacité à pouvoir le détecter à très faible concentration, de façon sélective, dans un milieu où de nombreux autres ions sont présents.

1.2. Méthodes de détection et de quantification du mercure

De nombreuses méthodes de détection et de quantification du mercure utilisant des sondes biologiques ou chimiques ont été développées. Dans cette partie du chapitre, quelques-unes de ces sondes sont présentées ainsi que leur utilisation dans la réalisation de capteurs. L'utilisation de fibres optiques dans ce domaine reste encore peu exploitée, mais certains exemples ont été réalisés et sont présentés ici.

1.2.1. Sondes biologiques

L'ADN se lie à l'ion Hg^{2+} et aux composés de mercure organiques. Le changement conformationnel qui en résulte peut ensuite être détecté. Le mercure se lie aux bases thymine pour former un complexe T- Hg^{2+} -T. Cette complexation n'est pas observée dans le cas d'autres métaux,⁹ ce qui permet d'utiliser cette stratégie pour le développement de capteurs sélectifs. Le mercure et l'ADN forment une structure en épingle à cheveux (*hairpin structure* en anglais), qui rapprochent les deux extrémités du brin. Ces différences conformationnelles peuvent être différenciées, par exemple, par électrophorèse capillaire puis détectées par absorption atomique (CE-ETAAS-*capillary electrophoresis with electrothermal atomic absorption spectrometry*).¹⁰ L'affinité de l'ADN pour le méthylmercure est supérieure à celle de l'éthylmercure, elle-même supérieure à celle du mercure Hg^{2+} , ce qui explique aussi leur différence de toxicité.

Une autre méthode pour détecter la formation de ce complexe est d'utiliser la spectroscopie de fluorescence en fonctionnalisant l'une des extrémités du brin par un fluorophore et l'autre par un inhibiteur de fluorescence. Le rapprochement des deux, suite à la formation de la structure en épingle à cheveux, va alors conduire à une diminution de la fluorescence par transfert d'énergie FRET (*fluorescence resonance energy transfer* - Fig.2.3).¹¹ Cette technique qui suit une diminution de fluorescence est dite « on-off ». La limite de détection de cette technique est de l'ordre de la dizaine de nanomolaires.¹¹

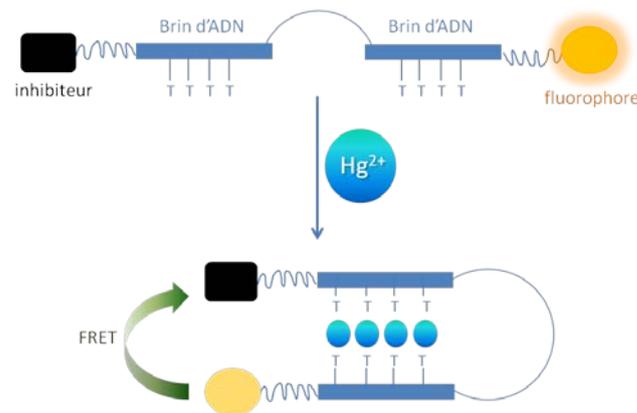


Figure 2.3 : Schéma de la structure en épingle à cheveux formée lors de la reconnaissance entre le mercure (Hg^{2+}) et les bases thymine de l'ADN et son utilisation dans la détection par FRET¹¹

A l'inverse, d'autres groupes ont développé une technique, dite « off-on » qui permet de détecter une augmentation de fluorescence avec l'addition de mercure.⁹ Dans cette méthode, la formation de la structure en épingle à cheveux va conduire à la libération du brin d'ADN complémentaire lié à l'inhibiteur de fluorescence (Fig. 2.4). L'inhibiteur est ainsi éloigné du fluorophore, le transfert d'énergie par FRET n'est donc plus possible et la fluorescence augmente. Cette technique permet de détecter des concentrations aussi basses que 10 nM en ion mercure.

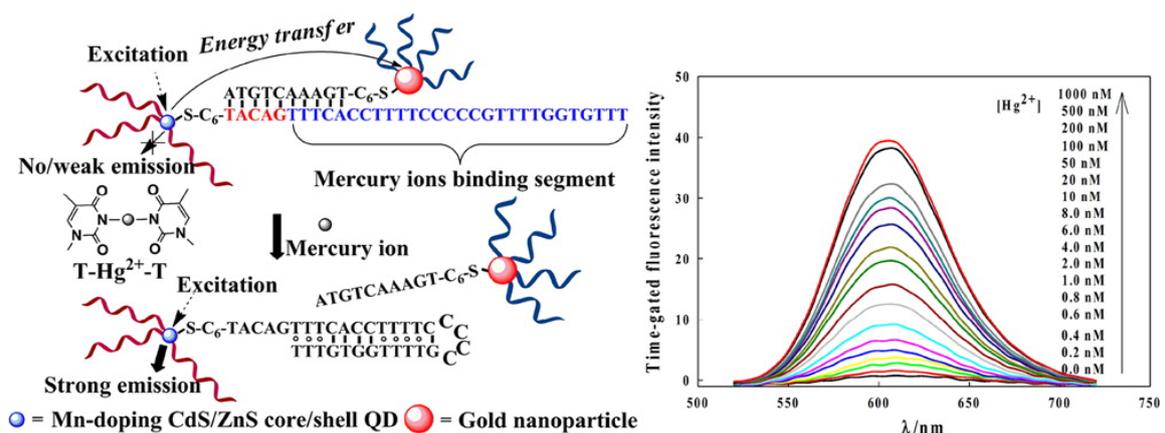


Figure 2.3 : Détection de Hg^{2+} par fluorescence en mode « off-on » : le transfert d'énergie entre la nanoparticule de Mn: Cd/ZnS et la nanoparticule d'or inhibe le signal fluorescent qui est régénéré lors de la mise en présence avec Hg^{2+} . Hg^{2+} forme un complexe avec l'ADN riche en thymine et éloigne alors l'inhibiteur du fluorophore. Spectres de fluorescence à différentes concentrations de mercure Hg^{2+} .⁹

D'autres sondes pour la détection du mercure reposent sur l'utilisation d'enzymes¹² ou même de cellules entières.¹³ Par exemple dans les travaux de l'équipe de M. Virta,^{13b} des bactéries résistantes au mercure ont été utilisées pour détecter le mercure sous sa forme de sel inorganique et de composés organiques. Comme nous l'avons vu précédemment, les bactéries jouent un rôle majeur dans le cycle du mercure puisqu'elles permettent la transformation du mercure inorganique en mercure organique. Certaines bactéries ont développé un système de résistance afin de lutter contre un environnement pollué. Ce mécanisme de défense est un mécanisme encodé génétiquement. La présence de mercure va conduire à l'expression d'une série de gènes appelée opéron *mer*.^{13b} Un opéron est un ensemble de gènes, dont l'expression va être contrôlée par un signal régulateur (ici la présence de mercure). L'opéron *mer* a été largement étudié. Le gène *merR* permet d'exprimer la protéine régulatrice *MerR* qui en absence de mercure va inhiber la traduction des gènes de l'opéron. Après liaison avec le cation Hg²⁺, la conformation du complexe *MerR*-Hg²⁺ change et l'expression de la série de gènes nécessaires à la détoxification devient effective. Le procédé de détoxification passe par la réduction du cation Hg²⁺ en Hg⁰ par la *mercury reductase* qui résulte de l'expression du gène *merA*. Le mercure Hg⁰ est très volatil et s'échappe alors de la cellule sous forme gazeuse. L'*organomercurial lyase* provient de l'expression du gène *merB* et permet de rompre la liaison entre le mercure et le carbone des composés de mercure organiques. Le mercure sous forme Hg²⁺ peut alors être réduit en Hg⁰ et être éliminé de la cellule. L'expression des autres gènes de l'opéron permettent de faciliter le transport du mercure au sein de la cellule grâce à des protéines présentant des groupements cystéines, qui ont une forte affinité pour Hg²⁺. L'opéron *mer* s'exprime donc spécifiquement en présence de mercure et cette série de gènes a été utilisée dans différentes technologies, par exemple, pour développer des procédés de détoxification,¹⁴ ainsi que pour la réalisation de capteurs. Dans un capteur bactérien, l'expression d'un gène « rapporteur » est contrôlée par une unité de régulation génétique, qui va répondre à la présence de l'analyte (concept récepteur-rapporteur).¹⁴ La sensibilité et la spécificité de la sonde vont donc dépendre principalement de l'unité de régulation. Dans ce travail, le gène *merR* de l'opéron a été utilisé pour contrôler l'expression du gène rapporteur de la luciférase (*lucFF*). La luciférase va émettre un signal lumineux quantifiable. La bactérie est capable de détecter le mercure jusqu'à des concentrations de l'ordre du nanomolaire.

D'autres exemples de systèmes biologiques utilisés pour la détection du mercure ont été immobilisés sur les réseaux de fibres optiques et seront présentés dans la partie I.2.3. L'ensemble des sondes biologiques apportent de nombreux avantages, comme des limites de détection basses, un matériel analytique peu coûteux et une facilité de préparation des échantillons. Mais ils présentent un certain nombre de limitations, comme des problèmes de stabilité des échantillons, de réversibilité ou encore de temps de réponse longs.

1.2.2. Sondes chimiques

Contrairement aux sondes biologiques, les sondes chimiques offrent une stabilité plus importante. La plupart des capteurs chimiques utilisent les mesures de fluorescence pour les nombreux avantages liés à cette technique (bonne sensibilité, mesure en temps réel et facilité expérimentale).

La présence de mercure peut être quantifiée en suivant une augmentation de la fluorescence (mode « off-on »),^{15,16,17} ou une diminution (mode « on-off »).¹⁸ L'utilisation de sondes dites « off-on » est souvent favorisée pour leurs meilleures sensibilités. Elles peuvent également être envisagées pour le suivi de la concentration de mercure en milieu biologique, par exemple dans un échantillon de cellules.^{19,20} Les sondes en mode « off-on » utilisent des fluorophores dont la fluorescence est inhibée par une modification structurale (par exemple une interruption dans la conjugaison) et dont la fluorescence est retrouvée en présence de la cible (Hg²⁺), par l'intermédiaire de réactions chimiques. La plupart de ces réactions reposent sur la forte affinité entre le soufre et le mercure ce qui permet de concevoir des sondes sélectives.

Une grande gamme de composés dérivés de la rhodamine a été développée pour la réalisation de capteurs à mercure. La rhodamine spirocyclique, par exemple, a été utilisée dans le cadre de cette thèse et sera développée plus en détails dans la deuxième partie de ce chapitre.

D'autres composés fluorescents sont utilisés comme sondes pour la détection du mercure comme par exemple le BTBAN (4-(bis(2-(éthylthio)éthyl)amino)-N-n-butyl-1,8-naphthalimide) (Fig. 2.4).¹⁵ Dans cette étude, le fluorophore a été conçu pour intégrer deux approches simultanément : le transfert de charge photo-induit (PET-*photoinduced electron transfer*) et le transfert de charge intramoléculaire (ICT-*intramolecular charge transfer*). Ces deux effets sont observables à l'œil nu (Fig. 2.4).

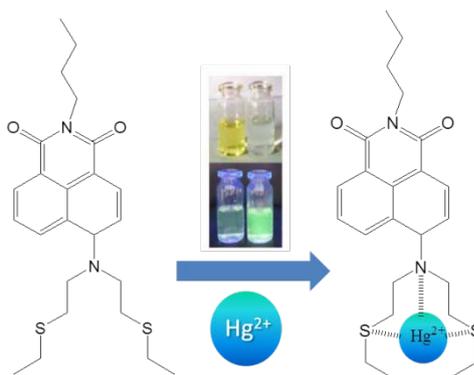


Figure 2.4 : Mode de complexation du mercure par le BTBAN¹⁵

Le PET est le système le plus couramment employé dans la réalisation de sondes. La complexation du métal induit une augmentation de l'intensité de fluorescence, mais ce type de système est souvent sensible au pH. Dans le système présenté sur la figure 2.4, la désactivation du fluorophore est due au doublet de l'azote qui peut transférer un électron au fluorophore lors de la génération de l'état excité, ce qui conduit à l'inhibition de la fluorescence. Lors de la complexation du métal, la densité électronique de l'azote est attirée vers le cation et le doublet est donc moins disponible pour faire le transfert, ce qui conduit à une augmentation de la fluorescence. La protonation pourra conduire à un effet similaire d'où la sensibilité au pH. Dans l'approche ICT, c'est un effet chromique qui est observé : la complexation du mercure va induire le changement de couleur de la solution. Ce changement de couleur peut être suivi par le déplacement de la longueur d'onde d'absorbance ou d'émission, mais ce type de sonde ne présente souvent pas d'augmentation du signal fluorescent. La combinaison des avantages de ces deux approches permet de réaliser une sonde sensible et sélective, capable de détecter le mercure entre 10 μM et 100 μM .

D'autres technologies ont été développées pour la quantification du mercure. Par exemple, l'utilisation de membranes sol-gel fonctionnalisées avec des porphyrines.¹⁸ Le mercure peut être complexé au cœur de la porphyrine, ce qui conduit au *quenching* de sa fluorescence. Cette diminution est proportionnelle à la concentration de mercure et la limite de détection est de l'ordre de quelques micromolaires.

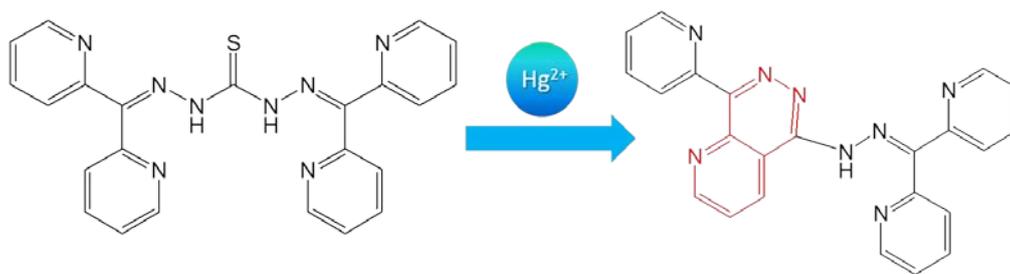
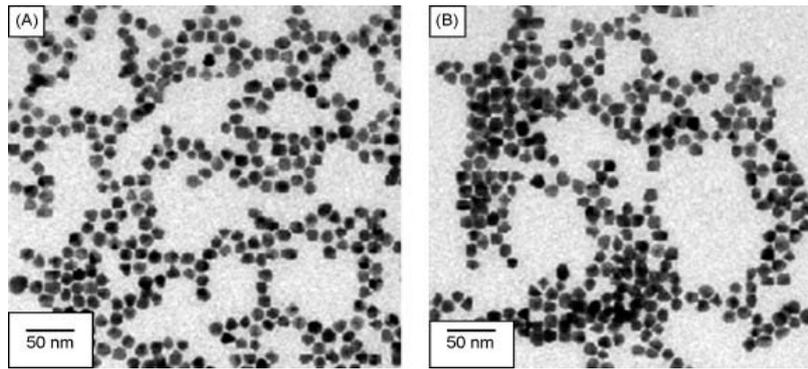


Figure 2.5 : Cyclisation par désulfuration induite par la présence de Mercure (Hg^{2+})¹⁶

La très forte affinité du mercure pour le soufre permet de concevoir des sondes qui reposent sur une réaction chimique de désulfuration, comme par exemple, dans les travaux de Zhao (Fig. 2.5).¹⁶ La réaction avec le mercure va permettre la cyclisation et l'apparition d'un signal fluorescent.

Bien que la fluorescence soit la méthode majoritairement utilisée pour le développement de sondes à mercure, de nombreuses autres techniques ont été utilisées dans ce but, comme par exemple les mesures potentiométriques. Les électrodes sélectives au mercure utilisent des membranes qui vont laisser passer uniquement les ions mercures. Ces membranes sont le plus souvent des membranes de PVC (polychlorure de vinyle) fonctionnalisées avec des porphyrines,²¹ des dérivés d'éthers couronnes thia-substitués,^{22,23,24} ou encore des calixarènes.²⁵ Ces techniques permettent de détecter des concentrations de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-1} M, mais ne sont pas des techniques hautement sélectives.¹⁸ L'utilisation d'électrodes sélectives sera présentée plus en détails dans le chapitre 3 (paragraphe I.1).

La grande affinité entre le mercure élémentaire et l'or a également permis l'élaboration de nouvelles technologies. L'adsorption du mercure à la surface de l'or va modifier ses propriétés. Ces modifications peuvent être détectées par différentes voies, par exemple : en conductimétrie,²⁶ en mesures d'onde acoustique de surface (SAW-Surface Acoustic Wave),² en mesures piézoélectriques²⁷ ou encore par l'utilisation de micro-leviers. Les micro-leviers en or adsorbent le mercure, sous forme gazeuse ou ionique, ce qui induit une courbure du micro-levier et l'angle de cette courbure est relié à la concentration en mercure.²⁸ Cette méthode permet de mesurer des concentrations très faibles (10^{-11} M), mais le temps de mesure est long. Le micro-levier se déforme vite, mais atteint une position stable seulement après une heure de mise en contact avec la solution. De plus, chaque micro-levier ne peut être utilisé que pour une seule mesure.



*Figure 2.6 : Images TEM de particules d'or fonctionnalisées avec la rhodamine en absence (a) et en présence (b) de Hg^{2+} .*²⁹

A l'échelle nanométrique, l'or ne possède pas les mêmes propriétés par rapport à l'échelle macroscopique. Une solution de nanoparticules d'or absorbe la lumière dans le domaine du visible. Ce phénomène s'appelle la résonance de plasmon de surface et apparaît dans le cas où la longueur d'onde de l'onde incidente est beaucoup plus grande que le diamètre des nanoparticules. Le nuage électronique des particules va alors subir le champ électromagnétique de l'onde et les électrons vont osciller en phase. Lorsque la longueur d'onde de l'onde incidente et celle des oscillations du nuage électronique sont similaires, il se produit un phénomène de résonance et la solution absorbe alors à cette valeur de longueur d'onde. Dans le cas de l'or, la fréquence de résonance est dans le domaine du visible, ce qui donne la couleur rouge à la solution. Avec l'adsorption du mercure, la longueur d'onde maximale d'absorption des nanoparticules est modifiée, ce qui permet de détecter et de quantifier le mercure présent en solution.³⁰

La fonctionnalisation de nanoparticules d'or avec un fluorophore (par exemple la rhodamine) permet également de détecter la présence de mercure. La fluorescence est inhibée à cause de la proximité entre le fluorophore et la nanoparticule. Lors de l'adsorption du mercure, la rhodamine est décrochée de la surface de l'or et retrouve alors ses propriétés fluorescentes.²⁹ On observe alors une augmentation du signal fluorescent en présence de mercure. Simultanément, on peut observer en microscopie TEM (Fig. 2.6) que les nanoparticules ont tendance à s'agréger du fait de l'affinité entre le mercure et l'or. Ce système est très sensible, il permet de déterminer des concentrations très faibles (10^{-11} M).

1.2.3. Capteurs sur fibres optiques

L'éventail non-exhaustif des techniques utilisées pour la conception de capteurs pour la détection du mercure présenté dans ce chapitre démontre l'intérêt et l'impact de ces recherches dans le domaine analytique. Les techniques présentées possèdent toutes leurs avantages (limite de détection, facilité à mettre en œuvre, équipement peu coûteux...) et leurs limitations (stabilité, temps de réponse...). Cependant, parmi les nombreuses techniques développées, très peu d'entre elles utilisent l'immobilisation de la sonde sur un support solide. Dans le travail présenté dans cette thèse, nous avons choisi d'immobiliser deux types de sondes à la surface de réseaux de fibres optiques. L'utilisation des réseaux de fibres optiques offre de nombreux avantages déjà discutés précédemment. Notamment la détection à distance, dans un milieu confiné, représente un challenge encore très peu exploré et relativement nouveau. Il est pourtant très intéressant de développer de tels capteurs, par exemple, pour la détermination de la concentration du mercure dans un milieu inaccessible ou dangereux. De plus, la plupart des capteurs réalisés permettent de déterminer la concentration en mercure en milieu abiotique. On peut imaginer que l'utilisation de réseaux de fibres optiques permettrait également de réaliser des capteurs capables de mesurer la présence de mercure biotique, par mesures *in vivo* peu invasives, grâce au faible diamètre de ces réseaux.

Quelques capteurs à mercure utilisant la technologie des fibres optiques ont déjà été développés. Par exemple, l'équipe de R. S. Marks¹² a proposé l'immobilisation de bactéries à la surface d'une fibre optique (Fig. 2.7).

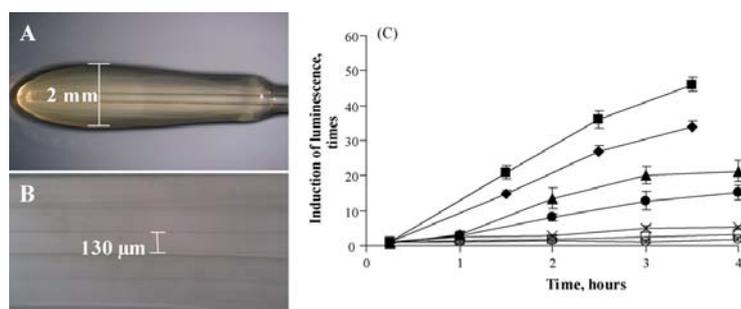


Figure 2.7 : a) et b) photographies du biocapteur à mercure utilisant des bactéries immobilisées dans une matrice d'alginate c) réponse en luminescence du biocapteur avec différents nombres de couches de dépôt de bactéries: 6(♦), 7(■), 8(▲), 9(●), 10(×), 11(□) ou 12(○) en fonction du temps d'exposition à Hg^{2+} ¹²

Dans ces travaux, plusieurs couches de bactéries immobilisées dans une matrice solide à base d'alginate sont déposées autour de la fibre. Sur la figure 2.7c), on peut voir l'augmentation du signal bioluminescent de ces bactéries en fonction du nombre de couches

de bactéries et du temps d'incubation. L'équipe de D. Walt a également publié l'utilisation des réseaux de micropuits pour renfermer des bactéries modifiées qui répondent à la présence de mercure par un signal luminescent.³¹ Ces biocapteurs présentent l'avantage d'avoir une très faible limite de détection, mais présentent aussi quelques inconvénients comme un temps d'incubation long, une faible stabilité et une faible sélectivité.

Un autre biocapteur très performant utilise les brins d'ADN³² immobilisés de façon covalente à la surface de la fibre (Fig. 2.8).

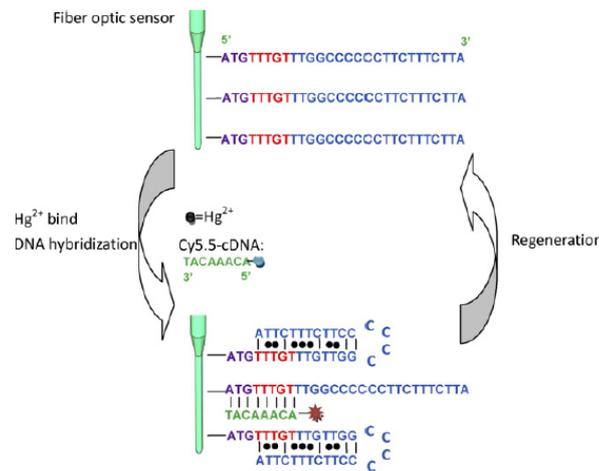


Figure 2.8 : Capteur à mercure sur fibre optique modifiée avec plusieurs copies d'un brin d'ADN. La complexation de Hg^{2+} forme la structure en épingle à cheveux et libère le brin d'ADN complémentaire fluorescent³²

La formation de la structure en épingle à cheveux due à la formation des complexes (T-Hg-T) bloque les brins d'ADN, qui ne peuvent plus être hybridés avec le brin marqué par le fluorophore. La présence de mercure va donc conduire à une diminution de la fluorescence. Cette diminution de fluorescence est proportionnelle à la concentration de mercure et la limite de détection de ce biocapteur est de 2.1 nM. De plus, ce capteur peut être régénéré avec un surfactant qui va permettre de décomplexer les ions mercure et donc de libérer les brins d'ADN.

Un dernier exemple porte sur l'utilisation de nanoparticules d'or déposées sur l'enveloppe d'une fibre optique (Fig. 2.9).³³

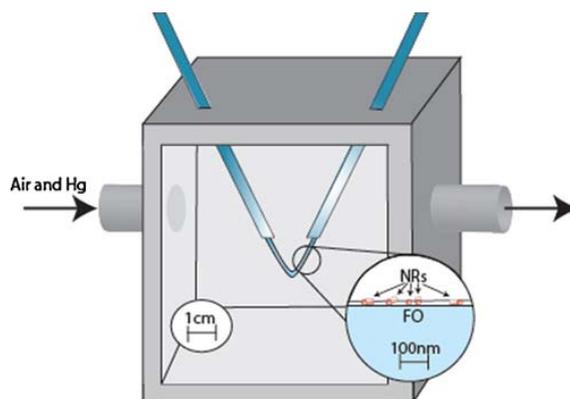


Figure 2.9 : Capteur à mercure sur fibre optique modifiée avec des nanoparticules d'or³³

Ces particules absorbent les ondes électromagnétiques dans le domaine visible du spectre de la lumière et cette absorbance est fortement sensible aux changements de composition des particules d'or (cf. I.2.2). Le mercure sous forme gazeuse va s'adsorber sur les nanoparticules et comme dans l'exemple présenté précédemment,³⁰ cette adsorption va modifier la fréquence de résonance de plasmon de surface. Le décalage en longueur d'onde du spectre d'absorbance des particules va alors permettre de quantifier le mercure présent dans le milieu. Ce capteur chimique est limité à la détection du mercure élémentaire en milieu gazeux et présente une limite de détection de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$

II. Détection de Hg^{2+} par les dérivés de la rhodamine

II.1. Dérivés de la rhodamine spirocyclique

Une grande gamme de composés dérivés de la rhodamine a été utilisée afin de développer des capteurs de types « off-on » pour détecter le mercure. Le fluorophore dont la structure est modifiée pour inhiber ses propriétés peut retrouver sa fluorescence suite à différentes réactions chimiques en présence de mercure : cyclisation,³⁴ hydrolyse,³⁵ ouverture de cycle¹⁹, mercuration,³⁶ désulfuration¹⁶, élimination²⁰... La rhodamine est un fluorophore communément utilisé pour ses bonnes propriétés spectroscopiques (coefficient d'extinction molaire, rendement quantique d'émission et stabilité photochimique).

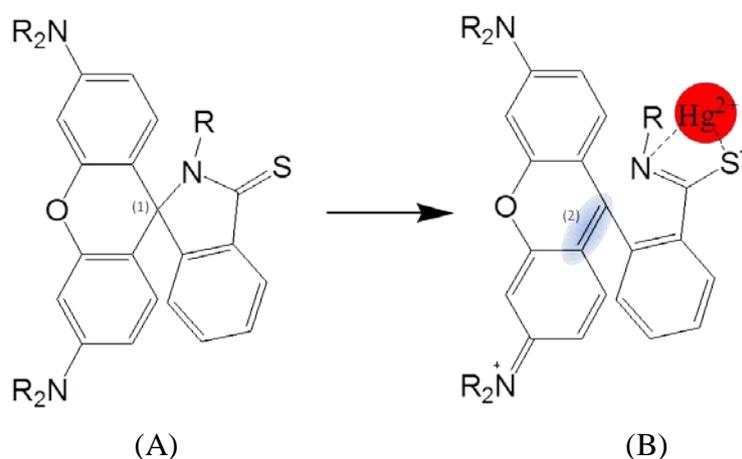


Figure 2.10 : schéma de la rupture de la forme spirocyclique de la rhodamine dans le mécanisme de reconnaissance avec le mercure

La rhodamine sous forme spirocyclique (A) n'est pas fluorescente. La forme spirocyclique correspond à la forme « fermée » où les deux cycles sont joints par un seul atome ici le carbone (1) (Fig. 2.10). Après complexation du mercure Hg^{2+} par les atomes donneurs de la molécule (soufre et azote), le cycle à 5 est ouvert et une double liaison (2) est créée pour restaurer l'aromaticité. La rhodamine (B) retrouve alors sa fluorescence.

De nombreux exemples de ces sondes sont décrits dans la littérature^{19, 37, 38, 39} La figure 2.10 en présente deux exemples.³

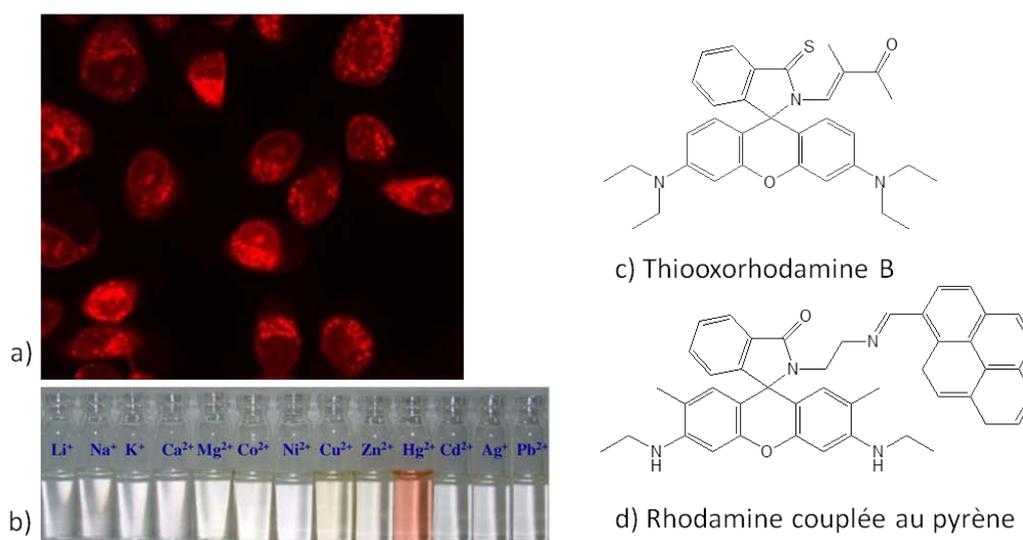


Figure 2.11 : a) image en microscopie fluorescence confocale de cellules vivantes incubées avec la rhodamine c) et mises en présence de mercure¹⁹ b) effet chromatique du mercure sur la rhodamine d)³⁷

Les solutions de ces composés, initialement incolores, prennent une teinte rose après la complexation avec le mercure du fait de l'ouverture du spirocycle de la rhodamine. Dans la figure 2.11b, différentes solutions de la rhodamine couplée au pyrène (Fig. 2.11d) ont été mises en présence de différents cations. On observe le changement de couleur, visible à l'œil nu, seulement en présence de mercure. Simultanément, l'augmentation de la fluorescence est observée et permet de quantifier la concentration en mercure entre $0.1 \mu\text{M}$ et plusieurs dizaines de micromolaires.³ Les propriétés de certains de ces composés les rendent compatibles pour une utilisation en biologie.^{19,40} Sur la figure 2.11a, par exemple, un échantillon de cellules incubées avec la Thioxorhodamine B (Fig. 2.11c) a été mis en présence de mercure. On observe un signal fluorescent en microscopie confocale correspondant à la rhodamine, qui a réagit avec le mercure présent dans les cellules. Ces sondes ont surtout été développées pour réaliser des études en solution et très peu ont été immobilisées sur un support solide.^{41,42,43,44}

Un exemple récent présente l'immobilisation d'un dérivé de la rhodamine sur papier filtre en cellulose (Fig. 2.12).⁴⁴ L'immobilisation de la sonde est réalisée en trois étapes et permet de lier la rhodamine de façon covalente au papier. Le capteur ainsi obtenu permet de détecter de façon sélective le cation Hg^{2+} jusqu'à des concentrations de $50 \mu\text{M}$.

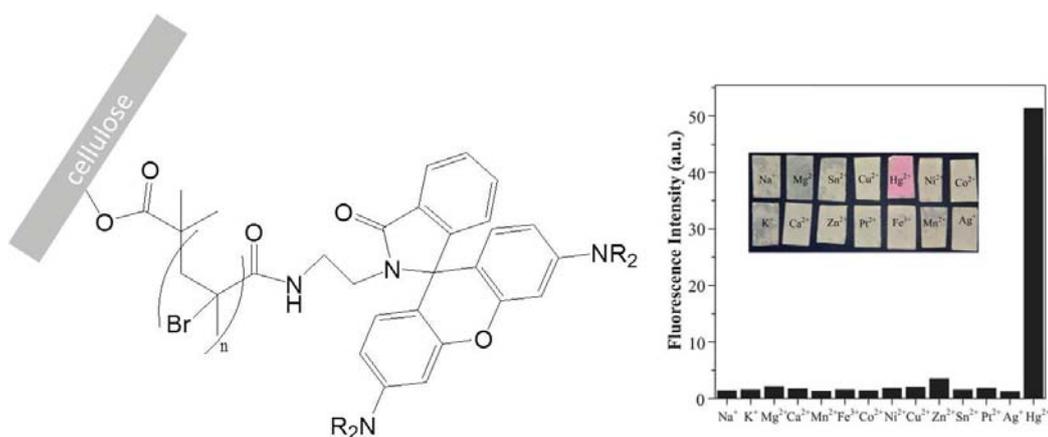


Figure 2.12 : rhodamine spirocyclique immobilisée sur papier filtre en cellulose pour la détection du mercure Hg^{2+} ⁴⁴

La formation de monocouches auto-assemblées (SAM-Self assembled monolayer) a également été étudiée. Par exemple la formation de monocouches de thiols à la surface du platine,⁴¹ ou encore l'utilisation de la silanisation.^{43,42} La silanisation sera décrite en détails plus loin, puisque c'est la stratégie qui a été employée dans les travaux présentés dans ce chapitre.

Bien que certains exemples existent dans la littérature, la réalisation de capteurs utilisant ces dérivés de la rhodamine reste tout de même encore peu explorée et pour la première fois l'immobilisation sur fibre optique a été réalisée au cours de cette thèse.

II.2. Réalisation du capteur sur fibre optique

II.2.1. Présentation du système

La sonde **A**, utilisée pour la réalisation de ce capteur (Fig. 2.12), a été conçue pour répondre aux critères suivants : (1) la sonde doit présenter une bonne affinité pour le cation Hg^{2+} , (2) d'autres sites de chélation doivent être présents pour avoir un système présentant une bonne sensibilité et (3) l'étape de fonctionnalisation sur le réseau doit permettre de modifier le réseau de façon efficace et homogène.

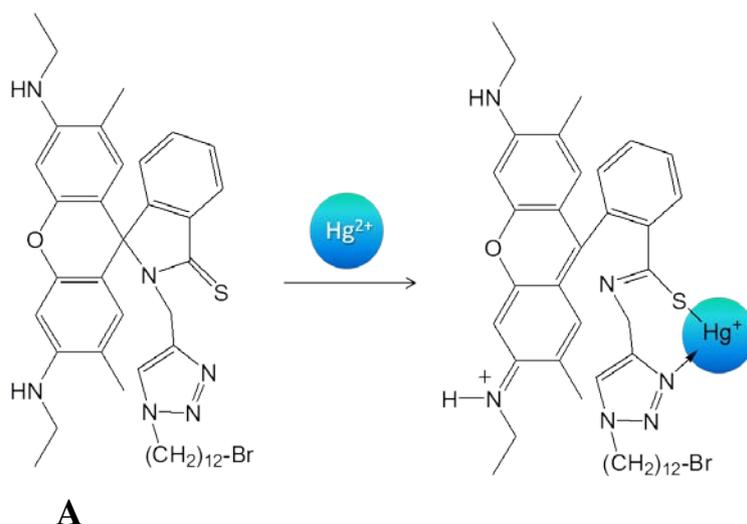


Figure 2.12 : sonde **A** utilisée pour l'immobilisation sur le réseau de fibres optiques et mode de coordination proposé pour le mercure

La présence du soufre permet de remplir le premier critère, puisqu'il a une grande affinité avec le mercure Hg^{2+} . Pour satisfaire le deuxième critère, l'utilisation de la réaction de chimie click conduit à de bons rendements, mais également à l'insertion du cycle triazole, qui est un site de coordination supplémentaire pour favoriser la coordination du mercure.

La stratégie choisie pour immobiliser la sonde à la surface du réseau de fibres optiques est la silanisation d'un composé portant un groupe photo-labile **B** (nitrovératryloxy-carbonyl,

NVOC) qui peut être déprotégé et post-fonctionnalisé par réaction de couplage avec un ester activé (Fig. 2.13).

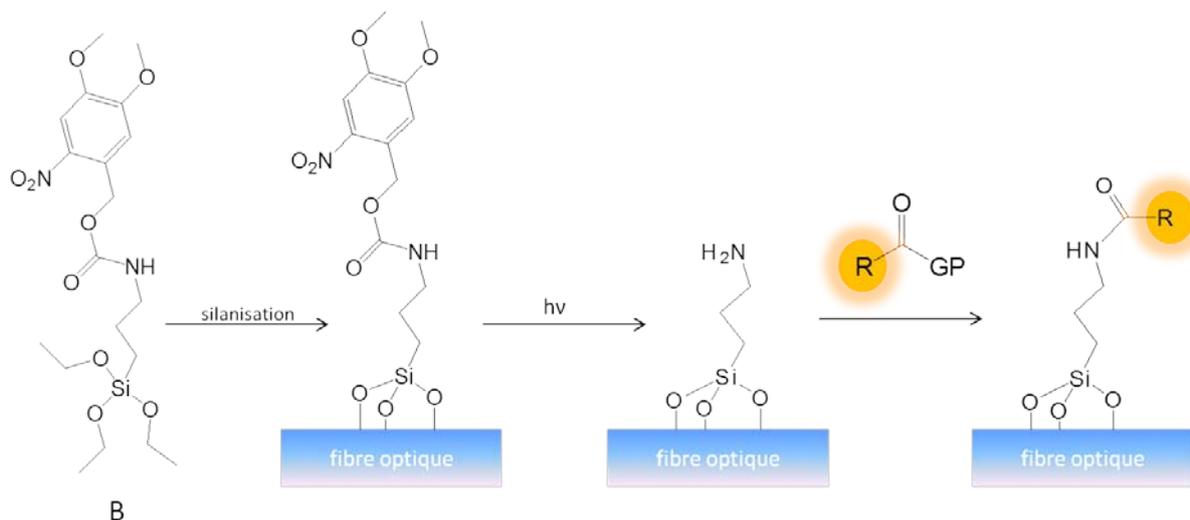


Figure 2.13 : Schéma de la photo-déprotection et fonctionnalisation de la molécule **B** à la surface du réseau (GP =groupe partant, R = fluorophore)

La première étape consiste à immobiliser la molécule **B** à la surface par silanisation (cf. III.1). Cette étape permet de recouvrir uniformément le réseau de fibres en créant des liaisons covalentes entre le silane et la surface de verre des fibres optiques. Ensuite, la photodéprotection du groupement NVOC va permettre de libérer la fonction amine à la surface (cf. III.2). Pour finir, la fonction amine peut être fonctionnalisée avec une sonde présentant une fonction acide carboxylique (cf. III.2). L'utilisation de cette molécule photo-labile permet d'une part de protéger la fonction amine pendant la silanisation, mais présente également un intérêt pour la réalisation d'un capteur multianalyte en fonctionnalisant le réseau avec différentes sondes (voir Chapitre 3).

II.2.2. Détection de Hg^{2+} en solution

Avant d'être immobilisée sur le réseau de fibres, la sonde **A** a été étudiée en solution. Les spectres d'absorbance et de fluorescence ont été mesurés en présence de différents cations métalliques. Sur le spectre d'absorbance (Fig. 2.14a), on voit apparaître une bande d'absorbance à 527 nm correspondant à l'ouverture de la rhodamine spirocyclique, en présence de mercure uniquement. La rhodamine spirocyclique a été largement étudiée pour la détection de cations et de nombreuses sondes utilisent ce groupement.^{19, 37, 38, 41, 42, 43, 44} Ces sondes présentent certains avantages, comme par exemple, la possibilité d'être régénérées, en

reformant le cycle, par réaction avec la soude⁴¹ ou par l'ajout de Na_2S qui permet de complexer le mercure.¹⁹

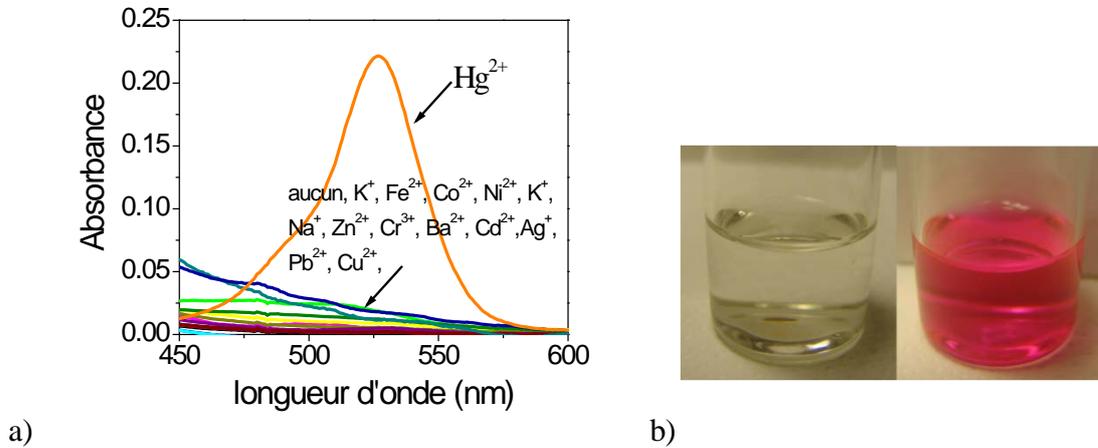


Figure 2.14 : a) spectre d'absorbance de la sonde A en présence de différents cations b) photographie d'une solution de A en absence (gauche) et en présence (droite) de Hg^{2+} ⁴⁵

La complexation du mercure est observable à l'œil nu par un changement de couleur de translucide à rose (Fig. 2.14b). L'ouverture du cycle en présence de mercure permet à la rhodamine de retrouver son aromaticité et conduit à cet effet chromique. Simultanément, le retour à l'aromaticité induit une augmentation de fluorescence, également observable à l'œil nu (Fig.2.15b).

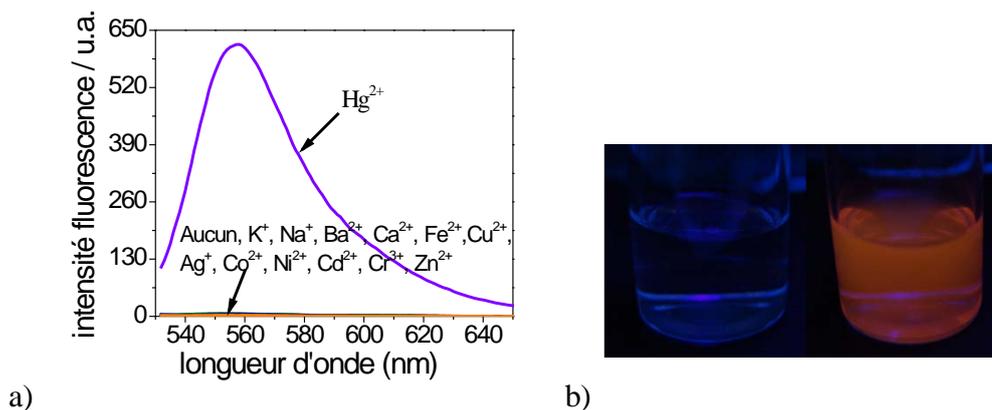


Figure 2.15 : a) spectre d'émission de la sonde A en présence de différents cations $\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$ b) photographie d'une solution de A sous lampe UV en absence (gauche) et en présence (droite) de Hg^{2+} ⁴⁵

Sur le spectre d'émission, la complexation du mercure par la sonde A est suivie par l'apparition de la bande à 556 nm. Cette augmentation est mesurée en présence de mercure, alors qu'aucune augmentation n'est observée en présence des autres cations testés (K^+ , Na^+ ,

Ba^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} et Cu^{2+}). De plus, une expérience de compétitivité a démontré que la présence des autres ions n'altère pas l'intensité du signal fluorescent (Fig. 2.16a). La bonne sélectivité pour le mercure s'explique par le remplacement de l'oxygène de la fonction amide par un atome de soufre. Avec l'oxygène, la rhodamine spirocyclique peut interagir avec d'autres cations, comme par exemple le Cu^{2+} .⁴¹

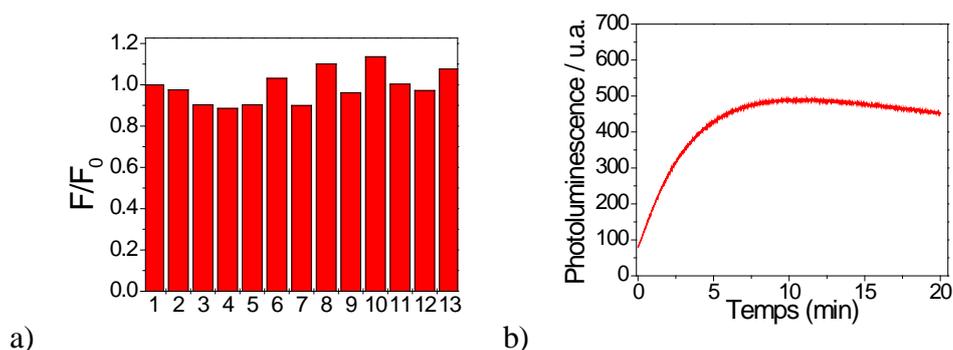


Figure 2.16: a) expérience de compétitivité avec la sonde A en présence de mercure et d'autres cations (1, aucun ; 2, Zn^{2+} ; 3, Co^{2+} ; 4, Ni^{2+} ; 5, Cr^{3+} ; 6, Cd^{3+} ; 7, Cu^{2+} ; 8, Pb^{2+} ; 9, Na^+ ; 10, K^+ ; 11, Ba^{2+} ; 12, Ag^+ ; 13, Fe^{2+}), $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$ b) cinétique de réponse de la sonde A en présence de mercure⁴⁵

L'étude cinétique (Fig. 2.16b) montre que la réaction est complète après un temps de mise en contact avec le mercure de 10 min. La plupart des dérivés de la rhodamine spirocyclique présente des temps de réponse plus longs (de l'ordre de 30 minutes),^{41, 42} mais il a été démontré que l'ajout de sites de coordination d'augmente l'affinité entre le cation et la sonde et permet ainsi de diminuer les temps de réponses de la sonde.⁴² Par exemple, la rhodamine étudiée dans les travaux de l'équipe de Y. Qian¹⁹ présente quatre sites de coordination ce qui lui permet d'avoir un temps de réponse de seulement quelques minutes. Dans nos travaux, la présence du groupement triazole permet d'expliquer également ce temps de réponse relativement court par rapport aux autres systèmes détaillés dans la littérature.

A partir de ces différents résultats, une courbe de calibration a pu être réalisée. Pour une concentration de la sonde égale à $10 \mu\text{M}$, l'intensité du signal fluorescent à 556 nm augmente 35 fois en passant de $10 \mu\text{M}$ à $250 \mu\text{M}$ de Hg^{2+} (Fig. 2.17).

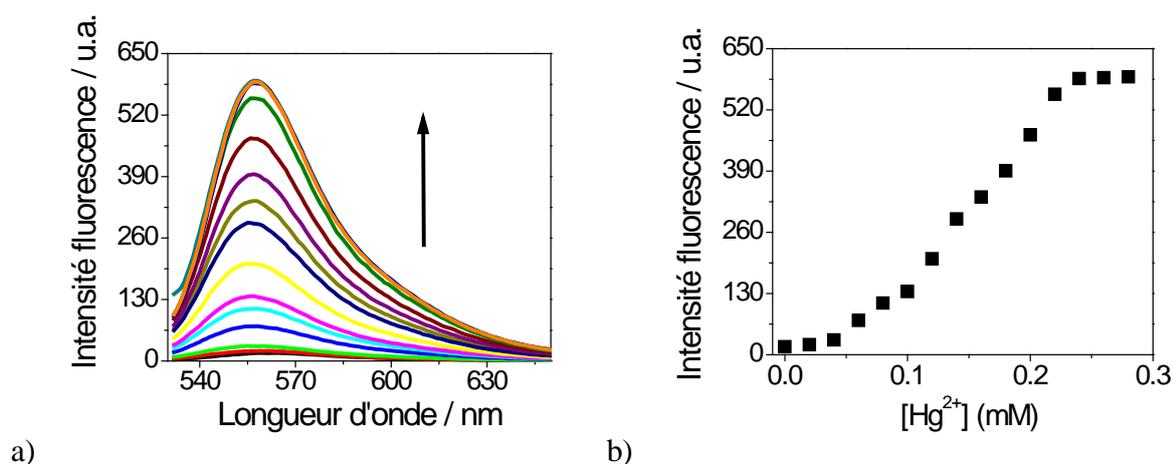


Figure 2.17 : a) spectre de fluorescence de **A** en présence de différentes concentrations de Hg^{2+}

b) titrage de Hg^{2+} avec la sonde **A** ($10\mu\text{M}$)⁴⁵

La sonde **A** permet donc de quantifier le mercure de façon sélective dans une certaine gamme de concentrations. Ce système a donc été choisi pour être immobilisé à la surface d'un réseau de fibres optiques pour la réalisation d'un capteur, capable de détecter le mercure à distance.

III. Fonctionnalisation sur le réseau

III.1. Silanisation

Le matériau des fibres utilisées est composé de silice (SiO_2). En conséquence, la méthode choisie pour fonctionnaliser ces réseaux avec la sonde **A** est la silanisation.

La réalisation de capteurs avec la rhodamine par silanisation a déjà été décrite dans la littérature.^{43, 42} Par exemple, dans les travaux présentés sur la figure 2.18,⁴³ l'immobilisation d'un dérivé de la rhodamine a été réalisée sur une fine couche de silice déposée à la surface d'une plaque en quartz. La détection du mercure dans ces travaux est réalisée par fluorescence par l'intermédiaire d'un transfert d'énergie FRET et la limite de détection est de $1\mu\text{M}$. Sur l'image de la figure 2.18, on observe que la complexation du mercure est visible à l'œil nu. La silanisation est donc une méthode adaptée pour la réalisation de ce type de capteur et nous avons choisi cette stratégie pour immobiliser notre sonde à la surface du réseau.

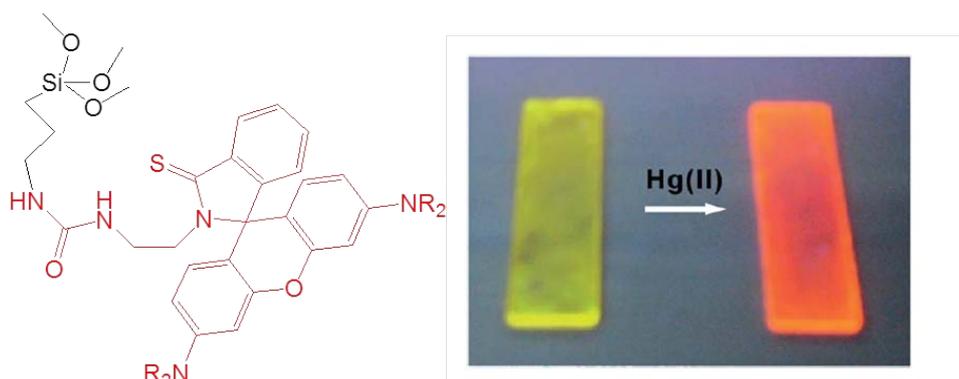


Figure 2.18 : immobilisation d'un dérivé de la rhodamine spirocyclique sur plaque en quartz et mise en présence avec le mercure⁴³

La silanisation est une méthode courante utilisée pour fonctionnaliser les surfaces présentant des groupements hydroxyles dont la silice, l'alcool polyvinylique, les oxydes de zinc ou de fer ou encore l'ITO (oxyde d'indium dopé à l'étain).⁴⁶ La silanisation est une méthode de formation de monocouches auto-assemblées (SAM – *Self-Assembled Monolayers*). Comme les monocouches de thiols à la surface de substrats d'or, ces procédés permettent de fonctionnaliser des échantillons solides en formant une couche unique de molécules qui modifie les propriétés de la surface de ces matériaux. Le développement des SAM, comme tous les procédés de nanofabrication en général, est un domaine de recherche important et est utilisé dans de nombreuses applications industrielles (panneaux photovoltaïques, capteurs...).⁴⁶ Les SAM sont à la fois utilisées pour passiver des surfaces réactives, mais également comme plateforme moléculaire pour le développement de technologies dites « bottom-up »,⁴⁷ qui consistent à modifier un objet à petite échelle et à en exploiter les propriétés à l'échelle macroscopique.

Le principal intérêt des SAM de silanes est la nature covalente de la liaison entre la sonde et la surface, qui apporte une très bonne stabilité au système.⁴⁷ Cette bonne stabilité permet de manipuler les objets fonctionnalisés plus facilement et d'envisager des modifications multi-étapes qui n'endommageront pas la surface.

Les molécules utilisées dans les procédés de dépôts de monocouches auto-assemblées sont des molécules amphiphiles et se décomposent en trois parties : une extrémité qui aura pour rôle d'interagir avec la surface et qui doit donc avoir une bonne affinité avec le substrat, une chaîne carbonée qui permet d'organiser les molécules et la « tête » présentant la fonction chimique désirée.⁴⁶

L'assemblage de molécules de type silanes est plus difficile que celui de thiols sur l'or mais apporte une stabilité physique et chimique plus importante. Les premiers résultats sur le développement des techniques de silanisation ont été publiés par l'équipe de J. Sagiv dans les années 1980.⁴⁸

Bien que ces méthodes aient été largement utilisées, le mécanisme de formation de la couche de silanes reste encore un sujet à débat. En fonction des conditions expérimentales utilisées, le silane peut être déposé sur différentes épaisseurs depuis la monocouche jusqu'au film d'une épaisseur de plusieurs centaines de nanomètres.

Plusieurs paramètres tels que le solvant, le vieillissement de la solution, la température et la présence d'eau vont avoir un rôle important sur les propriétés finales du film.⁴⁷ Bien que de nombreuses études sur l'influence de ces paramètres aient été publiées, les méthodes de silanisation ne sont pas parfaitement reproductibles et il reste difficile de prédire précisément l'épaisseur du film déposé. Les premiers modèles proposaient que la formation de la couche de silane se faisait de façon quasi-cristalline à la surface et que chaque atome de silice du silane était connecté à la surface.⁴⁹ Les groupements hydroxyles sont présents à la surface avec un taux de recouvrement d'environ 10^{15} cm^{-2} .⁵⁰ Ceci correspond à une aire par chaîne de silane de 10 \AA^2 , or il a été démontré que chaque chaîne de silane occupait un espace d'environ $20\text{-}24 \text{ \AA}^2$.⁴⁷ Pour des raisons de gêne stérique le modèle n'est donc pas valide et un autre modèle a été proposé (Fig 2.19). Dans ce modèle, le polymère réticulé est relié à la surface uniquement par certaines liaisons Si-O.

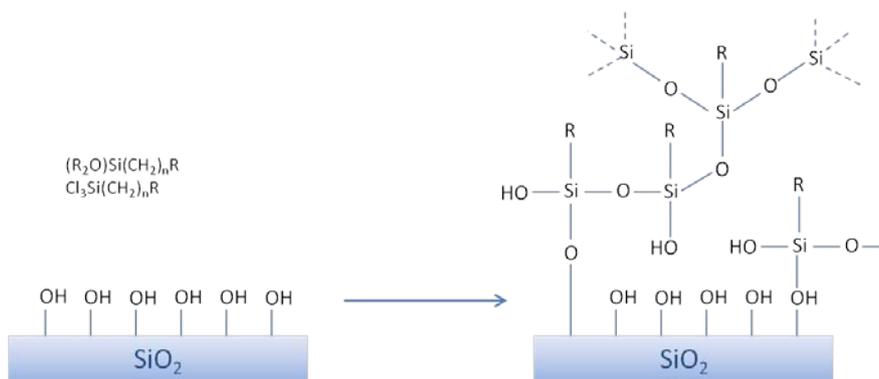


Fig 2.19 : modèle proposé pour la formation de couches de silanes à la surface d'un substrat en silice⁴⁶

Les différents rapports s'accordent sur deux voies principales de formation de la couche de silane : la formation d'une couche directement à la surface du substrat ou alors la

formation d'agrégats en solution qui vont ensuite se déposer à la surface. La présence d'eau est essentielle dans le mécanisme de formation de la couche de silane. Elle permet d'hydrolyser le silane (trichlorosilane ou triéthoxysilane, par exemple), qui va alors pouvoir se condenser à la surface du substrat. Cependant, en grande quantité dans la solution, l'eau va favoriser l'hydrolyse au sein de la solution et la formation d'agrégats, plutôt que la déposition d'une couche uniforme.

L'influence du solvant est liée à sa capacité à solubiliser l'eau. En effet, une étude⁵¹ a démontré que les solvants dans lesquels l'eau a une grande solubilité, comme le 1,4-dioxane, n'est pas favorables à la silanisation, puisqu'ils limitent la condensation du film à la surface du substrat. A l'opposé, un solvant où l'eau n'est que très peu soluble, par exemple le *n*-pentane, conduit à la formation d'un dépôt très faible.⁵¹ Un solvant intermédiaire, comme le toluène, présente une solubilité moyenne, qui va permettre la formation de silanes de façon optimale à la surface du verre.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes basés sur les résultats de J. A. Howarter et J.P. Youngblood⁵² sur l'optimisation de la silanisation de support en silice avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). Dans cette étude, les effets de la température, de la concentration et du temps de réaction ont été mis en évidence. L'augmentation de la température a un effet cinétique et favorise la mobilité des espèces en solution ce qui conduit à un film plus épais.⁵² La concentration et le temps de réaction ont des effets variables. La tendance observée montre qu'une plus grande concentration en APTES et un temps de réaction plus long vont mener à une couche plus épaisse, mais jusqu'à une certaine limite. A trop haute concentration, le polymère va se former plus facilement dans la solution et sa déposition à la surface du substrat est alors limitée. Après une heure, le dépôt dépassera l'épaisseur d'une monocouche ce qui n'est pas désiré dans certaines applications. Dans la réalisation de notre capteur, une épaisseur suffisamment grande est désirée pour pouvoir obtenir un maximum de dépôt à la surface de notre réseau de fibre. Nous avons donc choisi les conditions pour un dépôt de la molécule **B** sur une épaisseur maximale (entre 50 et 200 nm) afin d'obtenir un dépôt suffisant et uniforme pour la réalisation de notre capteur.⁵²

Pour faciliter la fonctionnalisation du réseau, un prétraitement est nécessaire. L'oxydation de la surface va permettre de rendre les groupements Si-OH plus accessibles. Ce traitement peut être effectué par plasma oxygène ou par l'utilisation d'un acide fort.

L'utilisation de conditions optimisées pour la silanisation ont d'abord été étudiées sur plaque de verre puis on été adaptées pour déposer la molécule **B** à la surface de notre réseau

de fibres optiques. La caractérisation du dépôt sur plaque de verre a été réalisée par spectroscopie UV-visible (Fig. 2.20).

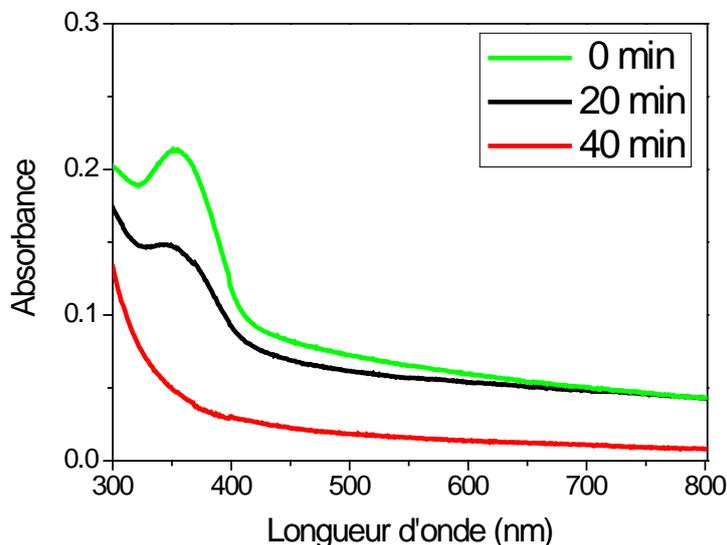


Fig. 2.20 : spectre d'absorbance de la molécule B immobilisée à la surface d'une plaque de verre après exposition à la lampe UV pendant différents temps

La bande d'absorbance correspondant au groupe photo-labile **B** (NVOC) apparaît à 350 nm.

III.2. Photodéprotection et couplage avec la sonde

Le substrat modifié avec la molécule **B** est ensuite fonctionnalisé avec la sonde **A**. La déprotection du groupement photolabile NVOC permet de libérer une fonction amine qui peut ensuite être couplée par réaction avec un ester activé. L'exposition d'un échantillon modifié par **B** à la lampe UV va permettre de déprotéger progressivement le groupement silane immobilisé sur la plaque. La déprotection est suivie par spectroscopie UV-visible et on peut estimer que la déprotection est complète après un temps d'exposition de 40 minutes (Fig. 2.20). Le NVOC est le groupement photolabile le plus répandu en synthèse organique⁵³ et la déprotection se fait selon le mécanisme présenté sur la figure 2.21.

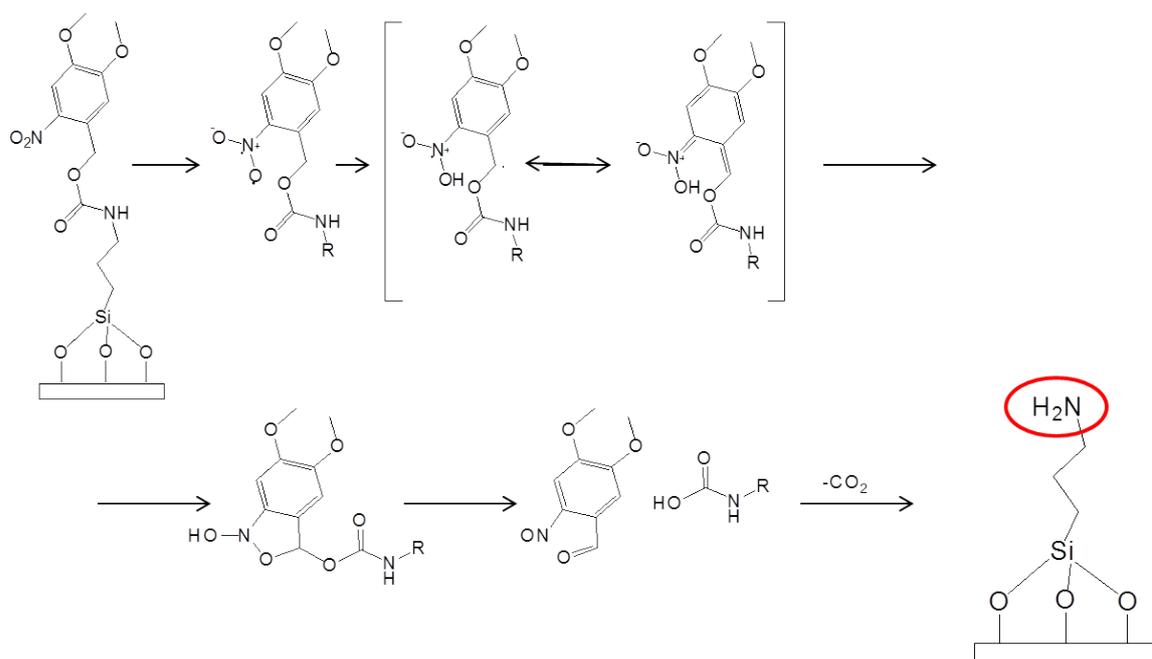


Figure 2.21 : mécanisme de photodéprotection du groupement NVOC⁵³

L'irradiation va permettre de cliver une liaison du groupement nitro, ce qui va former un diradical hautement réactif, qui va déprotoner le carbone en position γ . Cette réaction va amener à la formation du carbamate, qui subit alors une décarboxylation spontanée et libère l'amine primaire. La surface modifiée qui en résulte est donc similaire à celle que l'on obtient en utilisant l'APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane). L'APTES est souvent utilisé dans les procédés de biofonctionnalisation.⁵⁰ Les groupements amines changent l'affinité de la surface avec les biomolécules (par exemple les protéines) et permettent leur adsorption plus efficacement que sur celles qui ne sont pas modifiées.⁵⁰ L'utilisation de réactions de couplage, avec des acides carboxyliques, peuvent également être utilisées pour fonctionnaliser ces surfaces de façon covalente avec les biomolécules désirées.⁴⁶ Bien que plus longues, les fonctionnalisations en plusieurs étapes, comme celle-ci, sont souvent favorisées par rapport à celles réalisées en une étape unique.⁴⁶ La réactivité de certaines sondes et leur stabilité dans les conditions utilisées pour l'étape de fonctionnalisation ne garantissent pas toujours une bonne efficacité et une bonne uniformité du dépôt. Elles sont également à privilégier dans le cas de l'utilisation de sondes encombrantes.⁴⁶ Les fonctionnalisations en une seule étape nécessitent la synthèse de chaque sonde que l'on veut greffer à la surface du substrat. Dans l'utilisation des procédés en deux étapes, un autre avantage important est qu'il est possible d'immobiliser quasiment toute sonde qui possède un groupement acide carboxylique.

De plus, l'utilisation du groupement photolabile (NVOC) permet également d'envisager l'immobilisation de plusieurs sondes sur le même substrat en utilisant des photodéprotections localisées (*cf.* Chapitre 3).

La rhodamine **A** est modifiée avec un ester activé **C** ce qui permet de l'immobiliser de façon covalente à la surface du réseau de fibre optique par réaction de couplage (Fig. 2.22).

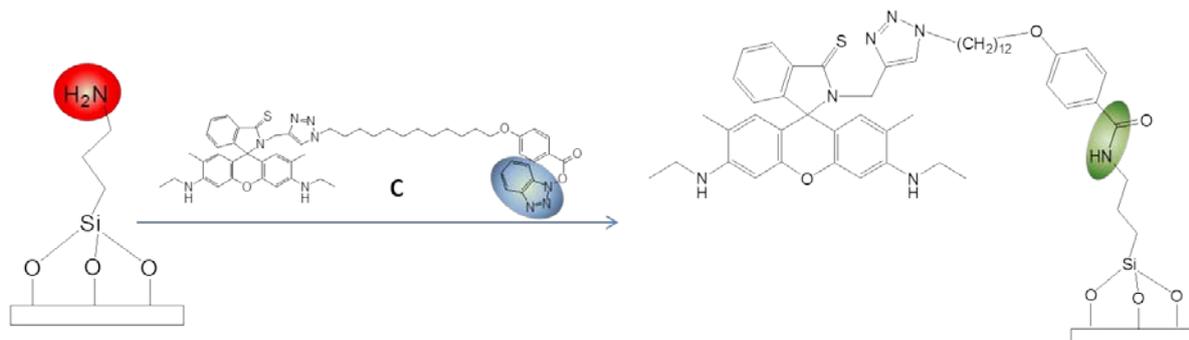


Figure 2.22 : schéma réactionnel du couplage entre la rhodamine C et le silane immobilisé à la surface

L'utilisation d'esters activés est courante en chimie de synthèse et la rhodamine est ainsi immobilisée de façon homogène à la surface du réseau de fibres optiques.

IV. Détection sur le réseau

L'évaluation du capteur obtenu par l'immobilisation de la sonde à la surface du réseau est réalisée par microscopie épi-fluorescente. La figure 2.23a) montre les images obtenues sur le réseau de fibres optiques fonctionnalisé, avant et après mise en présence avec le mercure, pendant un temps de 15 min.

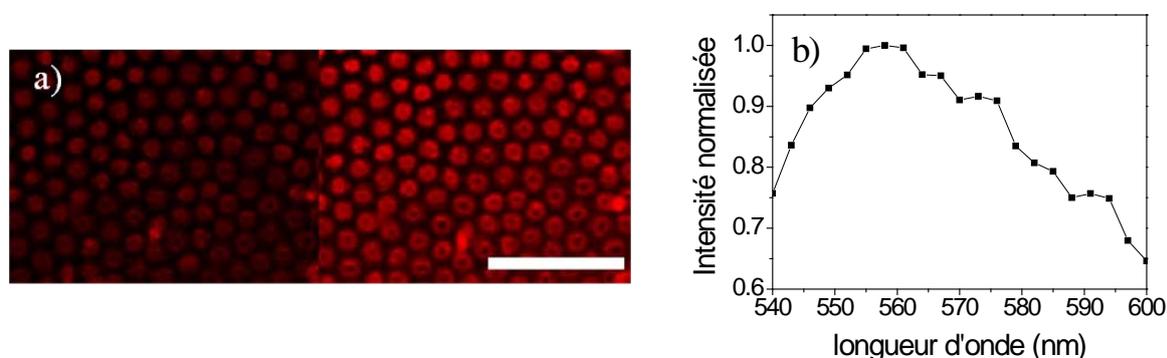


Figure 2.23 : a) images obtenue par microscopie de fluorescence du réseau modifié par la sonde C en absence (gauche) et en présence (droite) de mercure Hg^{2+} (barre blanche = 15 μm) b) spectre mesuré sur le réseau de fibres modifié en présence de mercure⁴⁵

La présence de mercure est mise en évidence par l'augmentation du signal fluorescent. Le spectre de fluorescence enregistré est cohérent avec celui observé en solution (Fig. 2.23b). Il est important de noter que l'augmentation de fluorescence n'a pas pu être observée dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées lors de l'étude de la sonde en solution (cf. II.2.2). Dans un mélange équivalent de solution aqueuse tamponnée et d'acétonitrile, la sonde ne semble pas être affectée par la présence de mercure. En augmentant le ratio d'acétonitrile jusqu'à 95 : 5 (ACN : HEPES), l'augmentation du signal fluorescent a pu être observée. Cet effet peut être expliqué par une hydrophobicité trop importante de la molécule immobilisée à la surface du réseau qui a alors du mal à interagir avec la solution en présence trop importante d'eau.⁵⁴

Pour l'étude du capteur, l'analyse a été réalisée sur la face distale du réseau de fibres, c'est-à-dire du côté opposé de la face fonctionnalisée, pour confirmer la possibilité d'utiliser ce capteur pour réaliser de la détection à distance. De façon générale, le signal collecté au travers d'un réseau de fibres optiques est plus faible que celui collecté en face. Cependant une augmentation du signal peut tout de même être observée de façon sélective en présence de mercure dans cette configuration. Pour une concentration de 1 mM de Hg^{2+} le signal fluorescent est augmenté quatre fois (Fig. 2.24).

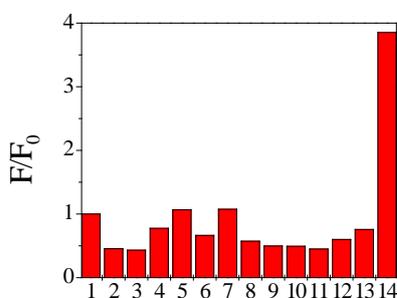


Figure 2.24 : réponse de la sonde C immobilisée à la surface en présence de différents cations sur la face distale du réseau de fibres optiques (concentration en cation $10^{-3}M$) (1, aucun ; 2, Zn^{2+} ; 3, Co^{2+} ; 4, Ni^{2+} ; 5, Cr^{3+} ; 6, Cd^{3+} ; 7, Cu^{2+} ; 8, Pb^{2+} ; 9, Na^{+} ; 10, K^{+} ; 11, Ba^{2+} ; 12, Ag^{+} ; 13, Fe^{2+} ; 14, Hg^{2+})⁴⁵

Le titrage du mercure a ensuite été réalisé en utilisant ce capteur. En augmentant la concentration de mercure entre 10 μM et 3 mM le signal augmente progressivement puis on observe un plateau (Fig. 2.25a). L'utilisation de l'échelle logarithmique (Fig. 2.25b) permet d'obtenir une relation linéaire entre l'intensité du signal fluorescent et la concentration en mercure sur la gamme de concentration comprise entre 50 μM et 3 mM.

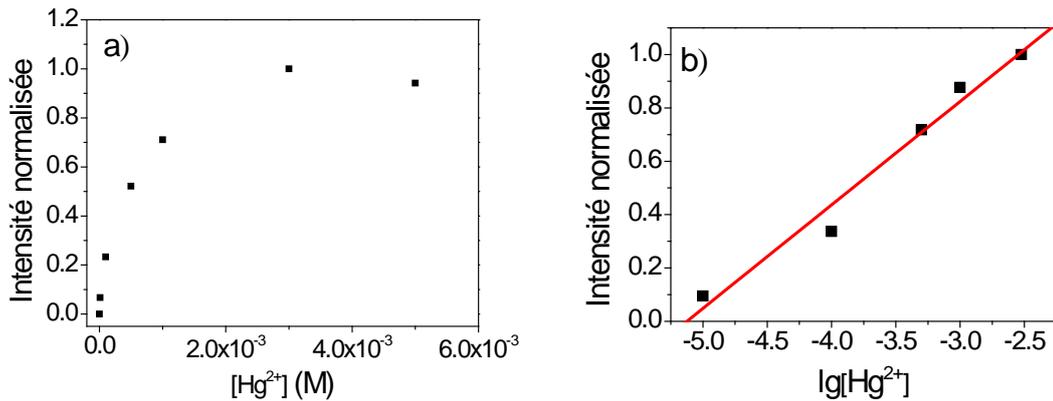


Figure 2.25 : a) courbe de titrage de Hg^{2+} réalisée sur la face distale du réseau de fibre optique b) relation linéaire entre l'intensité de fluorescence et le logarithme de la concentration en mercure⁴⁵

La figure 2.26 présente la variation de l'intensité de fluorescence le long de quatre fibres du réseau. En absence de mercure, le profil observé est plat et ne rend pas compte de la géométrie de la fibre. Cependant en présence de mercure, il devient possible de distinguer chaque pointe du réseau, chaque maximum d'intensité correspondant au centre d'une fibre optique.

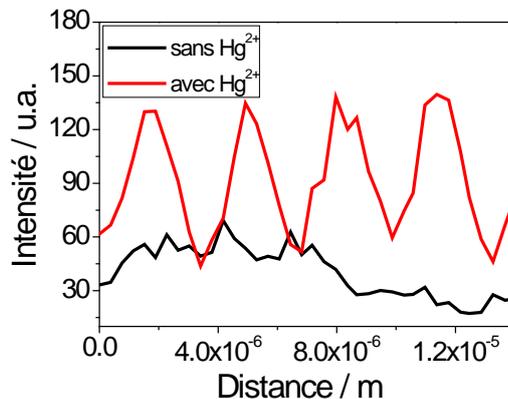


Figure 2.26 : profil d'intensité du signal fluorescent le long de 4 fibres optiques enregistré sur la face distale du réseau en absence (noir) et en présence (5 mM) (rouge) de mercure⁴⁵

L'image observée au travers du réseau est en adéquation avec la géométrie de la fibre et la résolution permet donc de différencier chacune des fibres. Ce résultat est prometteur puisqu'il permet de conclure que l'utilisation de ces réseaux est compatible avec la réalisation de capteurs multiplexés.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous présentons l'immobilisation d'une sonde à la surface du réseau de fibres optiques afin de réaliser un capteur pour la détection du mercure sous sa forme cationique. Le mercure est un polluant fortement toxique et la nécessité de le détecter dans l'environnement est un enjeu important. Les réseaux de fibres optiques sont envisagés pour réaliser la détection du mercure à distance, grâce à leurs propriétés de transmissions, pour l'analyse d'un milieu peu accessible ou dangereux. Dans ce projet, nous avons utilisé une sonde fluorescente dérivée de la rhodamine. Cette sonde a été immobilisée à la surface du réseau par silanisation. La silanisation est largement utilisée dans les procédés de modification de surfaces de silice. Elle ne permet pas toujours de contrôler de façon reproductible l'épaisseur du film déposé, mais la nature covalente de la fonctionnalisation apporte une bonne stabilité, par rapport à d'autres méthodes de modification de surface. De plus, le silane obtenu est transparent dans le domaine du visible et n'interfère donc pas avec le signal fluorescent émis par la sonde. L'utilisation d'un procédé en plusieurs étapes (immobilisation du silane protégé, photo-déprotection, couplage avec l'ester activé) permet de protéger la sonde de l'étape de silanisation et permet également d'envisager la fonctionnalisation du réseau avec différentes sondes comme il sera décrit dans le chapitre 3. Le capteur réalisé dans ce chapitre permet de quantifier le mercure de façon sélective dans une certaine gamme de concentrations en utilisant la fluorescence. Nous avons également démontré que le signal de chaque fibre pouvait être différencié lors de l'acquisition de l'image par microscopie épi-fluorescente et ce résultat est prometteur pour l'utilisation de ces réseaux comme plateforme pour réaliser de l'analyse multiplexée.

1. World Health Organization, Elemental Mercury and Inorganic Mercury Compounds : Human Health Aspects. *Concise International Chemical Assessment Document 50* **2003**.
2. Selid, P.; Xu, H.; Collins, E. M.; Striped Face-Collins, M.; Zhao, J. X., Sensing Mercury for Biomedical and Environmental Monitoring. *Sensors* **2009**, 9 (7), 5446-5459.
3. El-Safty, S. A.; Shenashen, M. A., Mercury-ion optical sensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 38 (0), 98-115.
4. www.ec.gc.ca.
5. Comm. Europeene, <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/mercury/> **2013**.
6. Directive Européenne 2008/105/CE. *Journal officiel de l'Union européenne* **2008**.
7. Mao Tseng, C.; De Diego, A.; Martin, F. M.; Amouroux, D.; F. X. Donard, O., Rapid Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Biological Reference Materials by Hydride Generation, Cryofocusing, Atomic Absorption Spectrometry After Open Focused Microwave-assisted Alkaline Digestion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1997**, 12 (7), 743-750.
8. Vallant, B.; Kadnar, R.; Goessler, W., Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, 22 (3), 322-325.
9. Huang, D.; Niu, C.; Wang, X.; Lv, X.; Zeng, G., "Turn-On" Fluorescent Sensor for Hg²⁺ Based on Single-Stranded DNA Functionalized Mn: CdS/ZnS Quantum Dots and Gold Nanoparticles by Time-Gated Mode. *Analytical Chemistry* **2012**, 85 (2), 1164-1170.
10. Li, Y.; Jiang, Y.; Yan, X.-P., Probing Mercury Species–DNA Interactions by Capillary Electrophoresis with On-Line Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry* **2006**, 78 (17), 6115-6120.
11. Ono, A.; Togashi, H., Highly Selective Oligonucleotide-Based Sensor for Mercury(II) in Aqueous Solutions. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (33), 4300-4302.
12. Ivask, A.; Green, T.; Polyak, B.; Mor, A.; Kahru, A.; Virta, M.; Marks, R., Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22 (7), 1396-1402.
13. (a) Biran, I.; Rissin, D. M.; Ron, E. Z.; Walt, D. R., *Anal. Biochem.* **2003**, 315, 106; (b) Ivask, A.; Hakkila, K.; Virta, M., Detection of Organomercurials with Sensor Bacteria. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (21), 5168-5171.
14. Andréa M.A. Nascimento, E. C.-S., Mini Review : Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments *Genet. Mol. Res.* **2003**, 2 (1), 92-101.
15. Zhang, Z.; Chen, Y.; Xu, D.; Yang, L.; Liu, A., A new 1,8-naphthalimide-based colorimetric and "turn-on" fluorescent Hg²⁺ sensor. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, 105 (0), 8-13.
16. Zhao, Y.; Lin, Z.; He, C.; Wu, H.; Duan, C., A "Turn-On" Fluorescent Sensor for Selective Hg(II) Detection in Aqueous Media Based on Metal-Induced Dye Formation. *Inorganic Chemistry* **2006**, 45 (25), 10013-10015.
17. Segura-Carretero, A.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A., Low-level mercury determination with thiamine by fluorescence optosensing. *Talanta* **1999**, 49 (4), 907-913.
18. Guo, L.; Zhang, W.; Xie, Z.; Lin, X.; Chen, G., An organically modified sol-gel membrane for detection of mercury ions by using 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin as a fluorescence indicator. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 119 (1), 209-214.

19. Wang, H.-H.; Xue, L.; Yu, C.-L.; Qian, Y.-Y.; Jiang, H., Rhodamine-based fluorescent sensor for mercury in buffer solution and living cells. *Dyes and Pigments* **2011**, *91* (3), 350-355.
20. Santra, M.; Ryu, D.; Chatterjee, A.; Ko, S.-K.; Shin, I.; Ahn, K. H., A chemodosimeter approach to fluorescent sensing and imaging of inorganic and methylmercury species. *Chemical Communications* **2009**, (16), 2115-2117.
21. Rajabi, H. R.; Roushani, M.; Shamsipur, M., Development of a highly selective voltammetric sensor for nanomolar detection of mercury ions using glassy carbon electrode modified with a novel ion imprinted polymeric nanobeads and multi-wall carbon nanotubes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2013**, *693* (0), 16-22.
22. Lai, M.-T.; Shih, J.-S., Mercury(II) and silver(I) ion-selective electrodes based on dithia crown ethers. *Analyst* **1986**, *111* (8), 891-895.
23. Gupta, V. K.; Jain, S.; Khurana, U., A PVC-based pentathia-15-crown-5 membrane potentiometric sensor for mercury(II). *Electroanalysis* **1997**, *9* (6), 478-480.
24. Javanbakht, M.; Ganjali, M. R.; Eshghi, H.; Sharghi, H.; Shamsipur, M., Mercury(II) Ion-Selective Electrode Based on Dibenzo-diazathia-18-crown-6-dione. *Electroanalysis* **1999**, *11* (2), 81-84.
25. Lu, J.; Tong, X.; He, X., A mercury ion-selective electrode based on a calixarene derivative containing the thiazole azo group. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, *540*, 111-117.
26. McNerney, J. J.; Buseck, P. R.; Hanson, R. C., Mercury Detection by Means of Thin Gold Films. *Science* **1972**, *178* (4061), 611-612.
27. Ruys, D. P.; Andrade, J. F.; Guimaraes, O. M., Mercury detection in air using a coated piezoelectric sensor. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *404* (1), 95-100.
28. Xu, X.; Thundat, T. G.; Brown, G. M.; Ji, H.-F., Detection of Hg²⁺ Using Microcantilever Sensors. *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (15), 3611-3615.
29. Chen, J.; Zheng, A.; Chen, A.; Gao, Y.; He, C.; Kai, X.; Wu, G.; Chen, Y., A functionalized gold nanoparticles and Rhodamine 6G based fluorescent sensor for high sensitive and selective detection of mercury(II) in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *599* (1), 134-142.
30. James, J. Z.; Lucas, D.; Koshland, C. P., Gold Nanoparticle Films As Sensitive and Reusable Elemental Mercury Sensors. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46* (17), 9557-9562.
31. Biran, I.; Rissin, D. M.; Ron, E. Z.; Walt, D. R., Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor. *Analytical Biochemistry* **2003**, *315* (1), 106-113.
32. Long, F.; Gao, C.; Shi, H. C.; He, M.; Zhu, A. N.; Klibanov, A. M.; Gu, A. Z., Reusable evanescent wave DNA biosensor for rapid, highly sensitive, and selective detection of mercury ions. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (10), 4018-4023.
33. Crosby, J. S.; Lucas, D.; Koshland, C. P., Fiber optic based evanescent wave sensor for the detection of elemental mercury utilizing gold nanorods. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *181* (0), 938-942.
34. Lee, M. H.; Lee, S. W.; Kim, S. H.; Kang, C.; Kim, J. S., Nanomolar Hg(II) Detection Using Nile Blue Chemodosimeter in Biological Media. *Organic Letters* **2009**, *11* (10), 2101-2104.
35. Choi, M. G.; Kim, Y. H.; Namgoong, J. E.; Chang, S.-K., Hg²⁺-selective chromogenic and fluorogenic chemodosimeter based on thiocoumarins. *Chemical Communications* **2009**, *0* (24), 3560-3562.

36. Choi, M. G.; Ryu, D. H.; Jeon, H. L.; Cha, S.; Cho, J.; Joo, H. H.; Hong, K. S.; Lee, C.; Ahn, S.; Chang, S.-K., Chemodosimetric Hg²⁺-Selective Signaling by Mercuriation of Dichlorofluorescein Derivatives. *Organic Letters* **2008**, *10* (17), 3717-3720.
37. Ahamed, B. N.; Ghosh, P., An integrated system of pyrene and rhodamine-6G for selective colorimetric and fluorometric sensing of mercury(II). *Inorganica Chimica Acta* **2011**, *372* (1), 100-107.
38. Bhalla, V.; Tejpal, R.; Kumar, M., Rhodamine appended terphenyl: A reversible "off-on" fluorescent chemosensor for mercury ions. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *151* (1), 180-185.
39. Soh, J. H.; Swamy, K. M. K.; Kim, S. K.; Kim, S.; Lee, S.-H.; Yoon, J., Rhodamine urea derivatives as fluorescent chemosensors for Hg²⁺. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (34), 5966-5969.
40. Kim, H. N.; Nam, S.-W.; Swamy, K. M. K.; Jin, Y.; Chen, X.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Park, S.; Yoon, J., Rhodamine hydrazone derivatives as Hg²⁺ selective fluorescent and colorimetric chemosensors and their applications to bioimaging and microfluidic system. *Analyst* **2011**, *136* (7), 1339-1343.
41. Kim, Y.-R.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Kim, H., Rhodamine-Based "Turn-On" Fluorescent Chemodosimeter for Cu(II) on Ultrathin Platinum Films as Molecular Switches. *Advanced Materials* **2008**, *20* (23), 4428-4432.
42. Lu, H.; Qi, S.; Mack, J.; Li, Z.; Lei, J.; Kobayashi, N.; Shen, Z., Facile Hg²⁺ detection in water using fluorescent self-assembled monolayers of a rhodamine-based turn-on chemodosimeter formed via a "click" reaction. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21* (29), 10878-10882.
43. Liu, B.; Zeng, F.; Liu, Y.; Wu, S., A FRET system built on quartz plate as a ratiometric fluorescence sensor for mercury ions in water. *Analyst* **2012**, *137* (7), 1698-1705.
44. Xu, L. Q.; Neoh, K.-G.; Kang, E.-T.; Fu, G. D., Rhodamine derivative-modified filter papers for colorimetric and fluorescent detection of Hg²⁺ in aqueous media. *Journal of Materials Chemistry A* **2013**, *1* (7), 2526-2532.
45. Chen, K.; Adam, C.; Sojic, N.; Schmittl, M., Photochemical functionalisation of optical nanotips with a rhodamine chemosensor for remote throughfiber detection of Hg²⁺. *RSC Advances* **2013**.
46. Gooding, J. J.; Ciampi, S., The molecular level modification of surfaces: from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (5), 2704-2718.
47. Onclin, S.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N., Engineering Silicon Oxide Surfaces Using Self-Assembled Monolayers. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (39), 6282-6304.
48. Netzer, L.; Sagiv, J., A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (3), 674-676.
49. Rye, R. R., Transition Temperatures for n-Alkyltrichlorosilane Monolayers. *Langmuir* **1997**, *13* (9), 2588-2590.
50. Bañuls, M.-J.; Puchades, R.; Maquieira, Á., Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *777*, 1-16.
51. McGovern, M. E.; Kallury, K. M. R.; Thompson, M., Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane. *Langmuir* **1994**, *10* (10), 3607-3614.
52. Howarter, J. A.; Youngblood, J. P., Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* **2006**, *22* (26), 11142-11147.

53. Bochet, C. G., Photolabile protecting groups and linkers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, (2), 125-142.
54. Kokkoli, E.; Zukoski, C. F., Effect of Solvents on Interactions between Hydrophobic Self-Assembled Monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, 209 (1), 60-65.

**Chapitre 3 : Polymère électrochimiluminescent
aux propriétés modulables pour la détection de
 Hg^{2+} à distance**

I.	Détection de cations par électrochimiluminescence	86
I.1.	Présentation des éthers couronnes	86
I.2.	Sondes inorganiques	90
I.2.1.	Propriétés spectroscopiques	90
I.2.2.	Propriétés électrochimiques	93
I.3.	Détection de cation par ECL	94
I.4.	Laboratoire sur molécule.....	98
II.	Immobilisation de la sonde par électropolymérisation	100
II.1.	Généralités	100
II.2.	Electropolymérisation des complexes 1,2 et 3.....	103
II.3.	Transparence du film.....	106
II.4.	Electropolymérisation des complexes 1, 2 et 3 sur réseaux de fibres optiques	110
III.	Génération de l'ECL sur le réseau et détection de Hg^{2+}	114
IV.	Etude préliminaire pour la conception d'un capteur multianalyte	117
IV.1.	Polymère présentant des groupements photolabiles.....	117
IV.2.	Photodéprotection et fonctionnalisation globale de la plaque d'ITO.....	119
IV.3.	Photodéprotection et fonctionnalisation localisée.....	122

Dans ce chapitre, nous présentons une nouvelle stratégie pour la réalisation de capteurs sur réseaux de fibres optiques. La combinaison de l'électrochimie avec ces réseaux permet d'envisager de nouvelles voies de fonctionnalisation et de détection. La déposition d'une fine couche métallique (ITO ou or) par pulvérisation cathodique permet de transformer le réseau en électrode qui peut alors être modifié par électropolymérisation. L'électropolymérisation est une méthode de choix pour la réalisation de capteur, puisqu'elle permet de modifier les surfaces conductrices de façon uniforme et contrôlée. De plus, le polymère obtenu présente de nombreux avantages (*e.g.* stabilité et passivité du support, reproductibilité et contrôle de l'épaisseur du film déposé). La sonde immobilisée dans ce projet est un complexe de Ruthénium(II) modifié avec des éthers couronnes qui complexent sélectivement le cation cible : Hg^{2+} . En présence d'un coréactif et après oxydation, le complexe émet un signal ECL qui augmente fortement en présence de Hg^{2+} , ce qui permet de le détecter et de le quantifier. L'ECL possède certains avantages en comparaison à la fluorescence. L'absence de source d'excitation permet de diminuer le bruit de fond et donc d'atteindre de meilleures limites de détection. De plus la génération du signal *in situ*, à la surface de l'électrode permet une meilleure résolution spatiale et temporelle. Le critère clef pour la réalisation de ce capteur est le choix du polymère. Le CPDT (4*H*-cyclopenta[2,1-*b*:3,4-*b'*]dithiophène) a été choisi car son absorbance peut être modulée par électro-oxydation. Dans son état neutre, le poly-CPDT absorbe fortement dans le domaine d'émission du complexe de Ruthénium, mais l'application d'un potentiel anodique conduit à l'oxydation du poly-CPDT, qui devient alors transparent dans la fenêtre de longueur d'onde considéré. Cet effet électrochrome est essentiel pour la réalisation de capteur sur fibres optiques, puisqu'il permet d'envisager de mesurer le signal à distance en utilisant les propriétés de transmission des fibres optiques. L'application du potentiel anodique nécessaire à la génération du signal ECL a donc une double action puisqu'il permet également de diminuer l'absorbance du polymère dans le domaine de longueur d'onde de l'émission ECL. Dans ce chapitre, après avoir introduit les concepts de sondes chimiques mettant en jeu les éthers couronnes et les procédés d'électropolymérisation, nous présenterons les résultats obtenus pour la réalisation du capteur ECL. En dernière partie de chapitre, nous présenterons également la stratégie envisagée pour la réalisation d'un capteur multianalyte ainsi que les résultats préliminaires obtenus sur cet aspect.

I. Détection de cations par électrochimiluminescence

I.1. Présentation des éthers couronnes

La reconnaissance de cations présente un intérêt dans de nombreux domaines comme en médecine ou en environnement. Dans ce but, de nombreuses stratégies basées sur l'interaction hôte-invité en chimie supramoléculaire ont été développées. La chimie supramoléculaire repose sur la reconnaissance moléculaire par interactions non-covalentes (liaisons hydrogènes, interactions de Van der Waals...). L'un des exemples les plus développés pour la reconnaissance de cations est l'utilisation de sondes utilisant les éthers couronnes.¹ Les éthers couronnes sont des polyéthers macrocycliques et ils ont été largement étudiés pour leur capacité à complexer sélectivement certains cations.

L'utilisation de la nomenclature IUPAC pour les éthers couronnes conduit à des noms très complexes et peu évocateurs. Pour cette raison, C. J. Pedersen a créé une nouvelle nomenclature plus simple pour décrire ces systèmes.² Quelques exemples sont donnés dans la figure 3.1. Le premier chiffre réfère au nombre total d'atomes dans le cycle, la lettre C à la forme de la molécule (en couronne – « *crown* » en anglais), et le dernier chiffre au nombre d'atomes donneurs dans le cycle.³ La substitution d'un atome d'oxygène du cycle ou la modification des parties carbonées sont indiquées en préfixe.

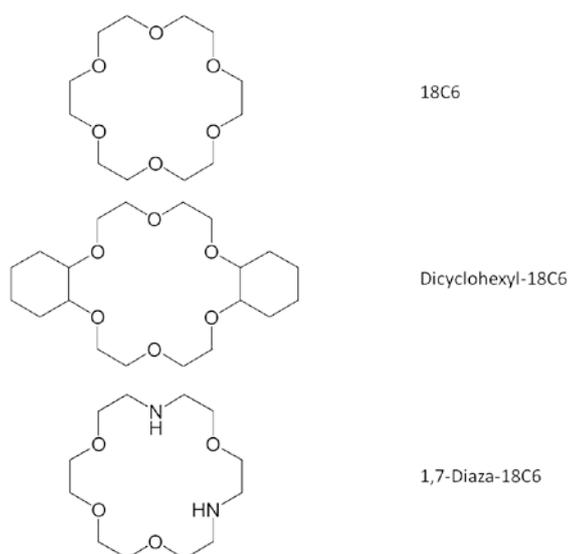


Figure 3.1 : Nomenclature simplifiée de Pedersen pour les éthers couronnes²

La complexation d'un cation par un éther couronne se fait en deux étapes : la désolvatation du cation, puis sa coordination par le ligand macrocyclique. L'énergie du système peut donc être calculée à partir de l'énergie de liaison entre le cation et les atomes donneurs du ligand ainsi que des énergies de solvation des réactifs et des produits. Les constantes d'association entre l'éther couronne et le cation vont alors être fortement influencées par la nature du solvant utilisé. Un solvant polaire va être retenu plus fortement autour du cation et l'étape de désolvatation va donc limiter la formation du complexe. Par exemple, on observe que les constantes calculées dans le méthanol sont plus grandes d'un facteur 10^3 - 10^4 comparées à celles calculées dans l'eau (*cf.* Fig. 3.2).⁴ L'eau a une constante diélectrique égale à 82 et celle du méthanol est de 33.³ Le méthanol aura donc un effet de solvation beaucoup plus faible et cette différence explique l'écart entre les constantes d'affinité observées dans ces deux solvants.

Cation	H_2O	70% MeOH
K^+	2.06	4.33
Ba^{2+}	3.87	6
Na^+	0.82	2.76
Ca^{2+}	0.48	2.51

Figure 3.2 : valeurs du logarithme décimal de la constante K de la réaction



dans l'eau et dans un mélange eau-méthanol (70% méthanol) à 25°C⁴

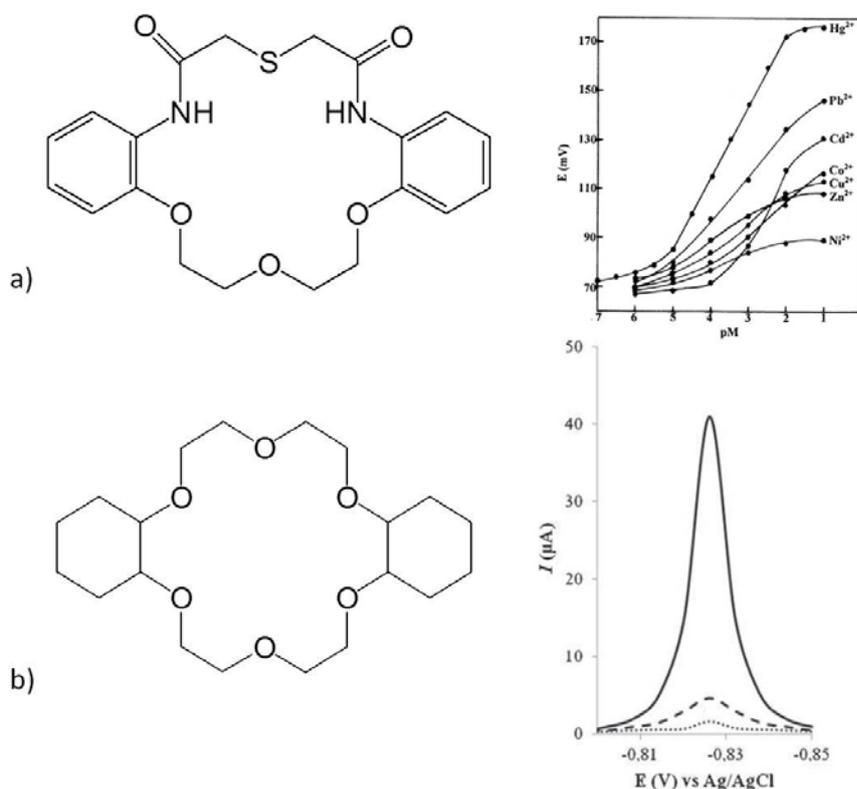
L'effet prédominant qui influence l'interaction entre le cation et l'éther couronne est la taille du cation et celle de la cavité, c'est-à-dire de l'espace entre les atomes donneurs du macrocycle.⁴ La meilleure stabilité est observée avec un rapport entre la taille du cation et de la cavité environ égale à 1.⁴ Dans ces conditions, les interactions électrostatiques sont optimales. Par exemple, la complexation de K^+ (1.38 Å) et Ba^{2+} (1.35 Å) dans l'éther couronne 18C6 (taille de cavité = 1.34 – 1.43 Å) est caractérisée par des fortes valeurs de constantes d'association (K entre 10^2 et 10^4).⁴ La charge, par contre, a un effet variable en fonction de la taille du cation considéré et du solvant utilisé. Par exemple, entre Ba^{2+} et K^+ (taille similaire), le cation ayant la charge la plus importante va être complexé préférentiellement et donc Ba^{2+} est favorisé.³ Pour les cations plus petits, par exemple Na^+ et Ca^{2+} (dont la taille est similaire), le cation monovalent est favorisé. Cet effet de la taille est

observé particulièrement dans l'eau et peut être expliqué par les changements d'entropie et d'enthalpie lors de la complexation. Les cations plus petits retiennent plus fortement les molécules d'eau et l'étape de désolvatation va donc limiter la formation du complexe. Le cation de charge inférieur Na^+ pourra donc plus facilement se désolvater et être complexé par l'éther couronne. Cet effet a tendance à s'inverser avec l'addition de méthanol dans le milieu (*cf.* tableau de la Fig. 3.2) et la sélectivité de l'éther couronne va à nouveau tendre à préférer le cation divalent dans des conditions moins polaires.³ Les propriétés du milieu jouent donc un rôle primordial sur le déplacement de l'équilibre et sur la sélectivité de l'éther couronne.

D'autres paramètres influencent la sélectivité des éthers couronnes comme la nature des atomes donneurs et la nature du cation. La théorie HSAB (*Hard Soft Acid Base*) de Pearson permet d'expliquer l'interaction favorable observée entre certains composés. Les acides et bases (dans le sens de Lewis) de même caractère « dur » ou « mou » interagissent préférentiellement avec les composés de même nature. Un cation de petite taille dit « dur » préfère une base « dure » comme l'oxygène (interaction à caractère ionique) et les gros cations dits « mous » interagissent préférentiellement avec les bases « molles » (caractère covalent).³ Par exemple, la substitution de l'atome d'oxygène par un atome d'azote ou de soufre sur un éther couronne va diminuer la constante d'affinité dans le cas du potassium mais l'augmenter pour les cations « mous », comme le mercure et l'argent.⁴ Les éthers couronnes comprenant uniquement des atomes d'oxygènes favorisent principalement la complexation des cations « durs » (K^+ et Ba^{2+} par exemple).⁵ La substitution de tous les atomes d'oxygène par des atomes « mous » conduit à une forte tendance pour la complexation de cations « mous », mais le complexe formé est alors très stable et la sonde est difficile à régénérer. Le cas intermédiaire, avec la substitution de certains atomes, permet de favoriser la complexation du mercure tout en gardant la possibilité de régénérer la sonde.⁵ La géométrie du complexe peut également être influencée par la présence d'atomes de soufre dans le cycle. Le soufre dont la taille est plus grande va occuper une partie de l'espace de la cavité et, dans ce cas, le cation ne sera pas complexé au centre de la cavité mais reste juxtaposé à l'éther couronne.³

Les propriétés complexantes des éthers couronnes permettent de les utiliser pour solubiliser les cations métalliques dans des milieux apolaires, pour le transport de cations au travers de membranes naturelles ou artificielles ou encore pour le transfert de phase liquide-liquide ou solide-liquide.⁴

Les éthers couronnes sont également utilisés pour la réalisation d'électrodes sélectives.^{6, 5, 7} Ces électrodes sont composées d'une membrane sélective qui ne laisse passer qu'un seul type d'ion. Par exemple, l'immobilisation d'éthers couronnes dans une membrane en PVC permet de détecter sélectivement les ions mercure Hg^{2+} (Fig. 3.3a).⁵ La sélectivité de la sonde est améliorée par la substitution de certains atomes d'oxygène du cycle par des atomes de soufre et d'azote. Lors du passage du mercure dans la membrane, une différence de potentiel entre les deux phases est observée et cette différence de potentiel est reliée à la concentration en mercure dans le milieu à analyser.⁷



*Figure 3.3 : exemples d'application des éthers couronnes. Réalisation d'électrodes sélectives :
a) réponses potentiométriques d'électrodes modifiées avec l'éther couronne dibenzo-dithia-18C6-dione⁵
b) réponses voltamétriques d'électrodes sélectives modifiées avec l'éther couronne dicyclohexyl-18-C-6
(ligne pointillée : en absence de Tl(I) ; ligne noire : présence de Tl(I) 20ng.mL^{-1} ; ligne tiret : expérience
contrôle en présence de Tl(I) sur électrode non modifiée)⁶*

Un autre exemple d'électrode sélective utilise l'éther couronne (dicyclohexyl-18C6) (Fig. 3.3b) qui a été immobilisé à la surface d'une électrode dans une pâte de carbone.⁶ Dans ce travail, le cation n'est pas détecté par mesure potentiométrique, mais par mesure

voltamétrie. Le cation détecté est le thallium qui est tout d'abord préconcentré dans la pâte de carbone par application d'un potentiel négatif et ensuite détecté par voltamétrie impulsionnelle différentielle (*differential pulse voltammetry*). Le courant mesuré est proportionnel à la concentration en thallium sur une gamme de 3 à 250 ng/L.⁶

Les éthers couronnes discriminent les cations par leurs tailles et la nature des atomes du macrocycle et leur étude a été réalisée pour la conception de capteurs sélectifs. La complexation de cations par les éthers couronnes permet de les séparer d'un milieu ou de les concentrer localement pour effectuer une analyse quantitative.

1.2. Sondes inorganiques

Dans les exemples présentés précédemment, la détection de la cible se fait par la mesure d'un signal qui résulte directement du cation qui est isolé par la complexation avec l'éther couronne. Une autre voie de détection de cations métalliques utilise des complexes organométalliques modifiés par des éthers couronnes. Les complexes organométalliques et particulièrement ceux dont l'état excité MLCT (*Metal to Ligand Charge Transfer*) est observé dans le domaine du visible ont été étudiés pour la réalisation de sondes. Le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est le complexe le plus exploité dans ce domaine car il possède des propriétés spectroscopiques intéressantes (absorbance dans le domaine du visible, état excité relativement intense et longue durée de vie).⁸ De plus, ce complexe peut effectuer des réactions électrochimiques à l'état fondamental et à l'état excité dans une gamme de potentiels accessibles en milieu aqueux.⁸ Pour ces raisons, le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est largement utilisé dans la réalisation de sondes spectroscopiques et électrochimiques.

1.2.1. Propriétés spectroscopiques

Le diagramme d'énergie du complexe est représenté dans la figure 3.4. Les différents états excités accessibles à basse énergie sont l'état MC (centré sur le métal), l'état MLCT (transfert de charge du métal vers le ligand) et l'état LC (centré sur le ligand) dont l'énergie des niveaux va dépendre respectivement de la force du champ des ligands, des propriétés red-ox du métal et du ligand et des propriétés intrinsèques des ligands.⁸

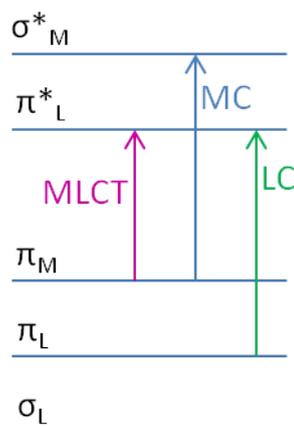


Figure 3.4 : diagramme d'orbitales moléculaires simplifié du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dans la symétrie octaédrique et les transitions électroniques (MC, MLCT et LC)⁹

Pour la plupart des complexes de Ru(II) polypyridine, le niveau excité accessible le plus bas est le niveau $^3\text{MLCT}$. L'excitation du complexe à ce niveau conduit à une désexcitation par voie radiative, qui présente une luminescence intense et une durée de vie relativement longue.⁸ Le niveau énergétique de ces états excités est fortement influencé par l'environnement du complexe et les propriétés des ligands. En jouant sur le choix du ligand, il est donc possible de contrôler les propriétés physico-chimiques du complexe et donc de concevoir une sonde présentant les propriétés désirées.⁸

Par exemple, le complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpyaza-18C6})(\text{CN})_3]^-$ (tpyA18C6 = N-[4'-(2,2':6',2''-terpyridyl)]-Aza-18C6) absorbe dans le domaine du visible (Fig. 3.5).¹ La couleur de la solution est reliée à la bande d'absorbance observée entre 430 et 570 nm, qui correspond à la transition MLCT entre l'orbitale du métal $d\pi\text{Ru}^{2+}$ vers l'orbitale $\pi^*(\text{tpyA18C6})$ du ligand. Cette bande d'absorbance est fortement influencée par la nature du solvant. On observe un décalage vers les longueurs d'onde inférieures lors du passage de l'acétonitrile à l'eau. Ce fort solvatochromisme est observable à l'œil nu (Fig. 3.5) et peut s'expliquer par l'interaction entre les groupements cyano et le solvant.¹ Un décalage est également observé en fonction du pH de la solution¹ du fait de la protonation des ligands cyano. Cet exemple permet d'illustrer l'influence de l'environnement du complexe de Ruthénium sur ces propriétés physico-chimiques.

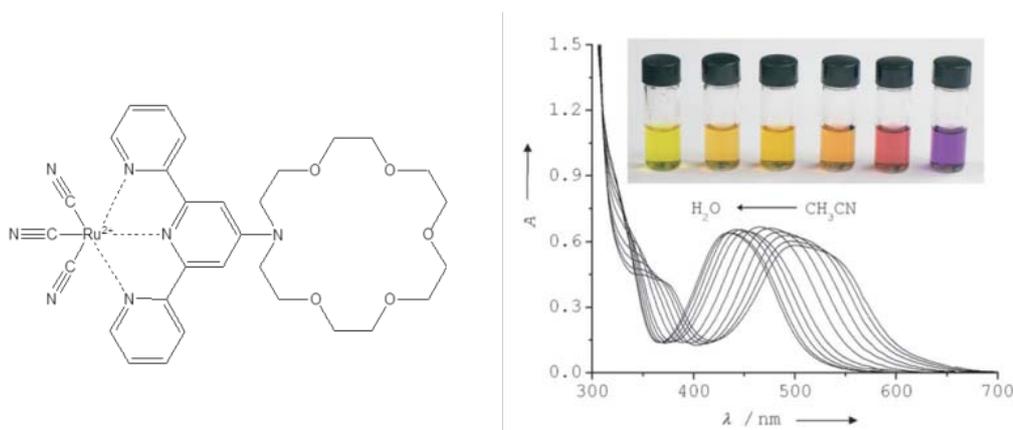


Figure 3.5 : structure du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpyaza-18C6})(\text{CN})_3]$ et effet du solvant sur la bande d'absorbance de la transition MLCT (changement de l'acétonitrile pur à l'eau)¹

Les effets de l'environnement du complexe (substitution du ligand, solvant...) sur ses propriétés physico-chimiques vont conduire à deux effets observables en spectroscopie. D'une part, la variation du niveau d'énergie du premier état excité peut conduire à un décalage de la longueur d'onde maximale d'absorbance ou d'émission comme dans le cas du complexe de la figure 3.5. D'autre part, les effets stériques ou électroniques causés par les ligands peuvent avoir une influence sur l'intensité du signal. Dans le cas du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, le premier état excité est l'état MLCT, le rendement quantique de fluorescence dépend donc directement de l'efficacité du transfert électronique entre le métal et le ligand et la structure du ligand (nature des atomes et géométrie).

Par exemple, l'ajout d'éléments électrodonneurs sur le ligand va enrichir le ligand en densité électronique et donc défavoriser le transfert électronique du métal vers celui-ci ce qui conduit à une diminution du rendement quantique de fluorescence du complexe. Comme les éthers couronnes sont des éléments électrodonneurs, leur présence sur le ligand va donc limiter la fluorescence du complexe.¹⁰ Lors de la complexation du métal, cet effet électrodonneur est diminué, puisque la densité électronique est alors concentrée vers le cation métallique et ce phénomène est observable par une augmentation de la fluorescence. Par exemple, dans la figure 3.6, le complexe de Ruthénium présente une sélectivité intéressante pour le mercure (Hg^{2+}) par fluorescence. Dans ces travaux,¹¹ différents ligands possédant des éthers couronnes ont été étudiés. Le complexe représenté dans la figure 3.6a est le seul qui permet de détecter le mercure. La sensibilité de ce ligand s'explique par la proximité entre les atomes d'azote donneurs de l'éther cyclique et le ligand. Cette proximité permet d'accentuer

l'effet du *quenching* de la fluorescence. L'augmentation de fluorescence peut alors être observée en présence de mercure.¹¹ Le complexe est également sensible aux cations Zn^{2+} , Ca^{2+} et Ba^{2+} mais l'augmentation observée dans le cas de ces cations est moins importante (cf. Fig. 3.6c).

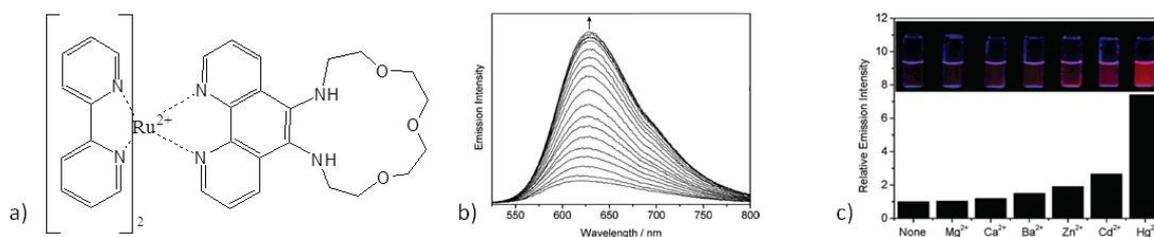


Figure 3.6: a) structure du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phen-2NH})]^{2+}$ b) spectre d'émission du complexe dans l'acétonitrile avec additions successives de Hg^{2+} c) photographie montrant la sélectivité du complexe pour la détection de Hg^{2+} après ajout de 10 éq. de cations¹¹

D'autres sondes reposent sur la torsion du ligand bipyridine,^{12,13} comme par exemple, pour le complexe de la figure 3.7. Dans ces travaux,¹³ la torsion du ligand bipyridine bloque la conjugaison π du ligand bipyridine et limite le transfert de charge MLCT. Lors de la complexation du cation dans le polyéther cyclique, cette torsion est réduite et la fluorescence est alors augmentée ce qui permet de détecter l'ion cible.¹³

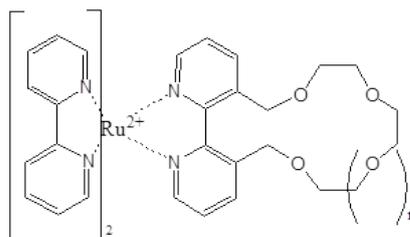


Figure 3.7 : structure d'un complexe de $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{CE-bpy})^{2+}$ ¹³

1.2.2. Propriétés électrochimiques

Les propriétés électrochimiques de ce type de complexe sont également largement influencées par la nature du ligand et par sa substitution.¹⁴ En voltamétrie cyclique, le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ présente une vague réversible autour de 1.2 V (vs. Ag/AgCl) correspondant à l'oxydation du Ru^{II} en Ru^{III} .¹⁵ La valeur de ce potentiel d'oxydation va être influencée par la substitution du ligand bipyridine. Lorsque le ligand présente un effet

électrodonneur comme les éthers couronnes, le complexe de Ruthénium est alors enrichi en densité électronique ce qui augmente le niveau de l'orbitale occupée la plus haute (HOMO). En conséquence, son oxydation devient plus facile et le potentiel d'oxydation est diminué de quelques dizaines de millivolts.¹⁶ Lors de la complexation d'un cation par l'éther couronne, la densité électronique est alors éloignée du centre métallique et un décalage vers les potentiels plus grands est alors observé.¹⁶ Par exemple, l'équipe de J.-C. Moutet a publié la réalisation d'une électrode modifiée avec différents complexes de Ruthénium dont les ligands possèdent des groupements éther couronne (Fig. 3.8).¹⁵ La complexation de métaux alcalins au sein des éthers couronnes conduit à l'augmentation du potentiel d'oxydation de ces complexes et peut être suivie par voltamétrie.¹⁵

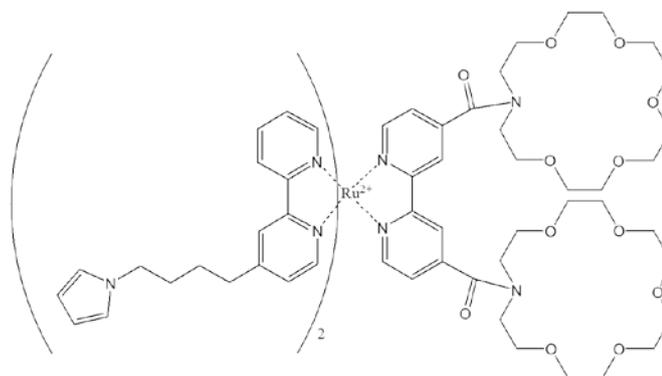


Figure 3.8 : structure du complexe de $\text{Ru}(\text{pyrrole-bpy})_2(\text{CE-bpy})^{2+}$ électropolymérisable¹⁵

La combinaison des propriétés électrochimiques et spectroscopiques du complexe de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et de la capacité des éthers couronnes à complexer sélectivement certains cations permet de réaliser des sondes sensibles et sélectives pour la détection de cations par différentes voies (voltamétrie, spectroscopie d'absorbance et d'émission). Comme nous l'avons décrit précédemment, le complexe de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est également un luminophore ECL très courant et la synthèse de sondes utilisant cette technique a également été réalisée.^{17, 18, 19}

1.3. Détection de cation par ECL

Les spectres de photoluminescence et ECL du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ présentent les mêmes maxima ($\lambda_{\text{ém}} = 610 \text{ nm}$). Cela indique le même état excité du complexe est atteint par

ECL et par photoluminescence (MLCT). Les comportements décrits dans la partie précédente s'appliquent donc également à l'étude de ces complexes par ECL. Quelques exemples de sondes pour la détection de cations par ECL utilisant des complexes de Ruthénium ont été décrits dans la littérature.^{1, 17, 18, 19, 20} L'originalité de ces travaux repose sur la détection d'espèces non luminescentes par ECL.

En 2002, les équipes de A. J. Bard¹⁹ et M. M. Richter¹⁸ démontrent l'utilisation combinée des éthers macrocycliques et de l'ECL de complexes de Ruthénium modifiés.

Dans les travaux de A. J. Bard,¹⁹ le complexe de la figure 3.9 a été étudié en milieu aqueux et organique (acétonitrile). Ce complexe possède un ligand bipyridine modifié avec une chaîne polyéther et est similaire au complexe de la figure 3.7. Les effets stériques et électroniques causés par la torsion de la chaîne polyéther entraînent une diminution de la luminescence de ce complexe. De même qu'en photoluminescence, la complexation de l'ion sodium (Na^+) conduit à un changement de la structure du ligand qui permet alors l'augmentation du signal ECL.¹⁹

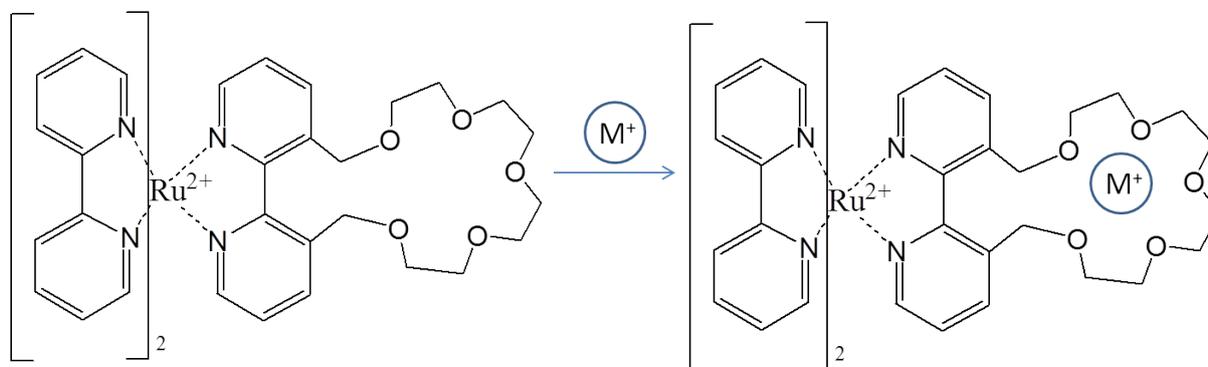


Figure 3.9: structure du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{CE-bpy})^{2+}$

Dans les travaux de M. M. Richter,¹⁸ un éther couronne aza-18C6 est rattaché au ligand bipyridine (Fig. 3.10). L'intensité ECL est augmentée en présence de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} et K^+ de façon plus importante qu'en photoluminescence ce qui démontre la meilleure sensibilité de cette technique.¹⁸ L'augmentation d'intensité est expliquée par la diminution de l'effet donneur du doublet de l'azote de l'éther couronne avec la complexation du cation métallique, ce qui favorise le transfert MLCT.

Cette étude a été réalisée dans un mélange acétonitrile-eau (50-50). Dans ces conditions, l'intensité photoluminescente est augmentée en présence des trois cations Pb^{2+} , Hg^{2+} et Cu^{2+} mais le cation K^+ n'a pas d'influence.

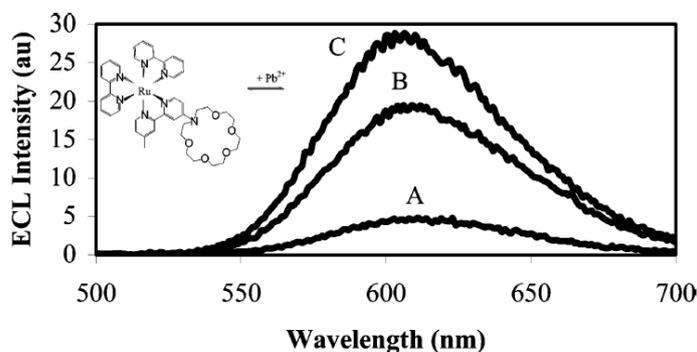


Figure 3.10 : détection de Pb^{2+} avec le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{aza-18C6-bpy})^{2+}$ par ECL
(A) 0, (B) 0.5 et (C) 1mM Pb^{2+} ²¹

Pour compléter cette étude, M. M. Richter publie la même année l'étude du même complexe dans un milieu purement aqueux par ECL et par photoluminescence.²¹ Dans ces conditions, la photoluminescence est augmentée en présence de Hg^{2+} et Ag^+ mais aucune augmentation n'est observée pour les autres cations (Cu^{2+} et Pb^{2+}) contrairement aux phénomènes observés dans le mélange acétonitrile-eau. Cependant, par ECL, l'influence des mêmes cations (Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+}) est observée. L'influence de l'environnement et du choix de la technique analytique sont donc déterminantes pour l'étude de ce type de systèmes.

Le complexe présenté dans la partie précédente (Fig. 3.6)¹¹ a également été étudié par ECL par le même groupe.²⁰ La luminescence est augmentée en présence de cations métalliques (métaux de transition et métaux alcalins). Le phénomène est donc similaire à celui observé en photoluminescence et s'explique par la diminution de la densité électronique sur le ligand phénantroline lors de la complexation du cation par l'éther couronne.

Ces différentes études démontrent que l'utilisation de luminophores ECL modifiés par des éthers couronne est compatible avec la détection de cations. Dans ce cadre, l'équipe de M. Schmittl²² a publié une étude comparative des complexes de Ruthénium et d'Iridium du point de vue de leurs propriétés luminescentes et électrochimiques. Dans cette étude, ils démontrent que le ligand phénantroline modifié avec les éthers couronnes fait partie de

l'orbitale LUMO dans le cas du complexe d'Iridium et de l'orbitale HOMO dans le cas du Ruthénium.²² L'interaction avec le cation va donc modifier respectivement le niveau de ces orbitales. En électrochimiluminescence, la génération de l'état excité se produit suivant deux étapes. Premièrement, l'oxydation du complexe puis la réduction par le radical TPrA qui génère alors l'état excité (cf. Chap.1.III). La génération de l'état excité est donc soumise à un équilibre représenté dans la figure 3.11, où les deux formes du complexe (chargées avec le cation métallique ou non) sont en compétition. La voie choisie pour la génération de l'état excité sera donc la plus favorable énergétiquement. Dans le cas du complexe de Ruthénium, le complexe non chargé sera plus facilement oxydé (HOMO plus haute) et celui-ci sera préférentiellement réduit par le radical TPrA. L'émission sera donc observée à partir du complexe sans cation métallique au sein de son éther couronne. Dans le cas de la photoluminescence, l'état excité n'est pas généré par l'intermédiaire d'un équilibre et cette discrimination n'est donc pas observée.

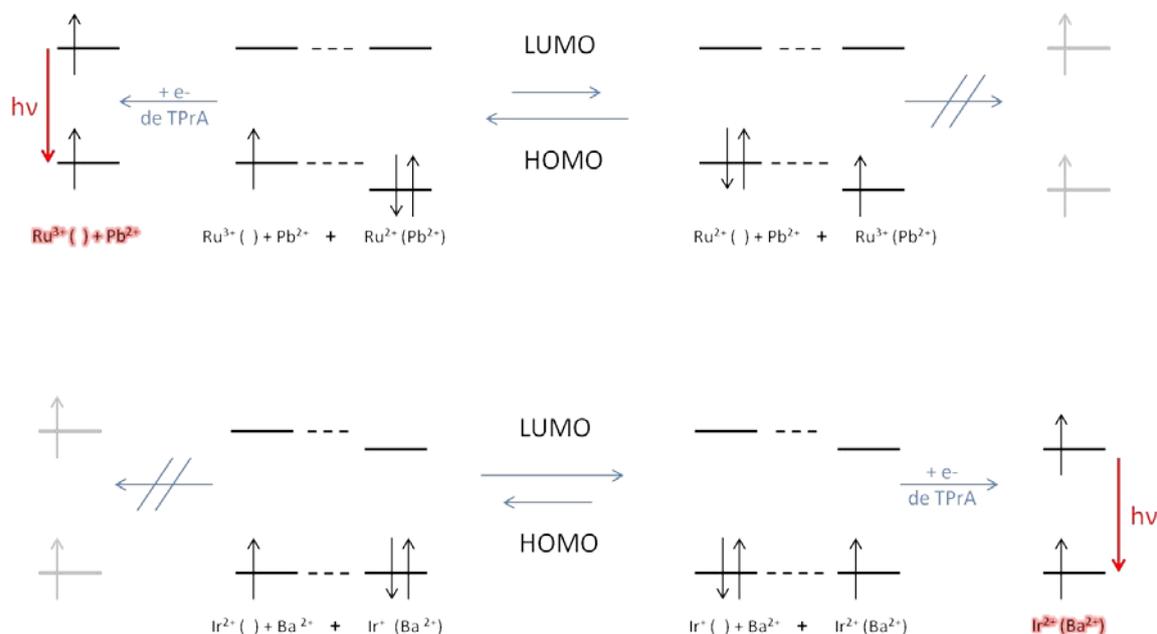


Figure 3.11 : illustration schématique de la population de l'état excité triplet des complexes d'Iridium et de Ruthénium par ECL en présence et absence de cation métallique²²

Dans le cas de l'Iridium, l'orbitale LUMO est affectée par le ligand et la première étape d'oxydation ne sera donc pas différenciée entre le complexe chargé et non chargé par le cation (HOMO au même niveau d'énergie). Par contre, la deuxième étape favorise fortement la

réduction du complexe chargé (LUMO plus basse). En conséquence, c'est le complexe chargé par le cation métallique qui est responsable de la luminescence dans le cas de l'Iridium. L'équipe de Schmittel conclut de cette étude que le complexe d'Iridium est plus adapté à la réalisation de sondes pour la détection de cation par ECL, puisque l'état excité formé par ECL est directement affecté par la complexation au sein de l'éther couronne. Cependant, comme nous l'avons détaillé dans cette partie du chapitre, l'utilisation des complexes de Ruthénium pour la détection de cations par ECL a été également développée et est souvent favorisée pour les meilleurs rendements quantiques d'émission ECL des complexes de Ruthénium par rapport à ceux d'Iridium.

1.4. Laboratoire sur molécule

La possibilité de détecter différentes analytes en utilisant une seule sonde a été étudiée par différents groupes.^{12, 23, 24} Ce type de sonde est appelé « laboratoire sur molécule » (*lab-on-molecule*), en analogie aux « laboratoires sur puces » (*lap-on-chip*), capables de détecter plusieurs analytes sur le même objet. Les premières sondes qui ont été élaborées dans ce but reposaient sur l'utilisation de différents sites récepteurs greffés sur la même molécule.²³ Ensuite, une autre approche a été développée et repose sur un seul site récepteur capable de discriminer l'analyte cible en fonction de la méthode analytique employée.

Par exemple, la sonde représentée dans la figure 3.12 permet de détecter le L-glutamate par photoluminescence et le dihydrogénophosphate par ECL.¹² Dans cet exemple, la sélectivité du complexe est différente entre les deux techniques car le L-glutamate est oxydé dans la gamme de potentiels utilisés pour la génération de l'ECL. Lors de la génération de l'état excité, le L-glutamate est donc modifié et ne pourra plus être détecté par la sonde, ce qui favorise la détection du dihydrogénophosphate, bien qu'il ait une affinité plus faible que le glutamate avec la sonde.

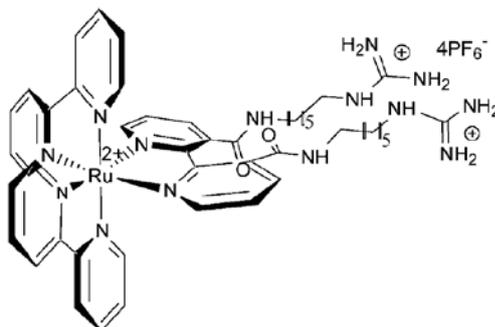


Figure 3.12 : structure du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ modifié pour la détection du dihydrogénophosphate et du L-glutamate ¹²

L'équipe de M. Schmittel a étudié la sonde de la figure 3.13, qui est similaire à celle utilisée dans les travaux de cette thèse. Cette sonde ne présente qu'un seul site de reconnaissance mais permet de réaliser la détection de Cu^{2+} , Pb^{2+} et Hg^{2+} en utilisant des méthodes analytiques différentes. En effet, les propriétés red-ox du complexe sont modifiées par la présence de Pb^{2+} , le spectre d'émission par la présence de Pb^{2+} et de Cu^{2+} , le spectre d'absorbance par Cu^{2+} et l'intensité du signal ECL par Hg^{2+} . ²⁴

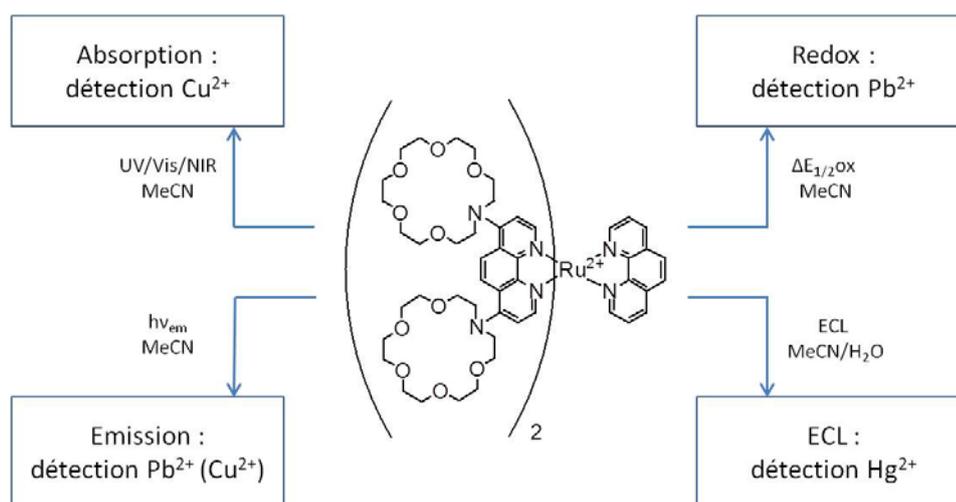


Figure 3.13 : détection de différents cations avec le complexe $\text{Ru}(\text{phen})(\text{CE-phen})_2^{2+}$ par quatre voies différentes ²⁴

La discrimination entre les différents cations peut être expliquée par la différence d'interaction entre le doublet libre de l'azote de l'éther couronne et le cation en fonction des

différentes méthodes employées. Dans cette étude, l'utilisation du ligand phénantroline plutôt que d'un ligand bipyridine permet d'éviter la torsion du ligand. En conséquence, l'espace occupé par l'éther couronne est confiné ce qui limite le recouvrement du doublet de l'azote avec le système π du ligand.²⁴ Lors de l'excitation de la sonde ou de son oxydation, ce recouvrement est modifié de façon différente ce qui explique le changement de sélectivité de la sonde.²⁴

La présence de plomb (Pb^{2+}) a un effet sur l'intensité d'émission et sur le potentiel redox du complexe de Ruthénium. On peut donc supposer que ce cation est complexé au sein de l'éther couronne ce qui conduit à une diminution de la densité électronique sur le ligand phénantroline. Cette diminution conduit, d'une part, à une augmentation du rendement quantique de fluorescence puisqu'elle facilite le transfert MLCT et, d'autre part, à une diminution du niveau de l'orbitale HOMO et donc à une augmentation du potentiel redox.

La complexation du cuivre (Cu^{2+}) a un effet sur le spectre d'absorbance qui augmente dans le domaine du proche infra-rouge et sur le spectre de fluorescence qui est fortement diminué en présence de cuivre. L'effet de *quenching* du Cu^{2+} sur la fluorescence de ce type de complexe a déjà été décrit dans la littérature^{25,21} et s'explique par un transfert d'énergie ou un transfert électronique entre l'état excité du complexe de Ru^{II} vers Cu^{2+} .

Le mercure (Hg^{2+}) a une influence sur le spectre ECL, dont l'intensité est fortement augmentée en sa présence. Le mercure Hg^{2+} a un rayon similaire à celui de Pb^{2+} (1.19 Å).⁴ L'augmentation du rendement quantique du signal ECL s'explique donc probablement, comme dans le cas du spectre d'émission, par une diminution de la densité électronique sur le ligand mais fait encore l'objet d'études. Ces propriétés ECL ont été exploitées dans le cadre de cette thèse pour la réalisation du capteur sur réseaux de fibres optiques.

II. Immobilisation de la sonde par électropolymérisation

II.1. Généralités

L'électropolymérisation a été introduite dans le chapitre 1. Cette méthode a été choisie pour l'immobilisation du complexe de Ruthénium car elle permet de déposer le complexe sur le réseau microstructuré de façon homogène et contrôlée. Le polymère obtenu possède une bonne stabilité dans les solvants organiques et peut être déposé sur différents matériaux d'électrode (carbone vitreux, ITO, platine...).

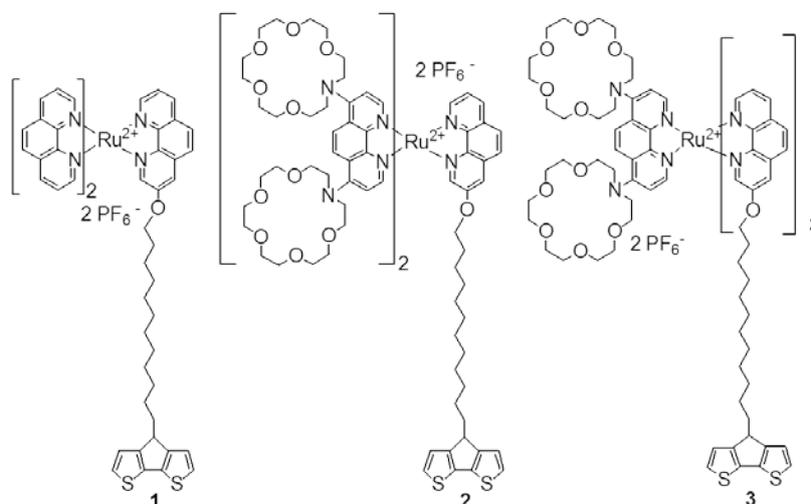


Figure 3.14 : complexes de Ruthénium électropolymérisables utilisés pour la réalisation de notre capteur

Les complexes utilisés dans cette thèse sont représentés sur la figure 3.14. Le premier complexe ne présente pas d'éther couronne et nous permet de faire une étude préliminaire sur le comportement de ces complexes lors de l'électropolymérisation.

L'immobilisation de complexes métalliques par électropolymérisation a été introduite par H. D. Abruna²⁶ avec l'utilisation de la fonction vinyle afin de déposer des complexes de Ruthénium et de Fer à la surface d'électrodes de platine et d'autres matériaux. Plus tard, P. D. Beer, s'inspire de ces travaux pour l'immobilisation de complexes de Ruthénium modifiés avec des éthers couronnes (figure 3.15).²⁷ Cependant, les complexes polymérisés sont insensibles à la présence de cations. Cette insensibilité a été attribuée à la rupture de la conjugaison entre le site complexant et le complexe de Ruthénium lors du procédé de polymérisation.¹⁶

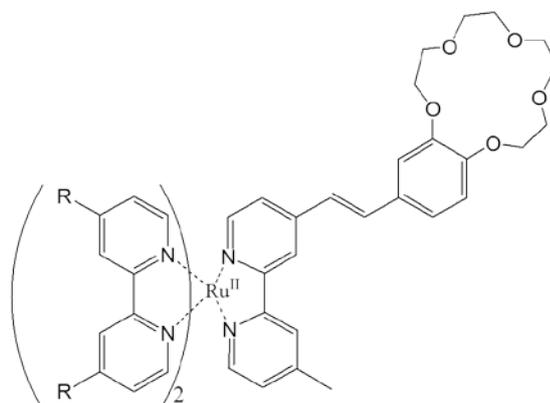


Figure 3.15 : complexe de Ruthénium électropolymérisable²⁷

L'utilisation de polymères conducteurs pour l'immobilisation de complexes de Ruthénium a ensuite été rapportée par différents groupes. Le groupe de S. Cosnier^{28, 29, 30} a étudié l'utilisation de différents complexes de Ruthénium électropolymérisables comme par exemple le complexe de la figure 3.16.

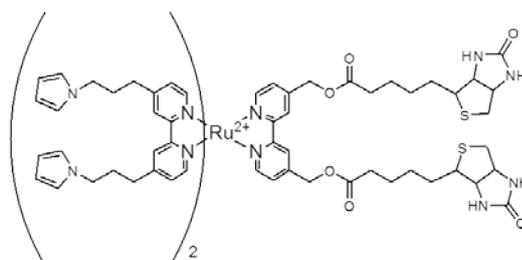


Figure 3.16 : complexe de Ruthénium électropolymérisable fonctionnalisé avec la biotine²⁸

La fonction pyrrole permet d'immobiliser le complexe à la surface de l'électrode, tandis que la partie biotine permet de rattacher une sonde d'intérêt en utilisant la reconnaissance biotine-avidine. Cette approche a été utilisée par exemple pour la réalisation d'un immunocapteur pour la détection de la toxine du choléra.²⁸ Le groupe de S. Cosnier a également décrit l'étude de l'électropolymérisation de complexes similaires sur nanotubes de carbone et étudié l'effet de ces derniers sur le taux de recouvrement.³⁰

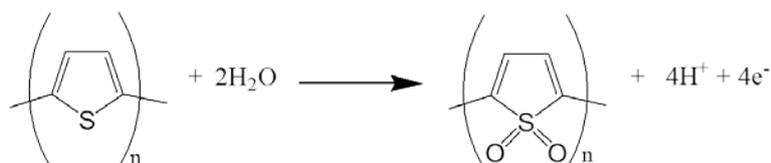
Les complexes déjà présentés dans la partie I.2.2 (Fig. 3.8) présentent également la fonction pyrrole et ont été étudiés par l'équipe de J.-C. Moutet.¹⁵ Ils ont été électropolymérisés à la surface d'une électrode pour réaliser la détection de cation par voltamétrie. Dans leur cas, seulement un faible décalage en valeur de potentiel d'oxydo-réduction a été observé et ce système présente également une faible sélectivité. Ce comportement est expliqué encore une fois par la mauvaise conjugaison entre le site liant (éther couronne) et le ligand phénantroline probablement due à la fonction amide présente entre les deux parties de la sonde.

Pour résoudre ce problème, les complexes utilisés dans les travaux de cette thèse présentent plusieurs sites complexant, reliés directement au ligand phénantroline pour assurer une bonne reconnaissance de la sonde pour le cation cible (Fig. 3.14).¹⁶

Le polymère choisi a une importance fondamentale pour la réalisation du capteur. Il doit présenter certaines caractéristiques essentielles. D'une part, la perméabilité du polymère doit être suffisante pour permettre à l'analyte et au coréactif ECL de diffuser au sein du film et de réagir avec le complexe. D'autre part, les polymères conducteurs possèdent souvent une large bande d'absorbance dans le domaine du visible ce qui limite leur utilisation dans le domaine des capteurs luminescent. Le choix de polymères à base de thiophène permet de contourner cette limitation puisque ces polymères présentent un effet électrochrome intéressant, qui permet de modifier leurs propriétés optiques (*cf.* II.3.).

Le polythiophène est un polymère conducteur similaire au polypyrrole et résulte également de la formation de radicaux cations, qui réagissent ensemble et forment une chaîne polymérique (*cf.* Chapitre 1.II.1.3).

A la valeur de potentiel nécessaire à l'oxydation du monomère, le polymère est suroxydé selon l'équation ci-dessous, ce qui affecte fortement les propriétés du polymère. Ce phénomène est appelé le « paradoxe du polythiophène », puisque pour former le polymère il est nécessaire d'atteindre des conditions drastiques, auxquelles le polymère perd ses propriétés.



Pour limiter cet effet, l'utilisation de bithiophène ou terthiophène permet d'abaisser la valeur du potentiel d'oxydation du monomère à une valeur similaire à celle du pyrrole. Dans cette thèse, le CPDT (4*H*-cyclopenta[2,1-*b*:3,4-*b'*]dithiophène) a été choisi car il peut être polymériser dans des conditions moins violentes (potentiel plus bas). Il permet de former un polymère stable, dont les propriétés électrochimiques et spectroscopiques sont intéressantes pour la réalisation de notre capteur.

II.2. Electropolymérisation des complexes 1,2 et 3

La synthèse du film de polymère se fait préférentiellement par VC (voltamétrie cyclique) plutôt qu'avec l'application d'un potentiel constant. Cette méthode permet d'éviter

la suroxydation du polymère et également de suivre la croissance du film. Sur la figure 3.17 par exemple, on peut voir l'augmentation du courant avec le nombre de scans successifs ce qui correspond à l'augmentation de la quantité de polymère immobilisée à la surface de l'électrode.

Avant de réaliser la polymérisation des complexes sur le réseau de fibres optiques, une étude préliminaire a été réalisée sur des plaques d'ITO et sur électrode de platine en collaboration avec le groupe de M. Schmittel à l'université de Siegen (*cf.* Fig. 3.17).¹⁶

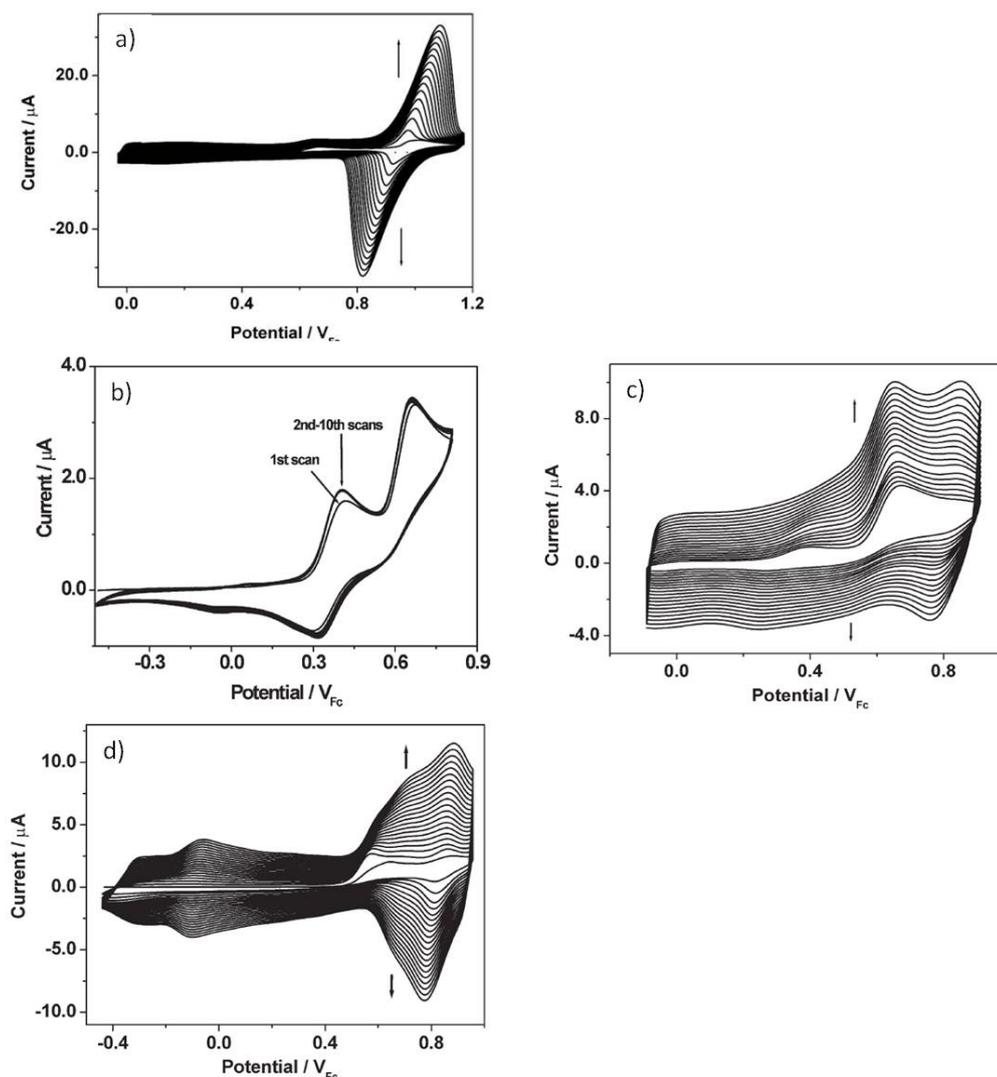


Figure 3.17: a), b) et d) voltamétries successives des complexes 1, 2 et 3 (1 mM) et c) de 2+CPDT (1 mM) sur électrode de Pt dans CH_2Cl_2 - $n\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ à $v=100\text{mV/s}$ ¹⁶

Le complexe **1** ne possède pas d'éther couronne. Sur la voltamétrie cyclique (Fig. 3.17 a), on distingue deux vagues d'oxydation. La première vague irréversible à 0.67 V vs. Fc (=

1.02 V *vs.* Ag/AgCl) correspond au potentiel d'oxydation du monomère (CPDT) et la vague quasi réversible à 0.92 V (= 1.27 *vs.* Ag/AgCl) celle du complexe de Ru^{2+} en Ru^{3+} . On constate une augmentation du courant avec le nombre de cycle ce qui correspond bien à une augmentation de la quantité de film à la surface de l'électrode.

Les mêmes conditions ont été testées pour réaliser l'électropolymérisation du complexe **2**. Le résultat est représenté sur la figure 3.17b. Sur les voltamogrammes cycliques, on peut distinguer deux vagues. On retrouve, à nouveau, la vague non réversible du monomère à 0.67 V *vs.* Fc. Mais la vague réversible du complexe de Ruthénium est cette fois décalée à une valeur de potentiel moins anodique (0.36 V *vs.* Fc = 0.71 V *vs.* Ag/AgCl). Cet effet est cohérent avec les observations faites précédemment. La présence d'éthers couronnes (groupements électrodonneurs) va augmenter le niveau de l'orbitale occupée la plus haute et donc faciliter l'oxydation du complexe. Sur les voltamétries successives de la figure 3.17b, aucune augmentation du courant n'est observée ce qui nous indique que le polymère n'est pas formé à la surface de l'électrode. Cet effet est expliqué par l'encombrement stérique créé par les quatre éthers couronnes présents sur les ligands.¹⁶ Pour pallier à ce problème la solution envisagée a été de réaliser l'électrocopolymérisation dans un mélange de monomère du complexe **2** et de CPDT non fonctionnalisé.¹⁶ La voltamétrie obtenue est représentée dans la figure 3.17c. On observe, cette fois-ci, une augmentation du courant avec le nombre de cycles, ce qui correspond à la croissance du film à la surface de l'électrode de travail.

Le troisième complexe est un complexe intermédiaire, où seulement un ligand phénantroline est modifié avec des groupements éthers couronnes. Il n'est donc pas nécessaire de réaliser une électrocopolymérisation avec l'ajout de CPDT. La figure 3.17d représente les voltamétries successives réalisées avec ce complexe. Les pics d'oxydation du CPDT et du Ruthénium se distinguent difficilement du fait de leur proximité. Le pic réversible du Ruthénium est observé autour de 0.8 V *vs.* Fc (1.15 V *vs.* Ag/AgCl), valeur intermédiaire par rapport aux deux autres complexes ce qui s'explique par la présence de seulement deux éthers couronnes sur un des ligands phénantroline. On observe, comme dans le cas du complexe **1**, une augmentation du courant avec le nombre de cycles qui correspond à la formation du film à la surface.

Les propriétés du film de polymère ainsi obtenu ont d'abord été étudiées sur plaque d'ITO. Les voltamétries cycliques des films obtenus présentent un pic réversible

correspondant à l'oxydation du Ruthénium immobilisé à la surface. Ce pic est caractéristique d'un système adsorbé : écart entre les potentiels du pic d'oxydation et de réduction (ΔE) égal à 0 et valeur de courant de pic proportionnel à la vitesse de balayage.¹⁶

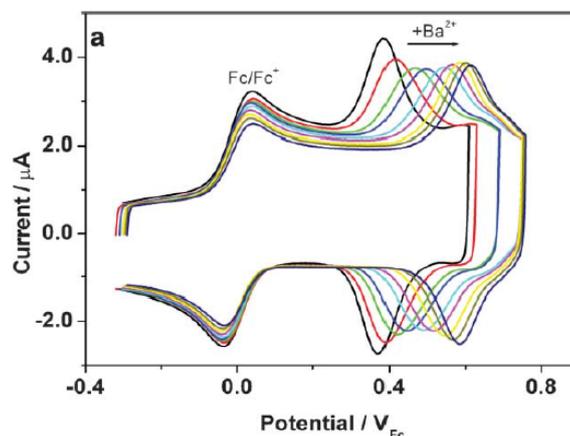


Figure 3.18 : réponse électrochimique du copolymère 2+CPDT sur plaque d'ITO en présence de différentes concentrations de Ba^{2+} (de gauche à droite : 0, 0,1, 0,5, 1, 1,2, 3, 5, 7 et 10mM dans $\text{ACN-nBu}_4\text{NPF}_6$)¹⁶

Ce pic est décalé lors de la complexation d'un cation au sein de l'éther couronne. Il a été démontré que le polymère obtenu avec le complexe 2 est capable de détecter le cation Ba^{2+} (Fig. 3.18) par électrochimie. Les effets de la complexation de cations sont donc les mêmes que ceux observés en solution. Ce résultat est encourageant, puisqu'il permet de conclure sur la bonne stabilité et perméabilité du film pour réaliser la détection de cations à la surface de l'électrode. La perméabilité du film est un critère très important puisqu'il va conditionner la diffusion des espèces au sein du polymère.

II.3. Transparence du film

Les polymères conducteurs (dans leur état neutre) sont connus pour absorber fortement dans le domaine du visible et cette propriété peut être une limitation importante au développement de capteurs luminescents. En effet, l'absorbance du polymère peut empêcher le passage du signal optique au travers de la fibre.

Une propriété essentielle pour la réalisation de ce capteur est donc la possibilité de moduler l'absorbance du film par électrochimie. Les polymères conducteurs et particulièrement ceux à base de thiophène sont connus pour leur propriété électrochromes.³¹ L'électrochromisme est défini par le changement réversible des propriétés optiques d'un

matériau, induit par l'application d'un potentiel.³¹ Il existe trois types de matériaux électrochromes, dont les petites molécules organiques (comme le méthyl viologène), certains oxydes de métaux de transition (comme les oxydes de tungstène) et les polymères conducteurs. Les applications de ces matériaux sont variées, comme par exemple, la conception de fenêtres intelligentes dont la transparence peut être changée en fonction de la luminosité extérieure.³¹

Différents paramètres, permettant de caractériser les matériaux électrochromes, existent. Par exemple, le contraste électrochromique ($\Delta \%T$) caractérise la différence de transmittance du film, à une valeur de longueur d'onde, entre une forme et l'autre. L'efficacité électrochromique se calcule à partir de l'équation :

$$\eta = (\Delta OD) / Q$$

où ΔOD correspond à la variation de densité optique, qui est divisée par la charge électronique injectée dans le matériau Q .³¹

L'une des propriétés les plus importantes est la vitesse de changement de couleur qui va dépendre de différents paramètres dont : la conductivité ionique de l'électrolyte, l'accessibilité des ions dans le film, l'amplitude du potentiel appliqué, l'épaisseur et la morphologie du film. La stabilité électrochromique dépend principalement de la stabilité électrochimique et peut être diminuée en présence d'eau et d'oxygène (qui peuvent induire des contre réactions), ou encore, à cause de la résistance du film (qui induit une augmentation de la température). Ces phénomènes sont encore les principales limitations pour l'utilisation de ces polymères conducteurs à des fins commerciales.³¹

Bien que moins développés, les polymères conducteurs présentent certains avantages par rapport aux autres matériaux électrochromes, comme un bon contraste entre les formes colorées et transparentes, un temps de réponse court et une durée de vie relativement longue. De plus, la possibilité de substituer le polymère permet d'influencer et de moduler les propriétés électrochromes du film en jouant sur les effets stériques et électroniques des substituants.

Les dérivés de thiophène (comme le PEDOT- poly(3,4-éthylènedioxythiophène) sont bien connus dans ce domaine et sont souvent valorisés car ils sont faciles à synthétiser, stables chimiquement dans leur forme oxydée, et présentent un contraste optique important.³²

L'électrochromisme est issu du changement de structure électronique du polymère. L'oxydation ou la réduction du polymère est accompagnée de l'insertion réversible d'ions dans le film ce qui correspond à leur dopage.³¹ Dans leur état neutre, ces polymères ont un comportement de semiconducteur, avec une différence d'énergie entre l'orbitale HOMO et l'orbitale LUMO. Lors de leur oxydation (dopage positif « p ») et de leur réduction (dopage négatif « n »), la structure électronique des électrons π du polymère est modifiée. Cette modification induit une diminution de la différence entre les bandes de conduction et de valence, ce qui décale la bande d'absorbance du film dans le domaine du proche infra-rouge. L'apparition de ces charges (polarons et bipolarons) dans le polymère va donc influencer les propriétés du film, telles que sa conductivité ainsi que ses propriétés optiques.³¹

L'effet électrochrome a été présenté pour le CPDT dans des travaux qui proposent l'électropolymérisation d'un dérivé du méthylviologène.³³ La couleur du polymère peut être modulée en quatre couleurs différentes, en fonction du potentiel appliqué. Dans son état oxydé (supérieur à 0.8 V vs Ag/AgCl), le polymère est transparent.

Dans ces travaux, l'équipe démontre également que le signal du méthylviologène diminue en fonction de l'épaisseur du film. Ce phénomène s'explique par le caractère isolant du polymère dans son état neutre. Dans la fenêtre de réduction du méthylviologène, le polymère est dans son état neutre et n'est donc pas conducteur, le signal électrochimique du méthylviologène ne sera donc pas visible. Dans la gamme de potentiel dans le cas de notre sonde (environ 1.2 V), le poly-CPDT est oxydé. Il est donc conducteur ce qui nous permet d'utiliser ce support dans le cadre de nos travaux.

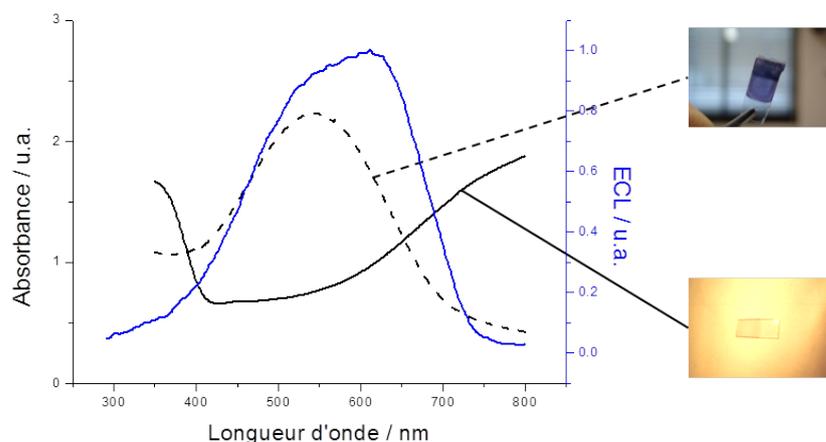


Figure 3.19 : spectre ECL (ligne bleue) du copolymère 2+CPDT dans une solution de TPrA (50mM dans ACN- nBu_4NPF_6) et spectre d'absorbance du poly-CPDT réduit (pointillés) et oxydé (ligne noire) enregistré après l'application d'un potentiel de 1.2 V et photographies correspondantes

Les propriétés d'absorbance du polymère ont été étudiées sur plaque d'ITO. Le spectre d'absorbance du poly-CPDT est représenté sur la figure 3.19 et fait apparaître une large bande d'absorbance autour de 500-600 nm (courbe noire pointillée).

Cette bande d'absorbance correspond au domaine d'émission de notre complexe de Ruthénium (Fig. 3.19 courbe bleue) ce qui est une limitation importante pour l'utilisation de ce capteur. Cependant, lors de l'application du potentiel anodique, l'absorbance du polymère est décalée dans le domaine du proche infra-rouge (Fig. 3.19 courbe noire), ce qui permet donc d'envisager de pouvoir collecter le signal au travers du film. Cet effet est observable à l'œil nu, comme le démontre les photographies prises lors de la réalisation des spectres (Fig. 3.19).

Le poly-CPDT a donc été choisi pour différents critères. D'une part, il présente une stabilité et une perméabilité compatible avec la détection de cation. D'autre part, la possibilité de moduler l'absorbance du film, dans le domaine d'émission du signal ECL, permet d'utiliser ce support pour réaliser le capteur sur le réseau de fibres optiques.

L'application du potentiel anodique et l'oxydation du polymère permettent donc de réaliser trois actions simultanément : générer le signal ECL, rendre le polymère conducteur, et diminuer son absorbance.

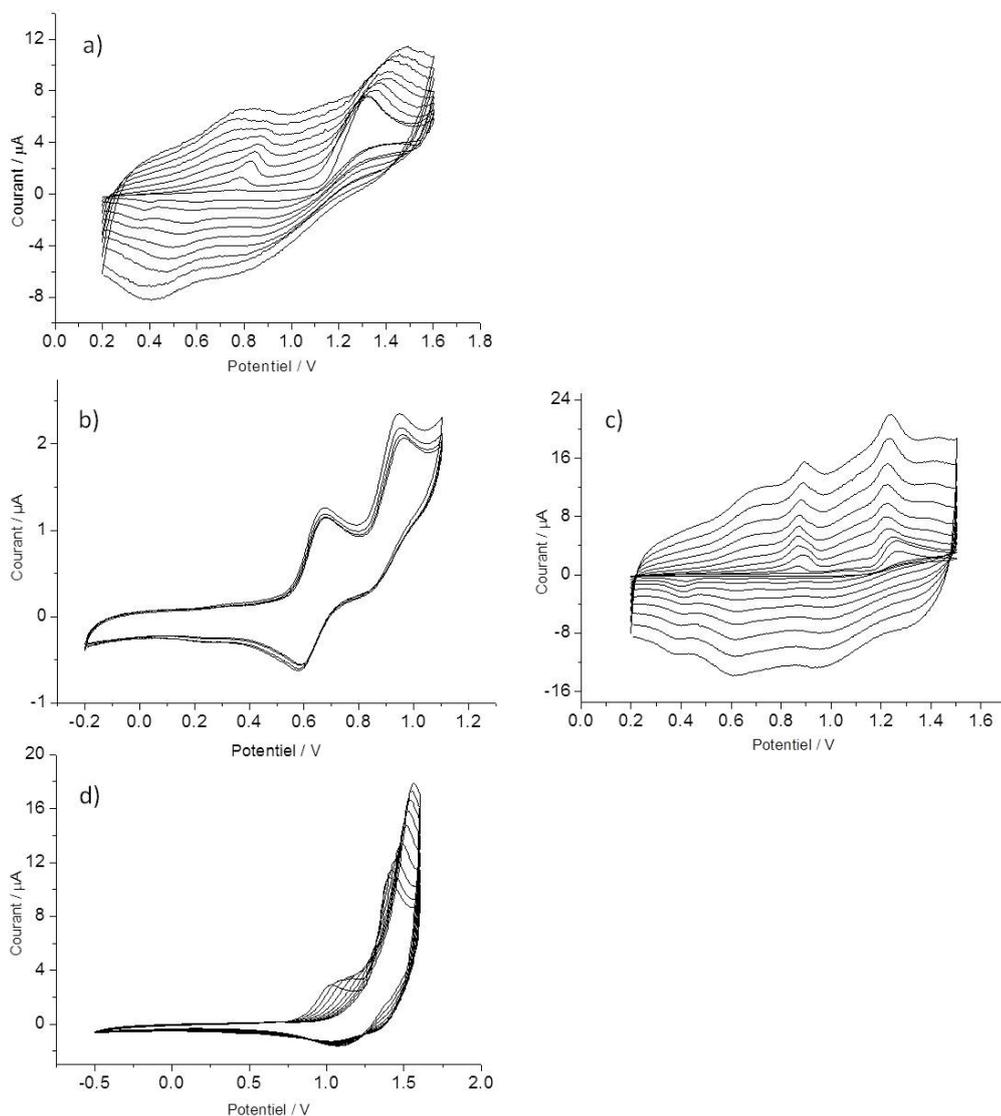
Les trois complexes ont donc été déposés avec succès à la surface de l'électrode. Les paramètres déterminés dans cette étude ont ensuite été appliqués pour réaliser l'électropolymérisation de ces complexes sur réseaux de fibres optiques.

II.4. Electropolymérisation des complexes 1, 2 et 3 sur réseaux de fibres optiques

Dans ces travaux, l'électropolymérisation a été réalisée sur réseaux de fibres métallisés, comme il a été décrit dans le chapitre 1. L'utilisation de réseaux de fibres structurées en nano-pointes permet d'augmenter la surface active de l'électrode et également d'améliorer la perméabilité du film. La métallisation a été réalisée avec une fine couche d'or ou d'ITO. L'or est déposé en couche très fine (inférieure à 50 nm) mais pose des problèmes de stabilité, particulièrement lors d'application de potentiels élevés (supérieurs à 1 V), nécessaires à la formation du polymère et à la génération de l'ECL.

Les dépôts d'ITO sont réalisés par pulvérisation cathodique et la qualité du dépôt dépend fortement des paramètres utilisés lors de la pulvérisation (pression en oxygène et argon, puissance du générateur, temps de dépôt...). La qualité du dépôt peut être évaluée en mesurant la résistivité de la couche d'ITO déposée sur une plaque de verre témoin. Les plaques commerciales (Sigma) ont une résistivité de l'ordre d'une vingtaine d'ohms par centimètre. Les dépôts réalisés dans notre cas ont une valeur de résistivité de l'ordre d'une centaine d'ohms par centimètre, mais dans le cas de mauvais dépôts, la résistivité peut aller jusqu'à plusieurs kilo-ohms par centimètre. Lorsque la résistivité du dépôt est trop importante, le dépôt du polymère est alors limité. On observe alors la voltamétrie cyclique se déformer de façon caractéristique des milieux plus résistifs (valeurs de potentiels d'oxydation plus élevés et pics plus étalés).

Les résultats correspondant à l'électropolymérisation sur les réseaux de fibres optiques métallisés sont représentés sur la figure 3.18. Le même comportement que celui observé sur électrode de platine peut être décrit.

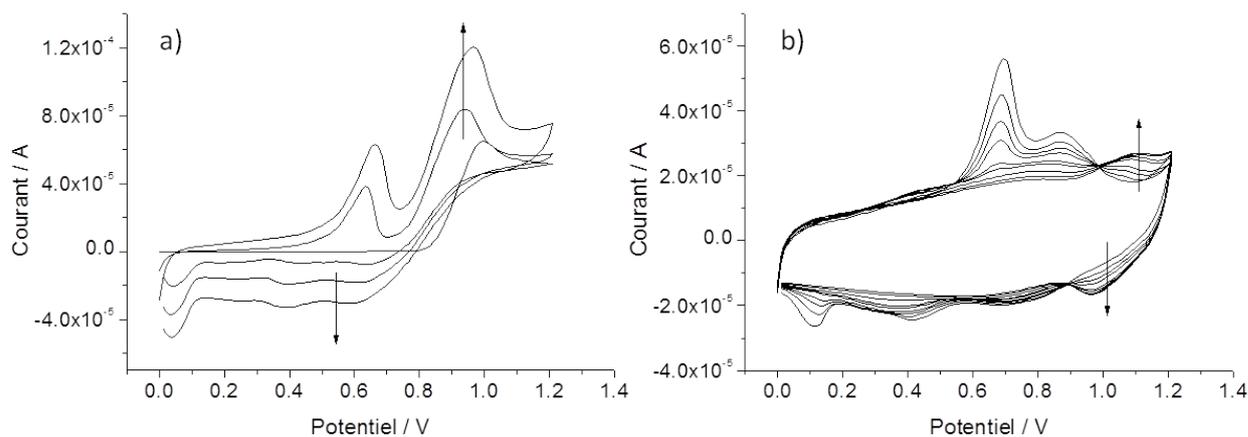


*Figure 3.20 : a), b) et d) voltamétries successives des complexes **1**, **2** et **3** (1 mM) et c) de **2+CPDT** (1 mM) sur réseaux de fibres optiques métallisés (ITO) dans $\text{ACN-nBu}_4\text{NPF}_6$ à $v=100\text{mV/s}$*

Les polymères **1** et **3** peuvent être déposés sans ajout de CPDT (Fig. 3.20a et d). Pour le premier complexe (Fig. 3.20a), on ne voit pas le pic réversible du ruthénium qui se trouve plus loin que le pic du monomère CPDT (1.3 V vs. Ag). Il est important de noter que les valeurs de potentiels observées dans le cas des réseaux de fibres optiques sont légèrement plus élevées que dans le cas des électrodes de platine. Ceci peut s'expliquer par deux raisons : premièrement, l'électrode de référence utilisée est une quasi-référence en fil d'argent, dont le potentiel peut être modifié en fonction de l'environnement ; deuxièmement, le matériau d'électrode est différent. Dans le cas des fibres, l'ITO est un matériau plus résistif que le

platine et une surtension plus importante peut donc être observée. L'augmentation du courant est tout de même observée, au cours des cycles successifs. Dans le cas du complexe **2**, le même comportement que sur l'électrode de platine est observé. La polymérisation ne peut pas être réalisée en absence de CPDT (Fig. 3.20b), du fait de l'encombrement stérique des éthers couronnes. En présence de CPDT (Fig. 3.20c), la polymérisation peut être suivie avec l'augmentation du courant en fonction du nombre de cycles. Entre les voltammogrammes des figures b) et c), on remarque un décalage dans les valeurs de potentiels d'environ 0.2 V. Cet effet peut s'expliquer par une qualité d'ITO différente entre les deux fibres utilisées dans ces expériences. Le dépôt d'ITO réalisé sur la première fibre est probablement de meilleure qualité et sa résistivité sera donc plus faible. Le troisième complexe est également déposé à la surface du réseau avec le pic correspondant à l'oxydation du ruthénium autour de 1.4 V vs. Ag.

Lors de la réalisation de ces travaux, nous avons rencontré des difficultés à reproduire la polymérisation des complexes. L'augmentation du courant avec le nombre de cycle n'était plus observée. Pour pallier à ce problème, nous avons développé une nouvelle stratégie pour déposer ces complexes. Cette stratégie repose sur une polymérisation en deux étapes et permet d'augmenter le ratio polyRu(II)/polyCPDT à la surface de réseau.



*Figure 3.21 : polymérisation par étape : a) voltamétries successives après 3 cycles réalisés dans une solution de CPDT (1 mM) dans ACN- $n\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ sur réseau de fibres optiques métallisés (ITO) et b) après 30 cycles dans une solution du complexe **3** (1 mM) dans ACN- $n\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ sur couche de poly-CPDT*

Les complexes **2** et **3** ont ainsi pu être déposés à la surface des réseaux de fibres. Les résultats sont représentés dans la figure 3.21. Lors de la première étape, une couche « d'accroche » de monomère non fonctionnalisé (CPDT) est déposée. Trois cycles suffisent à déposer une couche de polymère à la surface. La deuxième étape consiste à réaliser une trentaine de cycles dans une solution de complexe **2** ou **3**. L'augmentation du courant est alors observée à la valeur d'oxydation du Ruthénium (*cf.* Fig. 3.21b).

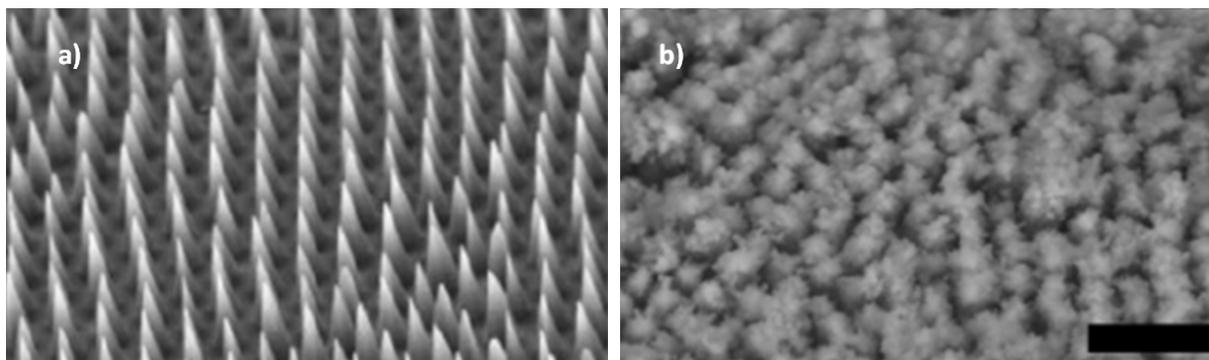
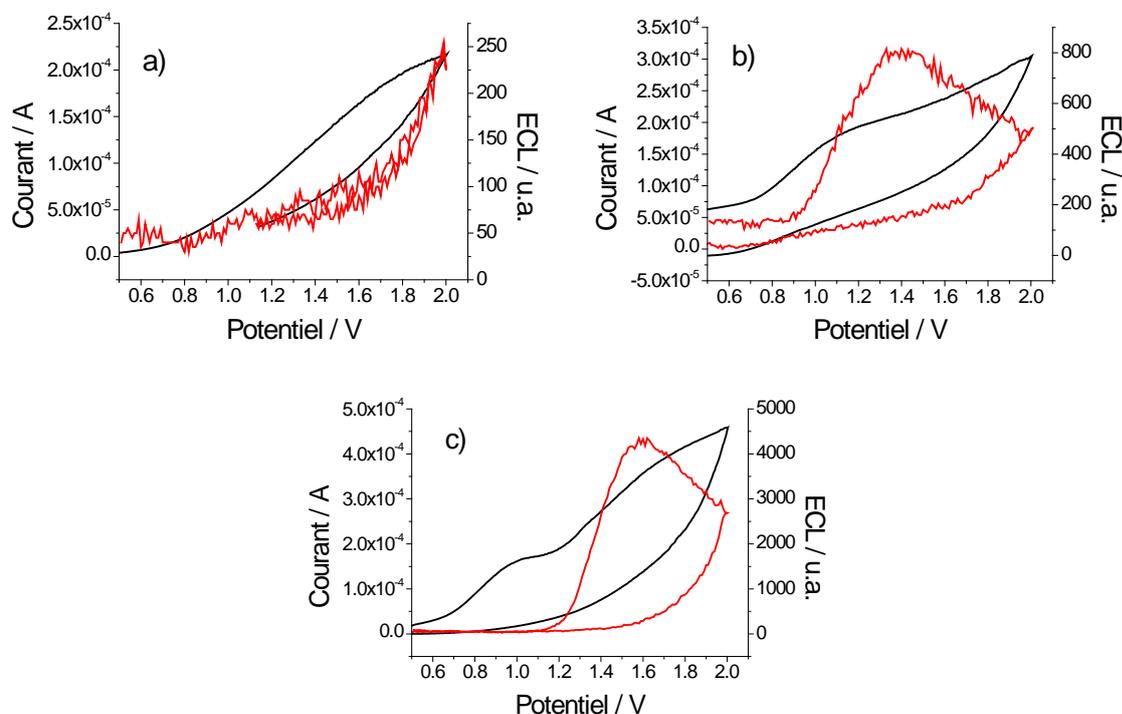


Figure 3.22: Images MEB du réseau avant (a) et après (b) polymérisation (barre noire = 10 μm)

Le film déposé est caractérisé par microscopie électronique à balayage (*cf.* Fig. 3.22). Une couche de polymère est alors observée autour des pointes du réseau de fibres optiques. L'épaisseur du film est de l'ordre du micromètre ce qui indique que plusieurs couches de polymère sont déposées à la surface de l'ITO. L'espace entre les points observés sur l'image 3.22 suggère que le polymère se dépose sous forme de points micrométriques, correspondants à chaque pointe du réseau. Ce résultat confirme que le choix de l'électropolymérisation est compatible avec l'utilisation de surfaces microstructurées comme les réseaux de nanopointes puisque le polymère est déposé uniformément sur toute la surface du capteur. De plus, cette structure est intéressante pour les propriétés de perméabilité du film. L'utilisation du réseau de nanopointes permet donc à la fois d'augmenter la surface active de l'électrode, mais également de donner au polymère déposé les propriétés adaptées à l'utilisation du film pour la détection de cations.

III. Génération de l'ECL sur le réseau et détection de Hg^{2+}

La génération de l'ECL à partir des polymères des complexes **1**, **2** et **3** en présence de TPrA à la surface du réseau a été étudiée. Les résultats sont représentés sur la figure 3.23.



*Figure 3.23 : a), b) et c) ECL des complexes **1**, **2** et **3** électropolymérisés sur réseaux de fibres optiques dans 50mM TPrA dans $\text{ACN-nBu}_4\text{PF}_6$ (50mV/s) : courbe noire : courant et courbe rouge : ECL mesuré simultanément par le tube photomultiplicateur*

Sur cette figure, le courant est représenté en noir et le signal ECL est représenté en rouge. Lors de l'application du potentiel anodique, l'oxydation de la TPrA en large excès par rapport à la quantité de complexe déposé à la surface est caractérisée par l'apparition d'une vague d'oxydation irréversible. Le signal ECL est généré simultanément. La position du maximum du signal ECL est en accord avec l'ordre des valeurs de potentiels d'oxydation des complexes de Ruthénium des trois complexes. Le maximum observé dans le cas du complexe **2** est plus bas que les autres complexes, à cause de la présence des quatre éthers couronnes. Dans le cas du complexe **3**, le maximum du signal ECL est observé à une valeur intermédiaire.

Le polymère choisi pour la suite de l'étude est le polymère **2** car il possède plus d'éthers couronnes et une meilleure sensibilité peut donc être envisagée. Une fois le dépôt de polymère

réalisé à la surface du réseau, la génération d'ECL a ensuite été testée dans deux configurations différentes (*cf.* section expérimentale). La première configuration permet l'étude du polymère directement en face de la surface du réseau de fibres. La deuxième configuration correspond à l'étude du signal à l'autre extrémité et permet donc d'étudier la capacité du réseau de fibres à conduire le signal par réflexion totale interne et d'enregistrer le signal à distance, *via* la fibre.

L'enregistrement du signal ECL dans les deux configurations est représenté dans la figure 3.24. Lors de l'ajout de mercure (Hg^{2+}) dans la solution, une augmentation nette du signal ECL est observée. Au travers du réseau de fibres (Fig. 3.24b), le signal collecté à distance est plus faible d'un facteur 2.8 que celui collecté en face (Fig. 3.24a). Cet effet est principalement dû au cône d'acceptance de la fibre optique qui va pouvoir transmettre seulement une partie des rayons produits à la surface de la fibre. Cependant, une nette augmentation du signal peut toujours être observée en présence de mercure.

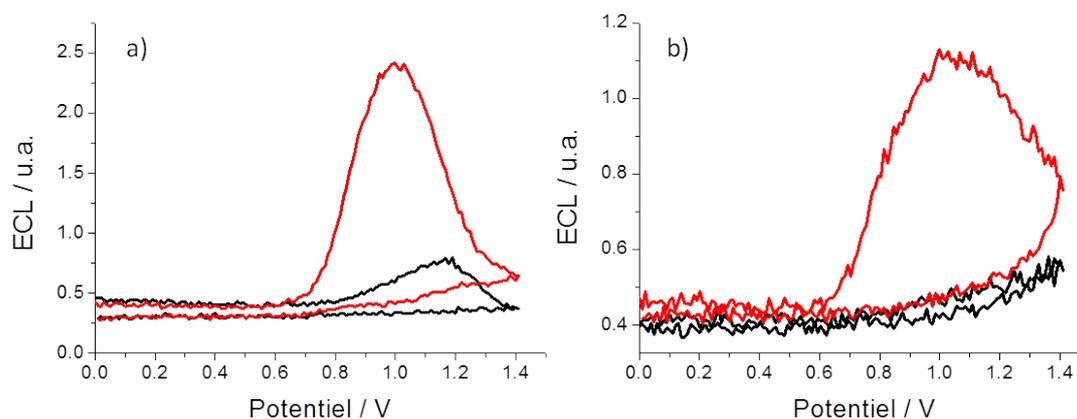


Figure 3.24 : ECL du copolymère du complexe $2+\text{CPDT}$ électropolymérisé à la surface du réseau de fibres optiques en absence (courbe noire) et en présence de Hg^{2+} ($500\mu\text{M}$) et 50mM TPrA dans $\text{ACN}-n\text{Bu}_4\text{NPF}_6/\text{PBS}$ 95/5 (50mV/s) enregistré avec le tube photomultiplicateur a) en face et b) au travers du réseau

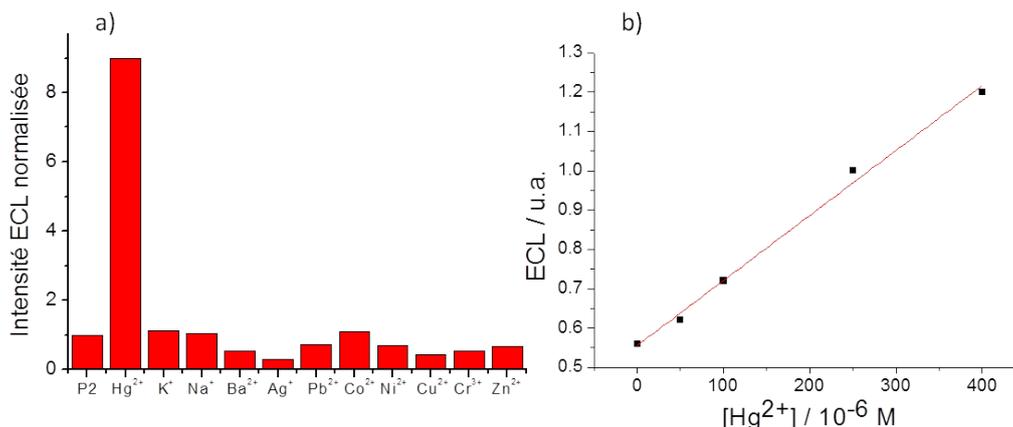


Figure 3.25 : (a) Intensité ECL normalisée du copolymère du complexe 2+CPDT électropolymérisé à la surface du réseau métallisé (ITO) en présence de différents cations métalliques ($500\mu\text{M}$) dans 50mM TPRA dans $\text{ACN}-n\text{Bu}_4\text{NPF}_6/\text{PBS } 95/5$ et (b) relation linéaire entre la concentration en Hg^{2+} et l'intensité ECL enregistré au travers du réseau de fibres optiques

La figure 3.25 permet d'illustrer la bonne sélectivité du capteur. L'intensité ECL normalisée du complexe sur le réseau est comparée en présence des différents cations métalliques testés. Une augmentation, par un facteur 9, est observée dans le cas du cation Hg^{2+} , mais aucun effet n'est mesuré dans le cas des autres cations (K^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+}). De plus, une relation linéaire entre les concentrations de $50\ \mu\text{M}$ et $500\ \mu\text{M}$ en mercure Hg^{2+} et l'intensité du signal est mesurée (Fig. 3.25). Ces deux résultats démontrent que l'utilisation de ce capteur peut être envisagée pour détecter le mercure Hg^{2+} de façon quantitative, dans un milieu complexe.

L'électropolymérisation des complexes de Ruthénium(II) à la surface du réseau de fibres optiques métallisé par une fine couche d'ITO a pu être réalisée en employant deux méthodes différentes (la copolymérisation et la polymérisation en deux étapes). L'immobilisation des complexes à la surface du réseau a pu être caractérisée par microscopie électronique à balayage et par ECL.

Les complexes électropolymérisés présentent les mêmes propriétés de complexation que le composé en solution démontrant la bonne perméabilité et stabilité du film obtenu. L'absorbance du film polymérique est décalée du domaine visible vers le proche infra-rouge, lors de l'application du potentiel anodique, nécessaire à la génération du signal ECL, ce qui permet de collecter le signal généré à l'autre extrémité du réseau de fibres optiques.

IV. Etude préliminaire pour la conception d'un capteur multianalyte

IV.1. Polymère présentant des groupements photolabiles

Dans de nombreux domaines, tel que l'environnement ou le domaine médical, la possibilité de détecter plusieurs espèces simultanément est essentielle. Le développement d'outils pour l'analyse multiplexée représente donc un challenge important dans le monde analytique. Nous avons déjà présenté dans le premier chapitre (IV.3.) différentes stratégies pour fonctionnaliser le réseau de fibres avec différentes sondes. Par exemple, l'utilisation de billes modifiées par l'équipe de D. Walt,³⁴ ou encore l'utilisation d'une bioplume (microlevier électrochimique).³⁵

Dans cette partie du chapitre, nous présentons une nouvelle approche qui repose sur l'utilisation du groupe photolabile déjà introduit dans le chapitre 2.

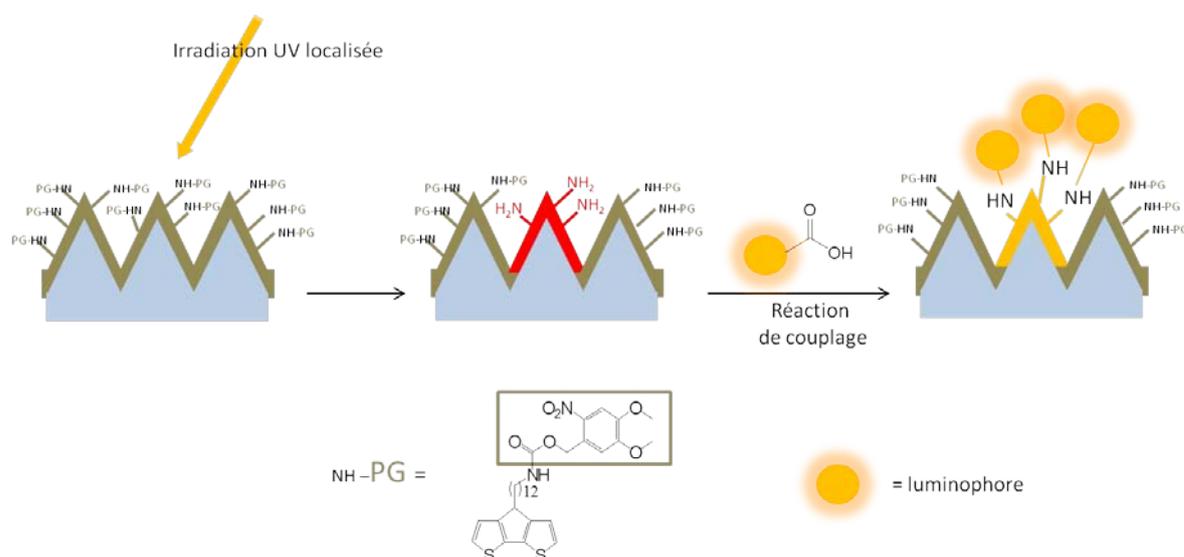


Figure 3.26 : schéma explicatif de la fonctionnalisation localisée

La figure 3.26 représente un schéma explicatif de cette nouvelle approche. Le groupe photolabile (NVOC- nitrovératryloxy-carbonyl) est, cette fois-ci, rattaché au monomère CPDT électropolymérisable. La surface peut donc être totalement fonctionnalisée avec un polymère présentant des fonctions photolabiles. L'irradiation localisée avec un laser UV permet de déprotéger localement le polymère et de libérer la fonction amine primaire. Cette fonction amine est donc créée localement, uniquement à l'endroit de l'irradiation par le laser. Une réaction de couplage est ensuite réalisée entre un luminophore présentant un groupement

acide carboxylique et la fonction amine à la surface. En répétant ces deux étapes (photodéprotection localisée du groupe NVOC et post-fonctionnalisation avec le luminophore), on peut fonctionnaliser notre réseau de façon contrôlée avec différentes sondes.

L'originalité de ce projet est de pouvoir immobiliser toute sonde présentant une fonction acide carboxylique à la surface de notre réseau de fibres.

La première étape consiste à électropolymériser le monomère CPDT-NVOC à la surface du réseau métallisé. Les voltamétries cycliques successives réalisées sont similaires à celles présentées précédemment. On observe le pic d'oxydation irréversible du monomère autour de 1.2 V vs. Ag et les pics correspondant au polymère entre 0.4 V et 0.8 V vs. Ag (Fig. 3.27). Les voltamétries représentées dans la figure 3.27 présentent l'électropolymérisation à la surface de deux plaques de verre recouvertes d'ITO différentes.

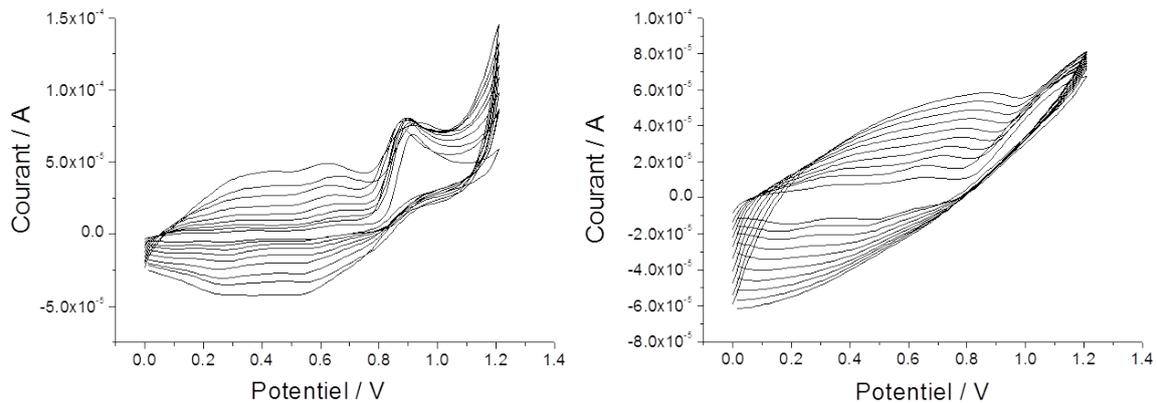


Figure 3.27 : électropolymérisation du CPDT-NVOC (1 mM) par voltamétries successives sur plaques de verre métallisés (ITO) dans $\text{ACN-nBu}_4\text{NPF}_6$ à $v=100\text{mV/s}$ (gauche $R = 100 \Omega/\text{cm}$ droite $R = 1 \text{ k}\Omega/\text{cm}$)

Le dépôt d'ITO, dans le cas de la deuxième plaque, est de moins bonne qualité, puisque l'on observe un étalement des pics d'oxydation caractéristique d'un milieu plus résistif (cf. partie II.3). On constate, cependant, que le courant augmente avec le nombre de cycles ce qui nous confirme que le dépôt peut tout de même être formé à la surface du réseau.

IV.2. Photodéprotection et fonctionnalisation globale de la plaque d'ITO

Avant de procéder à la photo-déprotection localisée avec le laser, nous avons testé la photodéprotection du polymère avec une lampe UV (comme dans le cas du chapitre 2) sur plaque d'ITO. Le polymère déposé sur la plaque est alors déprotégé de façon globale, sur toute la surface de l'échantillon. Le suivi de la photodéprotection peut être réalisé par spectroscopie UV-visible (Fig. 3.28).

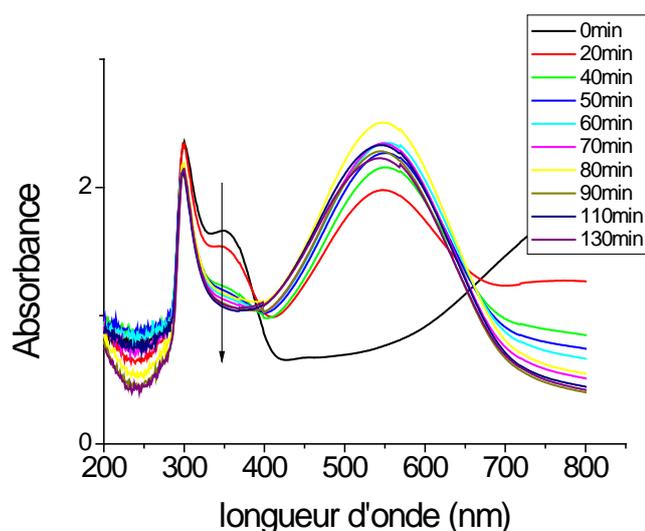
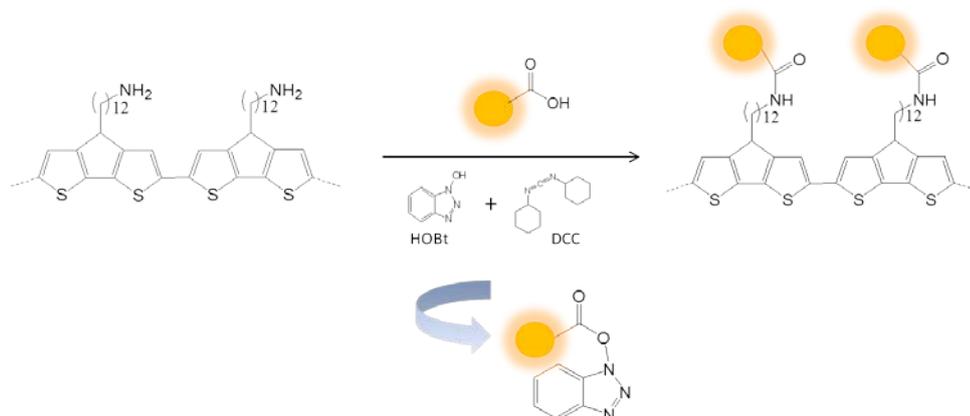


Figure 3.28 : spectre d'absorbance du polymère CPDT-NVOC sur plaque d'ITO à différents temps d'exposition à la lampe UV dans le méthanol

Le spectre présente trois bandes d'absorbance : la première à 300 nm correspond à l'absorbance du thiophène sous sa forme monomérique ; la bande à 550 nm correspond à l'absorbance du poly-thiophène et la bande à 350 nm au groupe photolabile (NVOC). La diminution de l'intensité de l'absorbance de cette bande avec l'exposition sous la lampe UV permet de suivre la photodéprotection du polymère et donc la libération de la fonction amine. Après un temps d'exposition de deux heures, le polymère est complètement photodéprotégé.

Après avoir totalement déprotégé le polymère, la refonctionnalisation est réalisée par une réaction de couplage communément utilisée en chimie de synthèse utilisant le DCC (dicyclohexylcarbodiimide) et le HOBt (hydroxybenzotriazole). Cette stratégie permet de former un groupe partant très réactif sur l'acide carboxylique qui permet de lier de façon covalente la sonde à la fonction amine, en formant une liaison amide, selon la réaction représentée ci-dessous :



Afin de tester cette stratégie, la refunctionalisation du polymère sur la plaque a été entreprise avec deux sondes différentes : le ferrocène (Fig. 3.29) et un complexe d'Iridium (Fig. 3.30).

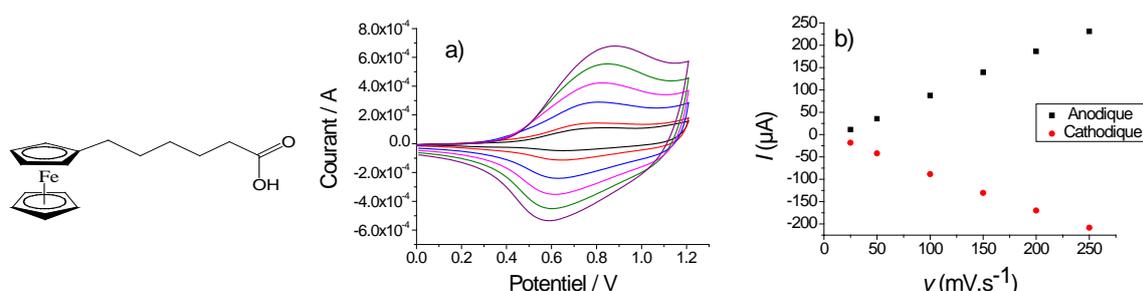


Figure 3.29 : a) voltamétrie cyclique de la plaque d'ITO refunctionalisée avec le Ferrocène à différentes vitesses de balayages (de 25 mV/s à 250 mV/s, taux de recouvrement $\Gamma = 5 \times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$) et b) relation $I=f(v)$

Afin de caractériser la fonctionnalisation du film polymère, la voltamétrie cyclique de la plaque modifiée est réalisée dans une solution contenant uniquement un électrolyte support. La voltamétrie cyclique (Fig. 3.29a) présente un pic correspondant à l'oxydation du ferrocène à environ 0.7 V vs. Ag/AgCl. La différence de potentiel ΔE entre le potentiel du pic aller et du pic retour est proche de 0, ce qui confirme que la molécule est bien adsorbée à la surface.

L'équation ci-dessous exprime la valeur de courant de pic pour les systèmes adsorbés³⁶ :

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma$$

où i_p est le courant de pic d'oxydation ou de réduction de l'espèce électroactive, n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, R la constante des gaz parfait, T la

température, v la vitesse de balayage, A la surface de l'électrode et Γ le taux de recouvrement de la surface. Afin de vérifier qu'il s'agit bien d'un système adsorbé, la voltamétrie est donc tracée à différentes vitesses de balayage pour vérifier que l'on obtient bien une relation linéaire entre l'intensité du courant de pic et la vitesse de balayage.

Les droites $i_p = f(v)$ (Fig. 3.29b) sont tracées et confirment bien que le ferrocène est lié au polymère.

La stratégie employée permet donc d'immobiliser le ferrocène à la surface de notre électrode et ce système se comporte alors de la même façon qu'un système adsorbé.

Afin de vérifier l'adaptabilité de cette stratégie. Nous l'avons étendue à l'étude d'un luminophore ECL. L'immobilisation d'un complexe d'Iridium a ainsi été réalisée et caractérisée par ECL en présence de tripropylamine.

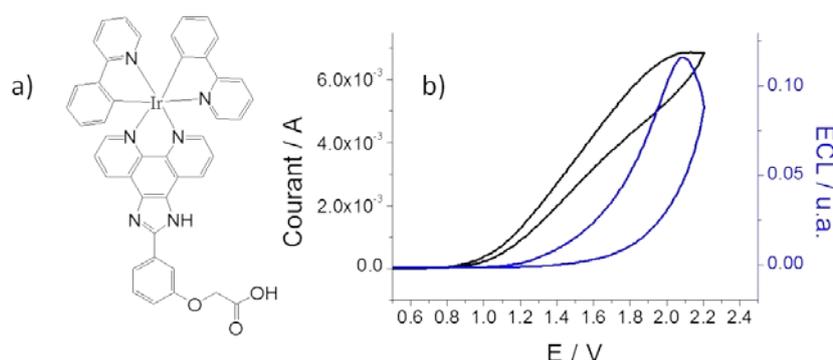


Figure 3.30 : voltamétrie cyclique (ligne noire) et ECL enregistrée avec le photomultiplicateur (ligne bleue) de la plaque d'ITO refunctionalisée avec le complexe d'Iridium dans TPrA (100 mM) dans $\text{ACN-nBu}_4\text{NPF}_6$

Le signal ECL est émis lors de l'oxydation de la TPrA et du complexe d'Iridium. Le potentiel d'oxydation de l'Iridium (1.8 V vs. Ag) est plus élevé que celui du Ruthénium (1.2 V vs. Ag). Le signal ECL est donc généré à un potentiel supérieur dans le cas de l'Iridium (1.8 V vs. Ag). La possibilité d'enregistrer le signal ECL sur la plaque modifiée confirme l'immobilisation du complexe sur le polymère. Ces résultats permettent de valider la stratégie en plusieurs étapes (photodéprotection puis refunctionalisation par réaction de couplage) développée et son utilisation avec les sondes ECL.

IV.3. Photodéprotection et fonctionnalisation localisée

Afin de réaliser ce capteur multianalyte, la photodéprotection locale a ensuite été testée. La longueur d'onde du laser disponible sur notre microscope est de 405 nm. Cette valeur est assez éloignée du maximum de l'absorption du groupement NVOC (*cf.* Figure 3.28) mais la photodéprotection à tout de même été envisagée.

Les différents points réalisés (Fig. 3.31) correspondent à différentes puissances du laser et à différents temps d'exposition (30 sec à 15 min). Après irradiation, une tâche est observée à l'endroit de l'impact du laser et correspond à la photodéprotection du polymère. Le poly-CPDT absorbe dans le domaine spectral du laser et l'irradiation, même pour quelques millisecondes, va conduire à la destruction du polymère ce qui créé un trou dans le film.

L'image de gauche correspond à l'image en lumière blanche de la plaque après exposition au laser et celle de droite à la même plaque observée en fluorescence. Les points verts sur cette image se trouvent à l'endroit de l'impact du laser et nous indique que le polymère devient fluorescent après irradiation.

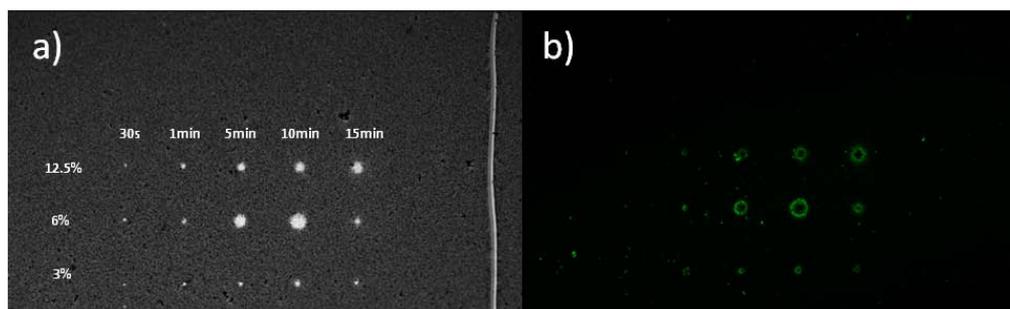


Figure 3.31 : photodéprotection localisée avec le laser confocal ($\lambda = 405 \text{ nm}$) à différentes puissances (de haut en bas 3%, 6% et 12.5 %) et pendant différents temps d'exposition (de gauche à droite 30sec, 1min, 5min, 10min, 15min) a) en lumière blanche et b) en épifluorescence ($\lambda_{exc} = 458 \text{ nm}$)

La destruction du polymère avec le laser de cette longueur d'onde nous indique que la stratégie envisagée ne peut aboutir avec le laser dont nous disposons.

Comme expérience contrôle, la déprotection localisée sur plaque de verre modifiée avec le silane photolabile du chapitre 2 a également été réalisée. Après la photodéprotection avec le laser à 405 nm et la refonctionnalisation par réaction de couplage avec un fluorophore, aucun signal luminescent n'est observé sur la plaque. La photodéprotection du groupement NVOC ne peut donc pas être réalisée avec le laser de 405 nm dont nous disposons et nécessite probablement l'utilisation d'un laser de plus haute énergie (350 nm).

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une nouvelle méthode pour fonctionnaliser notre réseau de fibres optiques. La déposition de polymères conducteurs sur le réseau métallisé avec une fine couche d'ITO a été réalisée par électropolymérisation. Cette méthode permet de fonctionnaliser le réseau microstructuré de façon uniforme et contrôlée. Le polymère obtenu présente des propriétés importantes pour la réalisation de capteur sur fibre optique. En effet, nous avons démontré que l'absorbance du polymère peut être diminuée par l'application d'un potentiel anodique, ce qui décale l'absorbance du poly-CPDT dans le domaine du proche infra-rouge et n'interfère donc plus avec le signal ECL émis. En d'autres termes, la transparence du film permet alors de collecter le signal émis au travers du réseau et donc de réaliser la détection à distance.

La sonde immobilisée dans ce projet est un complexe de Ruthénium fonctionnalisé avec des groupements éthers couronnes. Les éthers couronnes interagissent sélectivement avec certains cations et la conception de cette sonde a été étudiée pour détecter le cation Hg^{2+} par ECL. La sonde immobilisée sur le réseau présente les mêmes propriétés que la sonde en solution. La détection à distance du mercure a donc pu être réalisée au travers du réseau de façon quantitative et sélective. L'originalité de ce capteur réside dans la triple action du potentiel anodique appliqué lors de la détection : d'une part, il permet de générer le signal ECL, mais, également de modifier les propriétés optiques et électrochimiques du film polymère. Ce projet démontre que l'utilisation de polymères conducteurs à base de CPDT est compatible avec la réalisation de capteurs ECL sur réseaux de fibres optiques.

De plus, dans ce chapitre, nous avons présenté une nouvelle stratégie pour la réalisation de capteurs multianalytes. La photodéprotection localisée d'un polymère et la refonctionnalisation avec différentes sondes par réaction de couplage a été envisagée. Nous avons démontré que le procédé permettait d'immobiliser une sonde électrochimique et un luminophore ECL de façon globale sur tout le réseau de fibre optique. Cependant, le projet de fonctionnalisation localisée n'a pas pu aboutir, en raison de la longueur d'onde du laser disponible dans notre laboratoire. Les résultats préliminaires sont tout de même encourageants pour la réalisation de ce type de capteur.

1. Li, M.-J.; Chu, B. W.-K.; Yam, V. W.-W., Synthesis, Characterization, Spectroscopic, and Electrochemiluminescence Properties of a Solvatochromic Azacrown-Containing Cyanoruthenate(II): Potential Applications in Separation and Indirect Photometric Detection of Cations and Amino Acids in HPLC. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (13), 3528-3537.
2. Pedersen, C. J., Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89* (26), 7017-7036.
3. Izatt, R. M.; Eatough, D. J.; Christensen, J. J., Thermodynamics of cation-macrocyclic compound interaction. In *Alkali Metal Complexes with Organic Ligands*, Springer Berlin Heidelberg: 1973; Vol. 16, pp 161-189.
4. Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J.; Sen, D., Thermodynamic and kinetic data for cation-macrocyclic interaction. *Chemical Reviews* **1985**, *85* (4), 271-339.
5. Javanbakht, M.; Ganjali, M. R.; Eshghi, H.; Sharghi, H.; Shamsipur, M., Mercury(II) Ion-Selective Electrode Based on Dibenzo-diazathia-18-crown-6-dione. *Electroanalysis* **1999**, *11* (2), 81-84.
6. Cheraghi, S.; Taher, M.; Fazelirad, H., Voltammetric sensing of thallium at a carbon paste electrode modified with a crown ether. *Microchim Acta* **2013**, 1-7.
7. Faridbod, F.; Ganjali, M.; Dinarvand, R.; Norouzi, P.; Riahi, S., Schiff's Bases and Crown Ethers as Supramolecular Sensing Materials in the Construction of Potentiometric Membrane Sensors. *Sensors* **2008**, *8* (3), 1645-1703.
8. Campagna, S.; Puntoriero, F.; Nastasi, F.; Bergamini, G.; Balzani, V., Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium. In *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I*, Balzani, V.; Campagna, S., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2007; Vol. 280, pp 117-214.
9. Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; von Zelewsky, A., Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence. *Coordination Chemistry Reviews* **1988**, 85-277.
10. Boricha, V. P.; Patra, S.; Chouhan, Y. S.; Sanavada, P.; Suresh, E.; Paul, P., Synthesis, Characterisation, Electrochemistry and Ion-Binding Studies of Ruthenium(II) and Rhenium(I) Bipyridine/Crown Ether Receptor Molecules. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2009**, *2009* (9), 1256-1267.
11. Li, M.-J.; Chu, B. W.-K.; Zhu, N.; Yam, V. W.-W., Synthesis, Structure, Photophysics, Electrochemistry, and Ion-Binding Studies of Ruthenium(II) 1,10-Phenanthroline Complexes Containing Thia-, Seleno-, and Aza-Crown Pendants. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46* (3), 720-733.
12. Berni, E.; Gosse, I.; Badocco, D.; Pastore, P.; Sojic, N.; Pinet, S., Differential Photoluminescent and Electrochemiluminescent Detection of Anions with a Modified Ruthenium(II)-Bipyridyl Complex. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15* (20), 5145-5152.
13. McFarland, S. A.; Finney, N. S., Modulating the efficiency of Ru(ii) luminescence via ion binding-induced conformational restriction of bipyridyl ligands. *Chemical Communications* **2003**, *0* (3), 388-389.
14. Beer, P. D.; Gale, P. A.; Chen, G. Z., Mechanisms of electrochemical recognition of cations, anions and neutral guest species by redox-active receptor molecules. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, *185-186* (0), 3-36.

15. Moutet, J.-C.; Electrochemical recognition of alkali metal cations by electrodes modified with poly[tris-(2,2-bipyridine) ruthenium(II)] films. *Electrochimica Acta* **1998**, *43* (16 - 17), 2257-2262.
16. Schmittl, M.; Lin, H., Electropolymerisable ruthenium(II) phenanthrolines carrying azacrown ether receptors: metal ion recognition in thin film redox sensors. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18* (3), 333.
17. Jiang, X.; Yang, X.; Zhao, C.; Sun, L., Electrogenerated chemiluminescence of benzo 15-crown-5 derivatives. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2009**, *22* (1), 1-8.
18. Muegge, B. D.; Richter, M. M., Electrochemiluminescent Detection of Metal Cations Using a Ruthenium(II) Bipyridyl Complex Containing a Crown Ether Moiety. *Analytical Chemistry* **2001**, *74* (3), 547-550.
19. Lai, R. Y.; Chiba, M.; Kitamura, N.; Bard, A. J., Electrogenerated Chemiluminescence. 68. Detection of Sodium Ion with a Ruthenium(II) Complex with Crown Ether Moiety at the 3,3'-Positions on the 2,2'-Bipyridine Ligand. *Analytical Chemistry* **2001**, *74* (3), 551-553.
20. Li, M.-J.; Chen, Z.; Zhu, N.; Yam, V. W.-W.; Zu, Y., Electrochemiluminescence of Ruthenium(II) Complexes Functionalized with Crown Ether Pendants and Effects of Cation Binding. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47* (3), 1218-1223.
21. Bruce, D.; Richter, M. M., Electrochemiluminescence in aqueous solution of a ruthenium(II) bipyridyl complex containing a crown ether moiety in the presence of metal ions. *Analyst* **2002**, *127* (11), 1492-1494.
22. Lin, H.; Cinar, M. E.; Schmittl, M., Comparison of ruthenium(II) and cyclometalated iridium(III) azacrown ether phenanthroline hybrids for the detection of metal cations by electrochemiluminescence. *Dalton Transactions* **2010**, *39* (21), 5130-5138.
23. Magri, D. C.; Brown, G. J.; McClean, G. D.; de Silva, A. P., Communicating Chemical Congregation: A Molecular AND Logic Gate with Three Chemical Inputs as a "Lab-on-a-Molecule" Prototype. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (15), 4950-4951.
24. Schmittl, M.; Lin, H.-W., Quadruple-Channel Sensing: A Molecular Sensor with a Single Type of Receptor Site for Selective and Quantitative Multi-Ion Analysis. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (6), 893-896.
25. Rawle, S. C.; Moore, P.; Alcock, N. W., Quenching of fluorescence from [Ru(bipy)₂(L₁)]²⁺ by coordination of Ni or Cu in the cyclam cavity (bipy = 2,2'-bipyridine; cyclam = 1,4,8,11-tetra-azacyclotetradecane). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, (9), 684-687.
26. Abruna, H. D.; Denisevich, P.; Umana, M.; Meyer, T. J.; Murray, R. W., Rectifying interfaces using two-layer films of electrochemically polymerized vinylpyridine and vinylbipyridine complexes of ruthenium and iron on electrodes. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (1), 1-5.
27. Beer, P. D.; Kocian, O.; Mortimer, R. J.; Ridgway, C., Surface modification with macrocycle-containing redox-active polymers: towards the design of novel spectroelectrochemical group IA/IIA metal cation sensors. *Analyst* **1992**, *117* (8), 1247-1249.
28. Haddour, N.; Cosnier, S.; Gondran, C., Electrogeneration of a biotinylated poly(pyrrole-ruthenium(II)) film for the construction of photoelectrochemical immunosensor. *Chemical Communications* **2004**, (21), 2472-2473.
29. Cosnier, S.; Deronzier, A.; Roland, J. F., Polypyridinyl complexes of ruthenium(II) having 4,4'-dicarboxy ester-2,2'-bipyridine ligands attached covalently to polypyrrole films: Reinvestigation of the polypyrrole electrochemical response in poly[tris(N-

- bipyridylethylpyrrole] ruthenium(II) films. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1990**, 285 (1–2), 133-147.
30. Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cosnier, S., Characterization of multi-walled carbon nanotube electrodes functionalized by electropolymerized tris(pyrrole-ether bipyridine) ruthenium (II). *Electrochimica Acta* **2011**, 56 (10), 3633-3640.
31. Argun, A. A.; Aubert, P.-H.; Thompson, B. C.; Schwendeman, I.; Gaupp, C. L.; Hwang, J.; Pinto, N. J.; Tanner, D. B.; MacDiarmid, A. G.; Reynolds, J. R., Multicolored Electrochromism in Polymers: Structures and Devices. *Chemistry of Materials* **2004**, 16 (23), 4401-4412.
32. Turbiez, M.; Frere, P.; Leriche, P.; Mercier, N.; Roncali, J., Poly(3,6-dimethoxythieno[3,2-b]thiophene): a possible alternative to poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT). *Chemical Communications* **2005**, (9), 1161-1163.
33. Cho Ko, H.; Yom, J.; Moon, B.; Lee, H., Electrochemistry and electrochromism of a poly(cyclopentadithiophene) derivative with a viologen pendant. *Electrochimica Acta* **2003**, 48 (28), 4127-4135.
34. Ferguson, J. A.; Steemers, F. J.; Walt, D. R., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5618.
35. Descamps, E.; Duroure, N.; Deiss, F.; Leichle, T.; Adam, C.; Mailley, P.; Ait-Ikhlef, A.; Livache, T.; Nicu, L.; Sojic, N., Functionalization of optical nanotip arrays with an electrochemical microcantilever for multiplexed DNA detection. *Lab on a Chip* **2013**.
36. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*. **2001**.

Chapitre 4 : Approche basée sur l'étude des forces de cisaillement pour la conception d'un réseau de nanoélectrodes collectives

I.	Microélectrodes, réseau de nanoélectrodes et SECM.....	130
I.1.	Microélectrodes	130
I.1.1.	Historique et terminologie.....	130
I.1.2.	Propriétés des microélectrodes	131
I.2.	Microscopie électrochimique (SECM)	132
I.3.	Positionnement basé sur l'étude des forces de cisaillement (Shearforce)	134
I.4.	Réseaux de micro-électrodes et de nano-électrodes	136
II.	Conception du réseau de nanoélectrodes	140
II.1.	Stratégie employée	140
II.2.	Positionnement du réseau dans la matrice de PDMS	143
II.3.	Dépôt de la peinture électrophorétique.....	146

En complément des méthodes d'analyse électrochimiques traditionnelles, qui nous renseignent sur le comportement global d'espèces en solution, le développement de microscopies à sondes locales (*scanning probe techniques*) a permis de fournir des informations plus précises sur la structure d'un échantillon et celle de la sonde utilisée. Ces méthodes permettent d'analyser la topographie d'un substrat en balayant la surface de l'échantillon avec une sonde spécifique. Par exemple, la microscopie à effet tunnel (STM - *Scanning Tunneling Microscopy*) permet d'analyser la surface d'un échantillon en mesurant le courant passant entre la sonde et l'échantillon par effet tunnel, c'est-à-dire sans contact physique entre les deux entités. Contrairement à la STM, l'AFM (*Atomic Force Microscopy* – Microscopie à Force Atomique) présente l'avantage de pouvoir analyser des substrats non-conducteurs et repose sur la mesure des mouvements d'une pointe qui est balayée à la surface d'un échantillon. La sonde utilisée dans le cas de la microscopie électrochimique (SECM – *Scanning electrochemical microscopy*) est une électrode de taille micrométrique. Celle-ci est balayée à proximité du substrat et les mesures électrochimiques permettent alors de renseigner à la fois sur la topologie et la nature du substrat ainsi que de donner des informations sur la sonde elle-même. La SECM est également employée pour structurer des surfaces car elle permet de réaliser une réaction électrochimique localement et ainsi de fonctionnaliser une surface avec une résolution micrométrique sans utiliser de moule ou de masque. De nombreuses méthodes ont été développées pour modifier une surface avec différents types de dépôts par SECM, par exemple le dépôt de polymères, de métaux ou de sels de diazonium ou encore la structuration d'une surface par dissolution chimique, etc...¹ Ces méthodes sont très adaptables car elles peuvent être employées pour modifier des surfaces conductrices ou non avec une excellente précision. Une limitation reste que chaque motif doit être formé individuellement. La possibilité de structurer une surface de façon parallélisée en utilisant un réseau d'électrodes présente donc un intérêt important.¹⁻²

Le projet présenté dans ce chapitre a été réalisé en collaboration avec M. Etienne du laboratoire LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et de Microbiologie pour l'Environnement) de l'Université de Lorraine. Dans ce projet, nous proposons une nouvelle méthode pour préparer une sonde SECM structurée présentant un réseau de 6000 électrodes collectives de taille nanométrique. Pour cela, une peinture isolante est déposée à la surface de la partie métallisée du réseau de fibres optiques en évitant le sommet des pointes. Cette nouvelle approche utilise le positionnement par détection des forces de cisaillement. L'étude des forces de cisaillement repose sur les variations de l'intensité des vibrations d'une pointe

lorsqu'elle s'approche d'une surface. Les interactions entre la surface et la sonde vont modifier l'intensité de ces vibrations et permettre de positionner la pointe à distance constante d'une surface avec une précision de l'ordre du micromètre voire de la centaine de nanomètres. En comparaison aux travaux précédemment réalisés dans ce domaine par notre groupe,^{2,3} cette méthode offre un meilleur contrôle sur la taille des électrodes et une meilleure reproductibilité. Dans ce chapitre, après avoir introduit les principes de la SECM et de l'utilisation des microélectrodes, la nouvelle méthodologie employée pour réaliser le réseau de nanoélectrodes collectives ainsi que les résultats obtenus avec ces réseaux sont présentés.

I. Microélectrodes, réseau de nanoélectrodes et SECM

I.1. Microélectrodes

I.1.1. Historique et terminologie

D'après la définition de Laitinen et Kolthoff,⁴ le terme « microélectrode » correspond à la situation où l'électrode possède une taille très faible par rapport au volume de la solution (condition dite de petit rapport A/V , où A est l'aire de l'électrode et V le volume de la cellule). Dans ces conditions, la surface de l'électrode est suffisamment petite comparée au volume pour que le courant passant dans la solution soit assez faible pour ne pas altérer la concentration globale de l'espèce électroactive dans le volume considéré.⁵ Ces dernières décennies, le développement et l'utilisation d'électrodes de très petites tailles (à l'échelle micrométrique voir nanométrique) a été très important. La petite taille de ces électrodes induit des changements de propriétés et du comportement de l'électrode par rapport aux électrodes macroscopiques. Ces électrodes présentent certains avantages comme une chute ohmique (iR) faible, la possibilité d'atteindre un état stationnaire, et un meilleur rapport signal sur bruit.⁶ Ces propriétés particulières résultent de la modification des conditions d'apport de masse à la surface de l'électrode et sont décrites dans ce chapitre (I.1.2). Pour compléter la définition d'une microélectrode, A.J. Bard ajoute le critère disant qu'au moins l'une des dimensions de l'électrode doit être inférieure à la dimension critique de 25 μm (rayon pour une électrode de géométrie disque, largeur pour une électrode de type bande...)⁵

Bien que déjà employées dans différents domaines, notamment en biochimie pour l'étude *in situ* de l'activité d'organismes biologiques,⁶ les premières études en électrochimie utilisant des microélectrodes ont été réalisées dans les années 1980, par R. M. Wightman⁷ et

M. Fleischmann,⁸ lorsque les avancées technologiques permirent les mesures de courant suffisamment faibles.

1.1.2. Propriétés des microélectrodes

Les microélectrodes mesurent de très faibles courants (de l'ordre de 10^{-17} A)⁸ et leur utilisation présente de nombreux avantages. La chute ohmique sur ces électrodes est très faible et leur utilisation limite donc l'erreur sur le potentiel appliqué. Le courant capacitif est fortement diminué ce qui permet d'améliorer le rapport signal sur bruit. La petite taille induit également des flux de matière plus importants ce qui donne la possibilité de détecter un analyte même à faible concentration et de diminuer l'échelle de temps de mesure.

La figure 4.1, représente les différents voltamogrammes pouvant être obtenus avec une microélectrode. Le courant mesuré lors d'une réaction red-ox est proportionnel au flux de l'espèce électroactive à l'interface entre la solution et l'électrode. Lors de l'électrolyse, la concentration à la surface de l'électrode va chuter jusqu'à la consommation complète de l'espèce électroactive et un gradient de concentration se développe sur une distance dont la taille va dépendre du temps de l'électrolyse (couche de diffusion). En fonction de l'échelle de temps de la mesure, la forme du voltamogramme obtenue avec la microélectrode sera différente de celle obtenue sur une électrode de taille conventionnelle. Cet effet dépend de la taille de la couche de diffusion qui peut, à une certaine échelle de temps assez longue, être plus grande que la taille de l'électrode. Bien que la forme du voltamogramme dépende également de la géométrie de la microélectrode, une tendance générale peut être décrite.

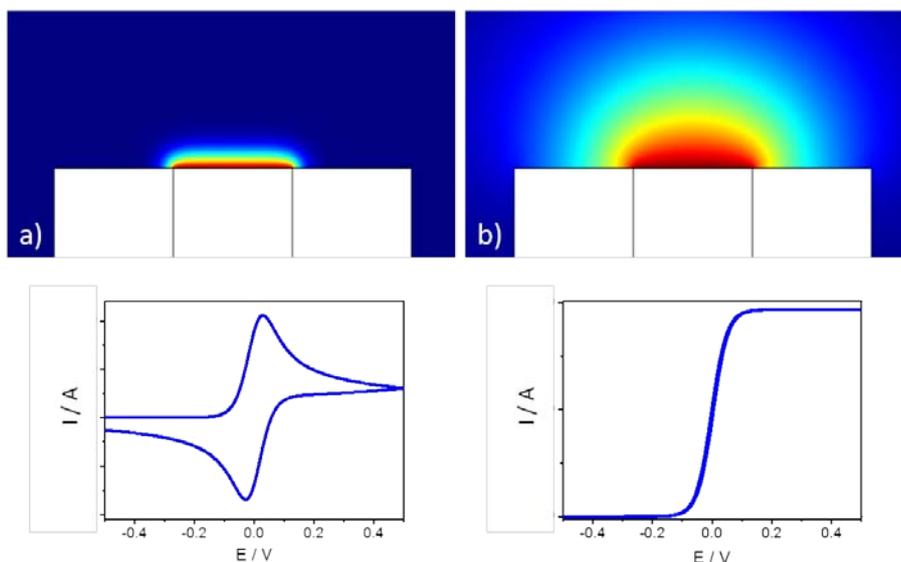


Figure 4.1 : profils de diffusion au voisinage d'une microélectrode et voltamétrie cyclique correspondante a) à courte échelle de temps (10V/s) b) à plus longue échelle de temps (0.1V/s)

La taille de la couche de diffusion (δ) est décrite par l'équation :

$$\delta = \sqrt{\pi D t} \quad (1)$$

où D est le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive et t le temps de l'électrolyse. Lorsque δ est inférieure au rayon de l'électrode, c'est-à-dire que la taille de la couche de diffusion est beaucoup plus petite que celle de l'électrode, l'apport de matière va limiter la valeur du courant. La majorité de la diffusion se fait de façon perpendiculaire à la surface de l'électrode (diffusion planaire) (Fig. 4.1a). Dans ce cas, le voltamogramme est similaire à celui observé dans le cas classique d'une macroélectrode et présente des maxima de courant (I_p) puis une décroissance qui caractérise les systèmes limités par la diffusion. Lorsqu'au contraire δ est supérieur à r , la couche de diffusion est alors plus grande que la taille caractéristique de l'électrode et la diffusion radiale devient également importante. (Fig. 4.1b).⁹ Dans ce cas, la vitesse de l'apport de matière est assez grande et le courant mesuré ne dépend plus du temps. Le voltamogramme présente alors la forme sigmoïdale caractéristique des systèmes stationnaires. La valeur du courant limite dépend de la surface active de l'électrode selon l'équation suivante (pour une géométrie disque) :

$$i_{lim} = 4 n F D C r_0 \quad (2)$$

Où n est le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, D le coefficient de diffusion de l'espèce active, C la concentration dans le volume de la solution et r_0 le rayon de l'électrode dans le cas d'une électrode disque.¹⁰

Les microélectrodes ont été largement étudiées car elles permettent d'atteindre cet état stationnaire rapidement même à courte échelle de temps.

1.2. Microscopie électrochimique (SECM)

Le principe de la SECM repose sur l'utilisation d'une microélectrode qui balaye la surface d'un substrat en solution en présence d'une espèce électroactive. Dans la figure 4.2, les différentes configurations sont représentées pour un système où le potentiel appliqué permet de réaliser la réaction de réduction d'une espèce O selon l'équation : $O + ne^- \rightarrow R$

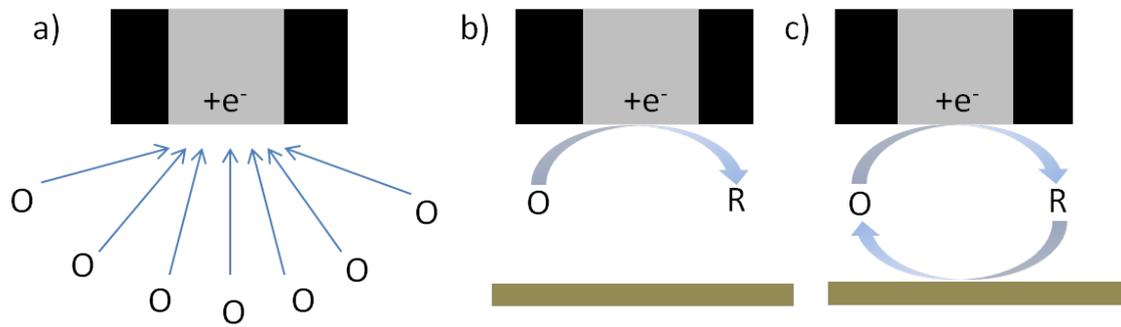


Figure 4.2 : principe de la SECM a) diffusion hémisphérique sur une microélectrode loin du substrat, b) feedback négatif : diffusion bloquée par un substrat isolant, c) feedback positif : espèce électroactive régénérée sur un substrat conducteur⁵

Le courant mesuré sur une microélectrode lorsqu'elle se trouve loin du substrat est constant et ce courant est appelé i_{lim} (cf. équation 2). Dans ce cas, la forme de la couche de diffusion est hémisphérique.¹¹

Lorsque l'électrode est approchée d'un substrat isolant, comme par exemple d'une plaque de verre ou de plastique, le substrat bloque l'apport de matière par diffusion. En conséquence, le courant observé diminue jusqu'à une valeur proche de 0. La variation du courant en fonction de la distance entre l'électrode et le substrat observée dans ce cas est appelée *feedback* négatif.¹¹ Lorsque l'électrode s'approche d'un substrat conducteur, comme d'une électrode d'or ou de platine par exemple, la couche de diffusion est toujours bloquée mais cette fois-ci, l'espèce O est régénérée par le substrat. L'approche d'un substrat conducteur est donc caractérisée par une augmentation du courant et cette variation est appelée *feedback* positif.¹¹

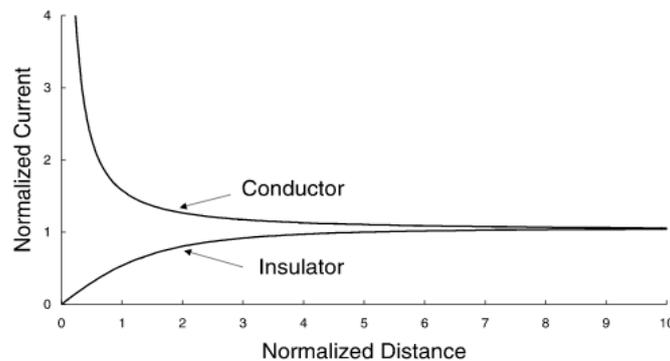


Figure 4.3 : courbes d'approches SECM théoriques en solution sur un substrat conducteur et isolant¹⁰

Ces courbes sont représentées en utilisant les valeurs $I = i / i_{lim}$ (courant normalisé par le courant mesuré à grande distance du substrat) en fonction de la distance $L = d / r$ (distance du substrat normalisée par le rayon de l'électrode) (Fig. 4.3). La représentation de ces courbes à l'aide de valeurs sans dimensions permet de s'affranchir de l'effet de la concentration et du coefficient de diffusion de l'espèce.¹¹ Sur ces courbes, on peut lire facilement la distance d critique où l'effet du substrat commence à être observé, c'est-à-dire la distance à laquelle le courant commence à augmenter dans le cas du *feedback* positif et inversement diminuer dans le cas du *feedback* négatif. Cette distance dépend de la taille de la couche de diffusion et est de l'ordre de grandeur du rayon de l'électrode (r_0) multiplié par 10, mais dépendra également de la taille de la partie isolante autour de l'électrode puisque cette partie bloquera également l'apport de matière par diffusion.

La microscopie électrochimique est une technique récente mais qui subit un essor important depuis son développement grâce aux nombreux avantages qu'offre cette technique puisqu'elle permet de renseigner à la fois sur la nature électrochimique du substrat analysé et sur sa morphologie ainsi que sur celle de la sonde elle-même. Les applications de la microscopie électrochimique sont diverses et touchent de nombreux domaines (biologie, microfabrication, etc...). Elle a été utilisée, par exemple, pour analyser l'activité locale d'électrodes modifiées avec une haute résolution spatiale, pour identifier et caractériser l'interface microscopique de phénomènes produits localement, pour déterminer la cinétique de transferts d'électrons, pour imager l'activité biologique de cellules vivantes ou encore pour modifier des surfaces avec une résolution micrométrique.¹¹⁻¹²

1.3. Positionnement basé sur l'étude des forces de cisaillement (Shearforce)

La SECM permet d'imager la morphologie et les propriétés électrochimiques d'une surface simultanément mais généralement, la déconvolution des effets de ces deux paramètres est impossible. La plupart du temps, la SECM est utilisée en balayant une surface en restant à une distance constante de la surface et se limite à l'étude d'échantillons relativement plats dont la hauteur du relief est de l'ordre de grandeur du rayon de la microélectrode. Il devient donc évident qu'en diminuant la taille de l'électrode, il devient de plus en plus difficile de contrôler la distance entre la sonde et le substrat. Pour cette raison, des méthodes (appelées microscopie électrochimique à distance constante : CD-SECM (*Constant Distance-Scanning ElectroChemical Miscroscopy*))¹³ ont été développées afin de maintenir la pointe de la sonde à

distance constante de la surface. De cette manière, il est possible d'obtenir des informations sur la morphologie et les propriétés électrochimiques du substrat simultanément.

L'une de ces stratégies porte sur l'étude des forces de cisaillement lors de l'approche d'une surface. Lorsque l'électrode approche de la surface l'amplitude de la vibration est altérée. Les phénomènes liés à cette variation font toujours l'objet d'investigation, mais les interactions possibles entre l'électrode et le substrat peuvent être des forces capillaires, des forces de Van der Waals, ou encore un contact mécanique direct.¹³ Lorsque l'étude est faite en solution, il est évident que les forces hydrodynamiques jouent alors un rôle fondamental.

Ces interactions vont dépendre de différents paramètres : la morphologie et les propriétés physiques de la surface, la géométrie et les propriétés physiques de la sonde et la viscosité du milieu.¹³

Chaque sonde va donc interagir différemment avec la surface et un spectre de résonance doit être réalisé pour chaque électrode utilisée. Le spectre de résonance permet de sélectionner la fréquence de résonance du système qui est ensuite choisie pour réaliser les courbes d'approche.

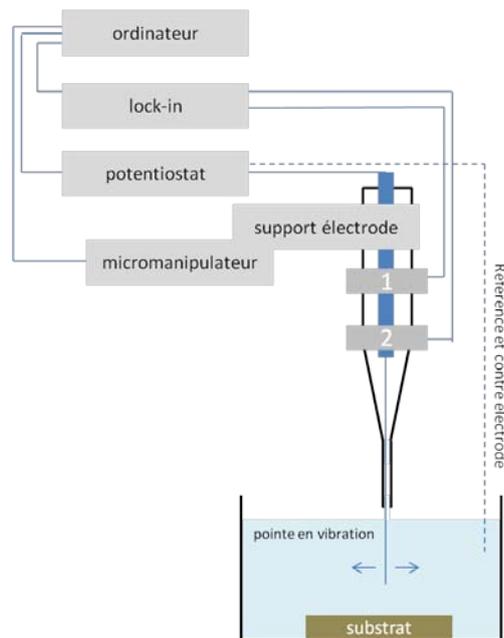


Figure 4.4 : Schéma de principe du système SECM couplé avec l'étude des forces de cisaillement (1 et 2 représentent les plaques piezoélectriques)

Différents moyens peuvent être employés pour mesurer l'amplitude des forces de cisaillement (interaction *Shearforce*). Les premières méthodes développées utilisaient une détection optique.¹² Le principe de la détection optique repose sur l'utilisation d'un faisceau

laser focalisé sur la sonde ce qui permet de suivre ses vibrations lors de l'approche de la surface.¹² Cependant, ces méthodes nécessitent l'utilisation d'équipements complexes notamment pour garder l'alignement du laser avec le système de détection. Pour simplifier le suivi des forces de cisaillement, des méthodes non-optiques qui utilisent les piezoélectriques par exemple ont été privilégiées.

Le schéma de la figure 4.4 représente le système utilisé dans cette étude. Deux plaques piezoélectriques (1 et 2) sont connectées mécaniquement au support de l'électrode. La première permet d'appliquer la tension nécessaire pour faire vibrer la pointe et la deuxième sert à collecter l'amplitude de la vibration résultante qui est alors enregistrée par l'amplificateur *lock-in*.¹⁴ Une étude a été réalisée sur les paramètres influençant le signal des forces de cisaillement et sa reproductibilité.¹⁴ Elle démontre que les paramètres expérimentaux comme la position des piezoélectriques jouent un rôle important sur les fréquences de résonances. Chaque électrode présente donc des différences qui vont influencer fortement le spectre de résonance et l'étude de ce spectre doit être répétée pour chaque sonde.

1.4. Réseaux de micro-électrodes et de nano-électrodes

Dans les travaux présentés ici, l'objectif est de concevoir un réseau de 6000 électrodes collectives, c'est-à-dire qui sont toutes connectées entre elles. Ce réseau dense est préparé à partir du réseau de fibres optiques.

Ce type de réseau peut être très intéressant par exemple pour décorer une surface. En effet, en comparaison à l'utilisation d'une micro-électrode unique, l'utilisation de réseaux de micro ou nanoélectrodes peut permettre de fonctionnaliser une surface, de façon parallélisée, sur plusieurs positions simultanément.

Le groupe de Paolo Ugo a publié une revue¹⁵ décrivant l'utilisation de réseaux de nanoélectrodes pour la détection d'éléments traces dans les milieux biologiques en utilisant des électrodes modifiées avec un film ionomère par voltamétrie à échange d'ions (*Ion-Exchange Voltammetry* - IEV).

D'autres travaux ont été réalisés, par exemple pour la structuration de surfaces. Les équipes de H. Girault et G. Wittstock¹ ont développé un réseau de microélectrodes adressables indépendamment préparé dans une matrice flexible. Ils démontrent alors qu'ils peuvent utiliser ce réseau pour structurer de façon contrôlée et avec une précision micrométrique une surface en reproduisant une photographie en noir et blanc.¹

D'autres méthodes ont été décrites pour la réalisation de réseaux de nanoélectrodes, comme par exemple l'utilisation de membranes poreuses, dont les pores peuvent atteindre des tailles de l'ordre de la dizaine de nanomètres, ou encore le dépôt localisé de métaux, de nanofibres de semiconducteurs, d'oxydes ou de polymères conducteurs.¹⁵

Le développement d'un réseau collectif encore plus dense peut être réalisé sur notre réseau de nanopointes. Une étude réalisée précédemment démontre que le comportement en SECM de ce type de réseau dépend majoritairement de la structure générale du réseau (sa protubérance) plutôt que de la structure en nanopointes.² Cette protubérance était une conséquence du polissage du réseau et a été supprimée depuis grâce à l'utilisation d'une cliveuse qui permet d'obtenir une surface plane. Nous pouvons alors envisager que le comportement SECM de ce nouveau réseau dépendra alors majoritairement de la structure en nanopointes.

Les phénomènes de diffusion sur les réseaux de micro-électrodes collectives ont été étudiés en détails par différents groupes.^{16,17,15} La réponse globale de ces réseaux ne correspond pas toujours à la somme des réponses de chaque électrode.

Comme dans le cas des microélectrodes, le comportement de ces réseaux de microélectrodes va dépendre de l'échelle de temps considérée. R. G. Compton¹⁸ décrit ce comportement en prenant en compte différents paramètres : la taille de la couche de diffusion de chaque microélectrode individuelle δ , la taille de la microélectrode décrite par son rayon r , et la distance entre deux microélectrodes adjacentes d .

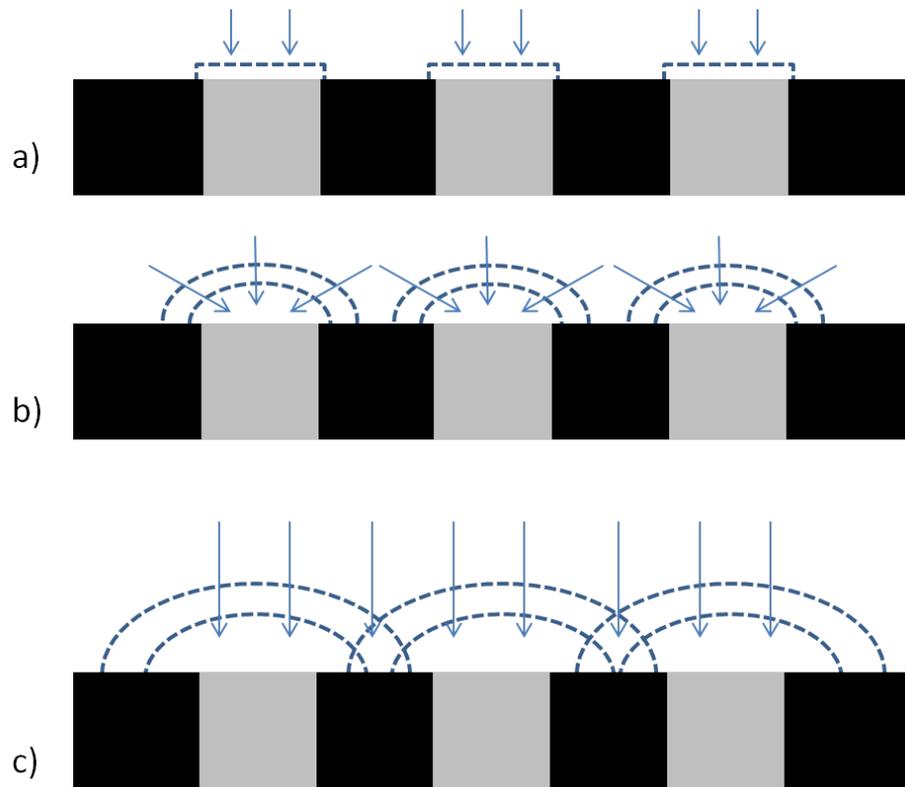


Figure 4.5: évolution de la couche de diffusion en fonction du temps sur un réseau d'électrodes : a) temps court (diffusion planaire), b) temps intermédiaire (diffusion hémisphérique, couches de diffusion indépendantes), c) temps long (recouvrement des couches de diffusion, diffusion globale planaire).

En fonction de l'échelle de temps et donc de la taille de la couche de diffusion autour de la microélectrode, quatre régimes ont pu être décrits¹⁹ :

- 1) Lorsque la couche de diffusion est plus petite que la taille de l'électrode $\delta \ll r$ (Fig. 4.5a), la diffusion est planaire sur chaque microélectrode
- 2) Lorsque $\delta = r < d$, c'est-à-dire quand la taille de la couche de diffusion est égale à celle du rayon de l'électrode mais reste petite par rapport à la distance entre chaque électrode, la diffusion radiale est observée sur chaque microélectrode
- 3) Un cas intermédiaire est observé pour $r < \delta \leq d$ où les couches de diffusions ne se superposent pas totalement (Fig. 4.5b)
- 4) Lorsque la couche de diffusion est beaucoup plus grande que le rayon de la microélectrode $\delta \gg r$ (Fig. 4.5c), les couches de diffusions sont complètement superposées et la diffusion planaire est à nouveau observée sur le réseau de microélectrodes.

Les différents régimes peuvent être atteints en modifiant l'échelle de temps de l'étude ou encore la distance entre les électrodes qui vont influencer le recouvrement des couches de diffusion des électrodes.

Le régime 2 correspond au cas où le courant mesuré sur le réseau est égal au courant de chaque microélectrode multiplié par le nombre de microélectrodes présentes dans le réseau. Dans le régime 4 au contraire, les couches de diffusion se recouvrent totalement et la réponse du réseau correspondra à la réponse d'une électrode de même dimension que la taille globale du réseau. Bien que le courant faradique soit similaire, une différence est cependant observée au niveau du courant capacitif qui est plus faible sur le réseau que sur une électrode de même taille puisque la surface active est inférieure. Le groupe de Paolo Ugo calcule que l'utilisation de réseaux de nanoélectrodes permet l'augmentation du rapport signal sur bruit par un facteur $f = A_{act} / A_{geom}$ (où A_{act} est la surface active du réseau donc de la somme des nanoélectrodes et A_{geom} est la surface globale du réseau (électrodes et isolant)) par rapport à une électrode de même taille. La limite de détection est alors améliorée de deux voire trois ordres de grandeur.¹⁵

Des modèles différents de ceux utilisés pour décrire les réseaux de microélectrodes doivent être employés pour les réseaux d'électrodes de taille nanométrique. En effet, il a été observé que, même à faible vitesse de balayage, le régime observé était toujours stationnaire et que la forme sigmoïdale de la voltamétrie cyclique était observée presque indépendamment de la vitesse de balayage. Or, certains modèles prédisent que lorsqu'une vitesse de balayage assez faible était utilisée un voltamogramme présentant des pics (et donc caractéristique d'un système dépendant de la diffusion) pouvait être observé (cas représenté dans la figure 4.5c).¹⁹

La figure 4.6 permet d'expliquer la différence de comportement entre les réseaux composés d'électrodes nanométriques et celui observé dans le cas des réseaux d'électrodes micrométriques. Sur la figure 4.6a, la modélisation d'un réseau de 10 microélectrodes est représentée. Ce modèle montre que les couches de diffusion se superposent et que le régime global devient un régime planaire. Dans le cas des nanoélectrodes (Fig. 4.6b), la superposition des couches de diffusions conduit à un régime hémisphérique, puisque la taille globale du réseau sera de l'ordre de celle d'une électrode micrométrique. Dans ce cas, il est donc possible d'atteindre un régime stationnaire sur ce type de réseau même lorsque toutes les couches de diffusions se recouvrent.

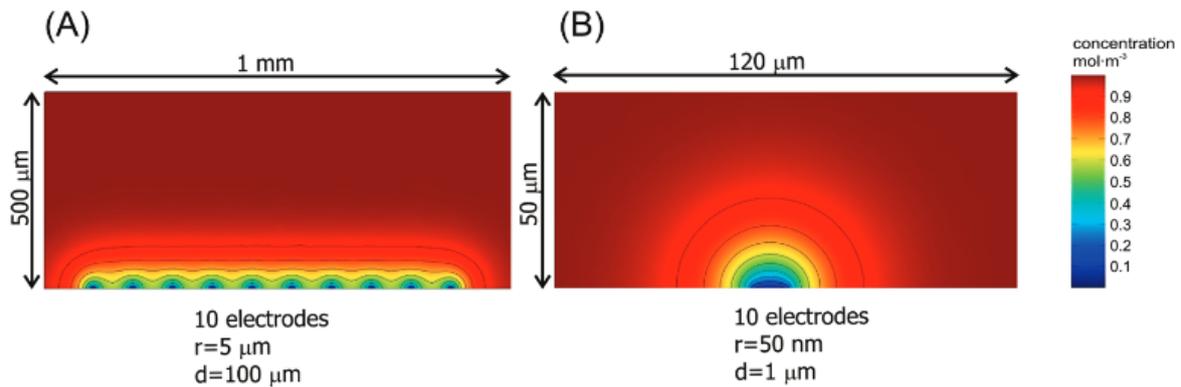


Figure 4.6 : simulation de la couche de diffusion sur un réseau d'électrodes 10x10 (A) de taille micrométriques et (B) de taille nanométriques¹⁹

Pour conclure cette étude, les auteurs comparent la taille de différents réseaux de nanoélectrodes et concluent que pour qu'un régime de diffusion planaire soit observé, la taille du réseau de nanoélectrodes doit être suffisamment grande pour que le profil de concentration change significativement autour du réseau. Les réseaux de nanoélectrodes modifient en général un volume trop faible et la concentration autour du réseau reste donc proche de celle du *bulk* ce qui permet d'observer le régime stationnaire. La possibilité d'obtenir ce régime stationnaire permet d'envisager l'utilisation de ces réseaux en mode *feedback* en SECM.

II. Conception du réseau de nanoélectrodes

II.1. Stratégie employée

En premier lieu, le réseau structuré et métallisé ne possède pas d'isolant autour de chaque pointe et son comportement est donc celui d'une électrode globale de taille égale à 350 μm (diamètre total du réseau), c'est-à-dire un état intermédiaire entre celui d'une macroélectrode et celui d'une microélectrode. Le diamètre est plus grand qu'une microélectrode, mais le régime stationnaire peut être obtenu à faible vitesse de balayage. Avant l'isolation, le voltamogramme représente donc les caractéristiques d'un système gouverné par la diffusion (Fig. 4.7a). La courbe d'approche réalisée en utilisant la fibre nanostructurée métallisée est représentée sur la Fig. 4.7b. L'interaction avec la surface n'est visible qu'à très longue distance ($> 200 \mu\text{m}$). De plus, on constate que l'approche n'est pas très bien définie. Le courant augmente à l'approche de l'ITO et diminue à l'approche de la surface de verre mais cette variation n'est pas aussi forte que dans le cas des courbes SECM

classiques. Ce comportement s'explique par les côtés de la fibre qui ne sont pas isolés correctement (*cf.* Fig. 4.7c). En effet il est difficile de pouvoir isoler la fibre parfaitement avec le vernis et le courant généré sur les côtés contribue donc fortement au courant mesuré. La perte de courant induite par le blocage de la couche de diffusion à l'approche du verre peut être compensée par le courant généré sur les côtés de la fibre. Ces caractéristiques limitent fortement l'utilisation de ces fibres en mode *feedback*.

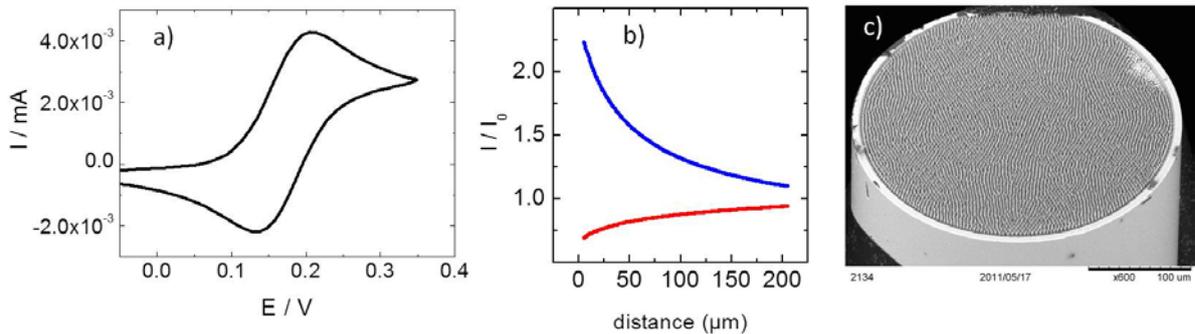


Figure 4.7 : a) voltamétrie cyclique d'un réseau de fibres optiques structuré en réseau de nanopointes et métallisé dans une solution de FcdiMeOH (1mM) dans KCl (0.1M) à $v = 50\text{mV/s}$ (Ref = Ag/AgCl) b) courbes d'approche du réseau d'une surface d'ITO conductrice (bleue) ou isolante en verre (rouge)

Afin d'utiliser le réseau de fibres optiques comme sonde SECM, l'isolation des pointes est donc nécessaire. Différentes stratégies ont été employées précédemment dans notre groupe afin de réaliser ces sondes. Ces stratégies reposent sur l'utilisation d'une peinture électrophorétique anodique²⁰ ou cathodique.³ Les peintures électrophorétiques cathodiques (utilisées dans le cadre de ce projet) sont composées de micelles de chaînes polymériques chargées positivement. Ces chaînes polymériques présentent des fonctions amines primaires²¹ ou hydroxyles³ et des fonctions isocyanates. Le faible pH de la solution doit être maintenu avant le dépôt pour que les groupements amines restent protonés ce qui assure une bonne solubilité des micelles. Lorsqu'un potentiel suffisamment négatif est appliqué, la réduction des protons à la cathode conduit à une augmentation locale du pH. L'augmentation du pH va déstabiliser les micelles qui vont alors perdre leurs propriétés colloïdales et précipiter à la surface de l'électrode.²¹ L'étape de recuit qui est ensuite réalisée permet de faire réagir les groupements amines ou hydroxyles avec les isocyanates qui vont ainsi former un réseau hautement réticulé et stable.²¹ Dans les anciennes stratégies, la peinture était déposée de façon homogène sur le réseau puis une étape de recuit conduisait à la contraction du film ce qui permet de découvrir les pointes du réseau. La surface active de l'électrode est alors fortement

diminuée et le comportement électrochimique du réseau devient similaire à celui d'une microélectrode (voltamétrie cyclique sigmoïdale).²⁰

Cependant, la qualité de la fabrication de ces réseaux va dépendre fortement des caractéristiques du film de peinture qui dépendent elles-mêmes de différents paramètres : la concentration de la peinture utilisée, l'arrangement des électrodes dans la cellule, le temps et le potentiel appliqué pendant le dépôt, le temps et la température de recuit,...²² La reproductibilité de ces travaux n'est donc pas entièrement satisfaisante et la volonté de contrôler plus spécifiquement le dépôt de peinture électrophorétique a conduit à l'élaboration d'une nouvelle stratégie.

Cette stratégie repose sur l'utilisation du positionnement basé sur l'étude des forces de cisaillement (*cf.* I.3) dans un film de silicone (PDMS - Polydiméthylsiloxane) qui permet de protéger l'extrémité des pointes du réseau. La peinture sera donc en contact avec tout le reste de l'électrode et l'isolation se fera seulement sur la partie non protégée par le PDMS (Fig. 4.8).

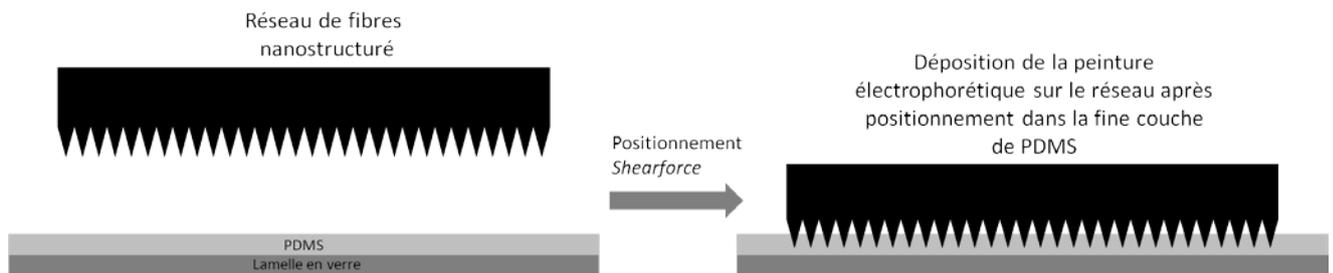


Figure 4.8 : schéma explicatif de la stratégie employée pour la réalisation du réseau de nanoélectrodes : immobilisation du réseau dans une couche de PDMS par positionnement Shearforce

Cette stratégie a été développée par A. Schulte et W. Schuhmann.²² Ils ont exploité les forces de cisaillement pour positionner une fibre de carbone au contact d'un film de silicone afin de réaliser une nanoélectrode. Après positionnement de la fibre, la peinture est introduite dans la cellule et le dépôt est réalisé en appliquant le potentiel nécessaire à la précipitation de la peinture. Ils obtiennent avec succès des électrodes dont les dimensions varient entre 46 nm et 275 nm (pour le diamètre de la pointe) présentant des voltamétries sigmoïdales. Dans le projet présenté ici, le même principe est utilisé mais cette fois pour réaliser un réseau de 6000 nanoélectrodes.

II.2. Positionnement du réseau dans la matrice de PDMS

Les fibres structurées et non-structurées (simplement clivées) ont été étudiées pour vérifier leurs compatibilités avec la technologie de détection des forces de cisaillement. Les spectres de résonance des fibres clivées et modifiées en réseau de nanopointes sont représentés sur les figures 4.9a-b et 4.10a-b. Ils présentent la variation de la réponse de l'amplificateur *lock in* (LIAR – *Lock In Amplifier Response*) en fonction de la fréquence appliquée dans l'air et dans l'eau. Le spectre est acquis à distance (100 μm) et proche (1 μm) de la surface et la différence entre ces spectres est représentée dans la partie haute de la figure. Les pics dans le spectre du haut correspondent donc aux variations importantes du signal lors de l'approche et sont les fréquences de résonance de l'électrode.

On peut remarquer que les deux systèmes présentent des spectres complètement différents ce qui illustre bien la nécessité de reproduire cette étape pour chaque électrode.

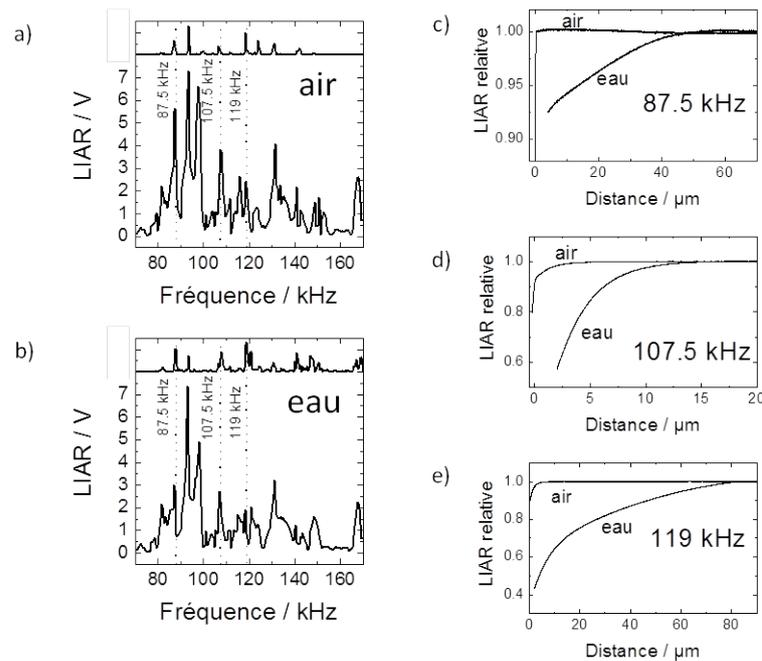


Figure 4.9 : spectre de résonance réalisé dans l'air (a) et dans l'eau (b) à 1 μm de la surface et c), d), e) courbes d'approche basées sur les forces de cisaillement sur faisceau de fibres non-structuré (clivé) à trois fréquences différentes

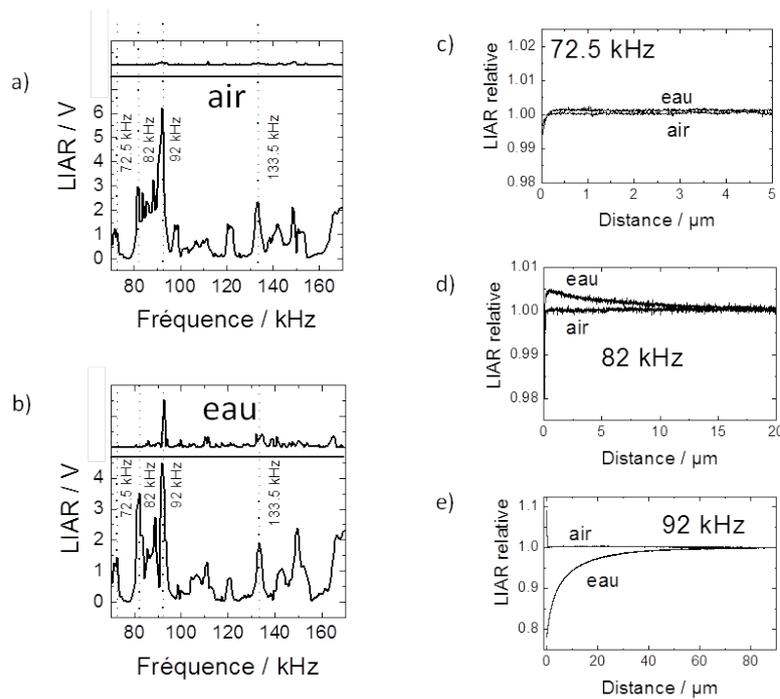


Figure 4.10 : spectre de résonance réalisé dans l'air (a) et dans l'eau (b) à 1μm de la surface et c), d), e) courbes d'approche basées sur les forces de cisaillement sur faisceau de fibres structuré en réseau de nanopointes à trois fréquences différentes

Chaque fréquence peut correspondre à des interactions de type différent et ne se comportera donc pas de la même façon lorsque l'on approche de la surface. Les courbes d'approches sont représentées dans les figures 4.9c-e et 4.10c-e. Ces courbes représentent la variation de la réponse relative du *lock in* en fonction de la distance entre la pointe et la surface. Pour chaque fibre, les courbes d'approche pour trois valeurs de fréquences différentes dans deux milieux différents (air et eau) ont été réalisées. Dans chaque cas, on observe une diminution de la réponse du *lock in* lorsque la pointe s'approche de la surface. Cela caractérise l'atténuation de la vibration de la pointe. Sur chaque courbe d'approche, la valeur de la distance entre la pointe et la surface à laquelle le signal commence à diminuer est différente. En SECM, cette distance dépend directement de la taille de la couche de diffusion de l'électrode et donc du rayon de l'électrode, mais en utilisant l'approche basée sur les forces de cisaillement cette interaction varie beaucoup en fonction de l'électrode utilisée, de la fréquence choisie et du milieu d'étude. Dans le cas des approches réalisées dans l'eau, on se rend compte que l'interaction est beaucoup plus « longue » que lorsque les approches sont réalisées dans l'air. En milieu liquide, les forces hydrodynamiques jouent un rôle essentiel dans l'interaction entre la pointe et la surface qui sera alors plus importante. Lors de

l'approche, la fréquence de vibration de la pointe est donc altérée beaucoup plus tôt dans un milieu liquide que dans l'air. Dans l'air, les approches seront beaucoup plus courtes et pour certaines fréquences se caractérisent par une interaction de type « contact ». L'interaction de type « contact » est facilement identifiable puisqu'elle correspond au cas où la fréquence chute brutalement lors de l'approche. La partie haute des figures 4.9a-b et 4.10a-b permet de sélectionner les fréquences de résonance du système. L'utilisation des fréquences de résonance permet d'obtenir des courbes mieux définies. Par exemple, on remarque que pour le réseau de fibres nanostructurés (Fig. 4.10a et b), un pic correspondant à une fréquence de résonance est observé à 92 KHz dans l'eau, mais pas dans l'air. La courbe d'approche qui en résulte (Fig. 4.10e) permet d'illustrer le fait que l'utilisation de cette fréquence est plus appropriée puisque la courbe est mieux définie, c'est-à-dire que l'interaction commence plus loin de la surface dans l'eau que dans l'air. A 72.5 KHz et 82 KHz, qui ne sont pas des fréquences de résonances de l'électrode, les courbes d'approches ne varient qu'à une distance très courte de la surface et ces fréquences ne sont donc pas privilégiées pour le positionnement par l'étude des forces de cisaillement.

En règle générale, l'interaction est beaucoup plus courte en utilisant les forces de cisaillement¹² qu'en SECM ce qui permet de placer la pointe de l'électrode de façon précise très proche de la surface avec une résolution de l'ordre du micron voire de la centaine de nanomètres.

Dans ce projet, nous nous sommes servis de l'approche basée sur l'étude des forces de cisaillement pour placer notre réseau de fibres optiques de façon précise dans une matrice en PDMS afin de protéger l'extrémité des pointes du dépôt de peinture. D'autres matériaux ont été testés mais le PDMS a été choisi préférentiellement car il présente les qualités nécessaires à la réalisation de ce projet. L'agar-agar, par exemple, est trop mou et fragile pour protéger efficacement les pointes. Au contraire, la résine epoxy est trop rigide et le contact avec le réseau abîme fortement la structure et le dépôt métallique. Le PDMS épouse parfaitement la structure de la fibre sans abîmer le dépôt métallique ni le réseau de nanopointes. De plus, il ne laisse aucune trace de matériau sur notre électrode qui peut être placée dans la couche de PDMS puis retirée autant de fois que nécessaire.

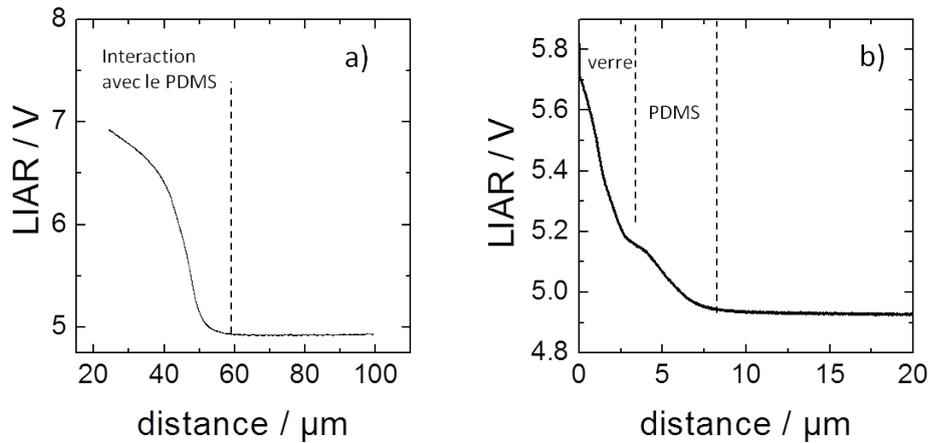


Figure 4.11 : courbes d'approche basées sur l'étude des forces de cisaillement d'un réseau de nanopointes dans un bloc de PDMS (a) et sur un film de PDMS (b)

La figure 4.11 représente les courbes réalisées lors de l'approche du réseau structuré en nanopointes d'un bloc de PDMS et d'une couche fine de PDMS sur une plaque de verre. L'approche réalisée dans le PDMS (a) ne permet pas d'identifier parfaitement la profondeur du réseau dans le PDMS et nous avons donc choisi de travailler avec un film de PDMS dont l'épaisseur est de l'ordre du micron. L'approche réalisée avec le film de PDMS (b) se décompose en deux parties, la première correspond à l'interaction de la pointe avec la couche de PDMS puis celle avec la surface en verre. L'utilisation de cette fine couche de PDMS nous permet donc de placer notre réseau de façon précise dans la couche de PDMS ce qui n'était pas possible dans le cas du bloc de PDMS.

II.3. Dépôt de la peinture électrophorétique

Une fois que le réseau est placé dans le film de PDMS, la peinture électrophorétique est ajoutée dans la cellule. La peinture est alors en contact avec toutes les pointes du réseau mais leurs extrémités sont protégées par le film PDMS. Le dépôt de la peinture se fait par l'application d'un potentiel cathodique pendant un temps de plusieurs minutes. Après le dépôt de la peinture et le recuit, l'électrode est caractérisée par voltamétrie cyclique dans une solution de ferrocène diméthanol (FcDiMeOH).

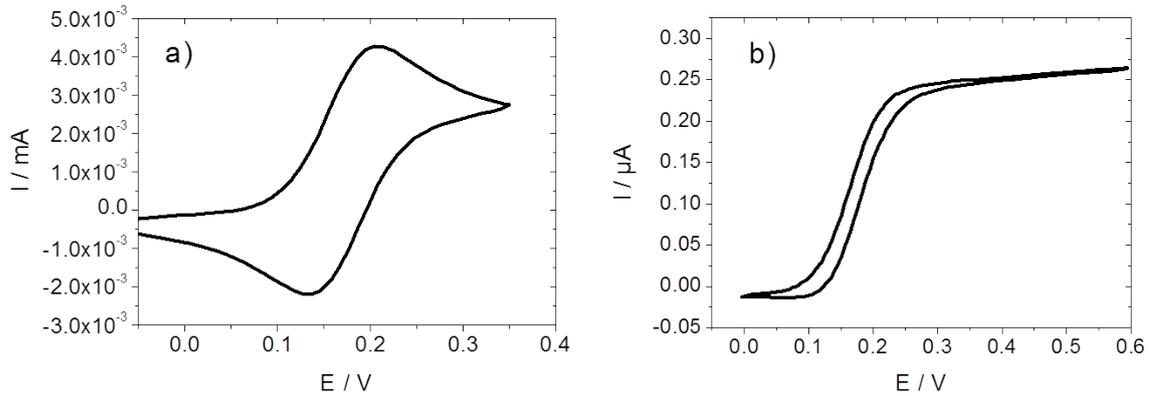


Figure 4.12 : a) voltamétrie cyclique de l'électrode avant isolation ($v=50\text{mV/s}$) et b) après isolation ($v=10\text{mV/s}$) dans une solution de $\text{Fc}^{\text{diMeOH}}$ (1mM) dans KCl (0.1M) ($\text{Ref} = \text{Ag/AgCl}$)

La figure 4.12 compare les voltamétries cycliques réalisées avant et après dépôt de la peinture électrophorétique. Le courant mesuré est beaucoup plus faible après dépôt ce qui caractérise la diminution importante de la surface active de l'électrode. Après isolation, la forme du signal est sigmoïdale et caractéristique du réseau collectif de nanoélectrodes (cf. I.3). Le courant de pic dans le cas de la voltamétrie réalisée avant l'isolation dépend de l'équation de Randles-Sevcik⁵ :

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} C A \quad (3)$$

Où I_p est la valeur du courant de pic, n le nombre d'électrons échangés, A la surface active de l'électrode en cm^2 , D le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive en cm^2/s , v la vitesse de balayage en V/s et C la concentration en mol/cm^3 . Dans notre cas nous avons travaillé avec le ferrocène diméthanol à une concentration de 1 mM et à une vitesse de balayage de 50 mV/s ($D_{\text{Fc}^{\text{diMeOH}}} = 6.4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$).²³ La surface active calculée à partir de ces données est de : $14 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$. La surface théorique, si l'on considère la surface de la fibre comme un disque de rayon $r = 175 \text{ }\mu\text{m}$ est de $0,96 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$. La surface calculée est donc plus importante que la surface théorique et cela s'explique par la structure en nanopointes du réseau qui augmente la surface active de notre électrode mais surtout par le fait que les côtés de la fibre ne sont pas totalement isolés avec le vernis comme le montre l'image MEB de la figure 4.7c).

Sur la voltamétrie enregistrée après isolation, le courant est caractéristique d'un système stationnaire. L'isolation des pointes permet donc d'avoir un réseau de nanoélectrodes collectives qui se comportent comme une microélectrode de même taille que le réseau entier (cf. I.3). En considérant chaque pointe comme un hémisphère, la valeur du courant estimée est donnée par l'équation :

$$i_{lim} = 2\pi r N n F C D \quad (4)$$

Où i_{lim} est le courant stationnaire limite, r est le rayon estimé pour chaque pointe, N est le nombre total d'électrodes du réseau, F est la constante de Faraday, C la concentration de l'espèce active en mol/cm³, et D le coefficient de diffusion de l'espèce électro-active.

Le courant stationnaire mesuré sur nos électrodes est de 0.25 μ A. A partir de l'équation (4) on calcule que ce courant correspond à des pointes dont le rayon est environ égale à 100 nm. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles trouvées dans les travaux précédents (environ 300 nm).²⁰ Cependant, les images MEB réalisées sur les réseaux isolés (cf. Fig. 4.13) donnent l'impression que la surface à l'extérieur de la partie isolée représente un rayon supérieur à 100 nm. Cette différence peut s'expliquer par la résolution du microscope qui ne permet pas de caractériser précisément jusqu'à quelle hauteur la peinture est déposée.

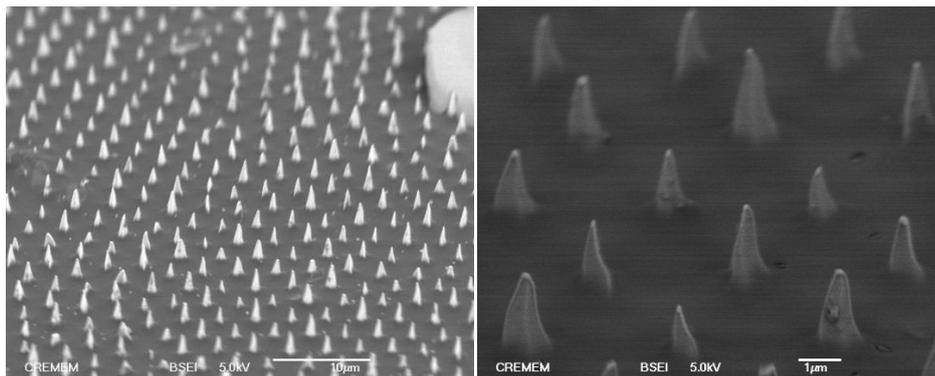


Figure 4.13 : images MEB haute résolution du réseau de nanopointes isolé

Ces résultats peuvent être comparés aux travaux réalisés par A. Schulte et W. Schuhmann pour la réalisation d'une nanoélectrode²² en utilisant la même technique. Dans ces travaux, ils obtiennent un courant d'environ 100 pA pour une seule électrode ce qui correspondrait à un courant de 0,6 μ A environ pour un ensemble de 6000 électrodes de même

taille. Ce résultat est également du même ordre de grandeur que celui obtenu dans nos travaux ($0.25\mu\text{A}$).

L'approche SECM obtenue avec ce réseau de nanoélectrodes collectives a été réalisée et est représentée dans la figure 4.14.

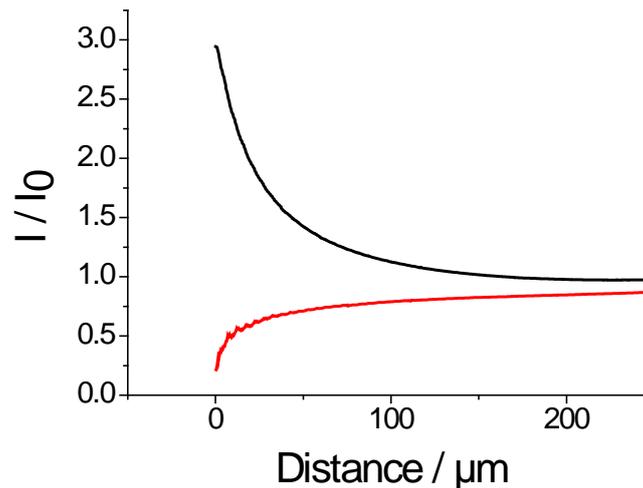


Figure 4.14 : courbe d'approche SECM d'une surface conductrice en ITO (courbe noire) et isolante en verre (rouge) avec le réseau de nanoélectrodes après isolation solution de $\text{Fc}(\text{dMeOH})$ (1mM) dans KCl (0.1M)

Le courant limite mesuré loin de la surface a une valeur de $0.25\mu\text{A}$ ce qui est similaire au courant obtenu par voltamétrie cyclique. Lors de l'approche, le courant augmente dans le cas de la surface en ITO (*feedback* positif) et diminue dans le cas du verre (*feedback* négatif).

L'effet de la surface sur la couche de diffusion se fait à une distance environ égale à 10 fois le rayon de l'électrode. Ici, l'effet est observé à partir de $200\mu\text{m}$ environ ce qui équivaut donc à une électrode de rayon environ égale à $20\mu\text{m}$. Dans le cas où les couches de diffusions seraient totalement indépendantes, la distance serait de l'ordre du micron. Si les couches se superposent, le rayon de l'électrode serait donc la taille globale du réseau donc $350\mu\text{m}$. Dans notre exemple, nous avons probablement un état intermédiaire entre ces deux situations mais cette hypothèse nécessite des travaux supplémentaires afin de pouvoir expliquer plus en détails le comportement du réseau. De plus, la réalisation d'une voltamétrie cyclique après l'immobilisation dans le substrat PDMS n'a pas été réalisée mais pourrait permettre de calculer la surface en contact avec la peinture et ainsi d'expliquer plus clairement le comportement de ces réseaux d'électrodes.

L'isolation du réseau et particulièrement des côtés nous permet tout de même d'améliorer les courbes d'approche SECM en comparaison avec le réseau non isolé (Fig. 4.7b). De plus, l'obtention d'un réseau collectif de nanoélectrodes présente une perspective intéressante pour la structuration de substrats isolants et conducteurs par SECM.

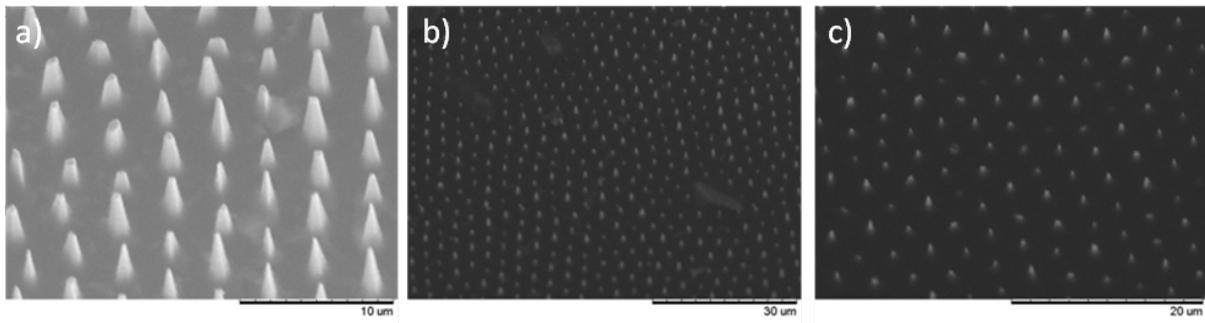


Figure 4.15 : réseaux de fibres isolées après positionnement par shearforce dans une couche de PDMS a) pointes totalement immergées dans le PDMS b) pointes immergées puis retirées de 5 µm et c) retirées de 10 µm.

Un autre avantage de cette nouvelle stratégie est la possibilité de contrôler la taille des électrodes. Différents réseaux de nanoélectrodes ont été réalisés en plaçant l'électrode à différentes distances du substrat en PDMS. Les images MEB représentées dans la figure 4.15 montrent les résultats obtenus sur trois électrodes différentes. La première (Fig. 4.15a) a été réalisée dans les mêmes conditions que celle présentée précédemment et correspond au cas où les pointes sont totalement enfoncées dans le PDMS. Dans les figures b) et c), le réseau est placé puis remonté de 5 et 10 µm respectivement. On remarque alors que la taille des électrodes diminue fortement par rapport à la première image. Ces résultats préliminaires sont très encourageants mais des études supplémentaires doivent être réalisées pour valider la reproductibilité de cette méthode.

Conclusion

Les microélectrodes et leurs applications pour le développement de la microscopie électrochimique ont été largement développées au cours des dernières décennies. L'utilisation de réseaux d'électrodes permet d'envisager la fonctionnalisation parallélisée de substrats ce qui apporte un avantage important comparée à l'utilisation d'électrodes individuelles. Dans ce

projet, nous avons démontré la possibilité de former un réseau dense en utilisant les réseaux de fibres optiques structurés en nanopointes.

L'isolation entre les pointes du réseau a été réalisée en utilisant le positionnement dans une fine couche de PDMS basé sur l'étude des forces de cisaillement. Ce positionnement est suivi d'un dépôt de peinture électrophorétique sur les parties non protégées par le PDMS de l'électrode. La protection de l'extrémité des pointes permet d'isoler le reste de l'électrode et d'obtenir le réseau de nanoélectrodes collectives. Ce réseau a ensuite été caractérisé par voltamétrie cyclique et SECM. Les résultats démontrent que le réseau, une fois isolé, présente un courant stationnaire comparable à celui de microélectrodes et peut donc être utilisé en SECM. L'approche SECM nous renseigne sur le comportement et le recouvrement des couches de diffusion des électrodes du réseau et les résultats nous indiquent que le réseau se comporte probablement de façon intermédiaire entre un réseau d'électrodes indépendantes et le cas où les couches de diffusion seraient superposées. Mais ces résultats doivent être approfondis pour confirmer cette hypothèse. La possibilité de contrôler la taille des nanoélectrodes par la distance entre le réseau et la couche de PDMS offre une perspective intéressante pour l'application de ces réseaux.

1. Lesch, A.; Vaske, B.; Meiners, F.; Momotenko, D.; Cortés-Salazar, F.; Girault, H. H.; Wittstock, G., Parallel Imaging and Template-Free Patterning of Self-Assembled Monolayers with Soft Linear Microelectrode Arrays. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (41), 10413-10416.
2. Deiss, F.; Combellas, C.; Fretigny, C.; Sojic, N.; Kanoufi, F., Lithography by Scanning Electrochemical Microscopy with a Multiscaled Electrode. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (12), 5169.
3. Szunerits, S.; Garrigue, P.; Bruneel, J.-L.; Servant, L.; Sojic, N., Fabrication of a Sub-Micrometer Electrode Array: Electrochemical Characterization and Mapping of an Electroactive Species by Confocal Raman Microspectroscopy. *Electroanalysis* **2003**, *15* (5-6), 548-555.
4. Laitinen, H. A.; Kolthoff, I. M., A Study of Diffusion Processes by Electrolysis with Microelectrodes. *Journal of the American Chemical Society* **1939**, *61* (12), 3344-3349.
5. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*. **2001**.
6. Stulík, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Marecek, V.; Kutner, W., Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications (Technical report). *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72* (8), 1483.
7. Wightman, R. M., Microvoltammetric electrodes. *Analytical Chemistry* **1981**, *53* (9), 1125A-1134A.

8. Fleischmann, M.; Pons, S., The behavior of microelectrodes. *Analytical Chemistry* **1987**, *59* (24), 1391A-1399A.
9. Wightman, R. M., Voltammetry with Microscopic Electrodes in New Domains. *Science* **1988**, *240* (4851), 415-420.
10. Zoski, C. G., *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1041.
11. A. J. Bard, M. V. M., *Scanning Electrochemical Microscopy, Second Edition*. CRC Press: **2012**.
12. Katemann, B. B.; Schulte, A.; Schuhmann, W., Constant-distance mode scanning electrochemical microscopy (SECM)--Part I: Adaptation of a non-optical shear-force-based positioning mode for SECM tips. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2025.
13. Hengstenberg, A.; Kranz, C.; Schuhmann, W., Facilitated Tip-Positioning and Applications of Non-Electrode Tips in Scanning Electrochemical Microscopy Using a Shear Force Based Constant-Distance Mode. *Chemistry – A European Journal* **2000**, *6* (9), 1547-1554.
14. Etienne, M.; Lhenry, S.; Cornut, R.; Lefrou, C., Optimization of the shearforce signal for scanning electrochemical microscopy and application for kinetic analysis. *Electrochimica Acta* **2013**, *88* (0), 877-884.
15. Ugo, P.; Moretto, L. M.; Vezzà, F., Ionomer-Coated Electrodes and Nanoelectrode Ensembles as Electrochemical Environmental Sensors: Recent Advances and Prospects. *ChemPhysChem* **2002**, *3* (11), 917-925.
16. Menon, V. P.; Martin, C. R., Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles. *Analytical Chemistry* **1995**, *67* (13), 1920-1928.
17. Lee, H. J.; Beriet, C.; Ferrigno, R.; Girault, H. H., Cyclic voltammetry at a regular microdisc electrode array. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *502* (1-2), 138-145.
18. Davies, T. J.; Compton, R. G., The cyclic and linear sweep voltammetry of regular and random arrays of microdisc electrodes: Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, *585* (1), 63-82.
19. Godino, N.; Borrisé, X.; Muñoz, F. X.; del Campo, F. J.; Compton, R. G., Mass Transport to Nanoelectrode Arrays and Limitations of the Diffusion Domain Approach: Theory and Experiment. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (25), 11119-11125.
20. Chovin, A.; Garrigue, P.; Vinatier, P.; Sojic, N., Development of an Ordered Array of Optoelectrochemical Individually Readable Sensors with Submicrometer Dimensions : Application to Remote Electrochemiluminescence Imaging. *Analytical Chemistry* **2003**, *76* (2), 357.
21. Abbou, J.; Demaille, C.; Druet, M.; Moiroux, J., Fabrication of Submicrometer-Sized Gold Electrodes of Controlled Geometry for Scanning Electrochemical-Atomic Force Microscopy. *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (24), 6355-6363.
22. Hussien, E. M.; Schuhmann, W.; Schulte, A., Shearforce-Based Constant-Distance Scanning Electrochemical Microscopy as Fabrication Tool for Needle-Type Carbon-Fiber Nanoelectrodes. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (13), 5900-5905.
23. Zhang, W.; Gaberman, I.; Ciszowska, M., Effect of the Volume Phase Transition on Diffusion and Concentration of Molecular Species in Temperature-Responsive Gels: Electroanalytical Studies. *Electroanalysis* **2003**, *15* (5-6), 409-413.

Conclusion générale et Perspectives

Le développement de capteurs utilisant la technologie des fibres optiques est un domaine de recherche en plein essor, grâce aux nombreux avantages qu'elles apportent. Leurs excellentes propriétés de transmission permettent de réaliser une analyse à distance d'un milieu confiné avec très peu d'atténuation.

Dans le premier chapitre, nous avons présenté la versatilité qu'offre l'utilisation de ces fibres optiques dans le domaine des capteurs. Différentes voies de fonctionnalisation et différentes techniques de détection utilisées sur ces fibres ont pu être développées. Nous avons également pu voir que l'utilisation de réseaux de fibres permet d'obtenir des structures originales, grâce à des procédés de dissolution chimique. Les réseaux de nanopointes ou de microcavités sont obtenus de façon reproductible et ont été utilisés aux cours de cette thèse pour la réalisation de capteurs.

Deux méthodes de fonctionnalisation ont été étudiées dans cette thèse. Dans un premier temps, l'immobilisation d'un dérivé de silane a pu être réalisée à la surface du verre de la fibre par silanisation. L'autre méthode utilise un polymère conducteur qui est électropolymérisé à la surface d'un réseau métallisé. Chacune de ces méthodes présente ses avantages et ses limitations et leur choix dépend directement de la sonde et de la méthode de détection choisie pour le capteur.

Dans le cas de la silanisation, une couche très fine est formée à la surface du réseau et la détection est réalisée par microscopie fluorescente. La transparence de la couche de silane est alors parfaitement adaptée à la réalisation de ce capteur. Les conditions expérimentales utilisées lors de la préparation de cette couche de silane nécessitent une procédure de fonctionnalisation en deux étapes. Un silane présentant un groupement photolabile est tout d'abord immobilisé à la surface du réseau, puis une étape de photodéprotection, suivie d'une étape de couplage, est réalisée pour fixer la sonde. La réaction de couplage s'effectue entre la fonction amine immobilisée à la surface du verre et une sonde présentant un groupement acide carboxylique. Cette stratégie, bien qu'elle se divise en deux étapes, présente l'avantage de pouvoir être adaptée à tout type de sonde (biologique ou chimique) présentant une telle fonction.

La deuxième stratégie utilisée combine l'électrochimie sur les réseaux de fibres optiques. La métallisation du réseau permet de fonctionnaliser le réseau par

électropolymérisation. L'utilisation de cette stratégie permet d'immobiliser un complexe de ruthénium à la surface du réseau de façon homogène et sur une épaisseur de l'ordre du micromètre. Le polymère obtenu présente des propriétés intéressantes : conductivité, stabilité, perméabilité. Mais le critère essentiel pour le choix de ce polymère est sa propriété électrochromique. La diminution de l'absorbance du polymère lors de son oxydation permet de collecter le signal émis par le complexe de Ruthénium à l'autre extrémité du réseau de fibres optiques et donc de pouvoir détecter le mercure à distance.

Les deux capteurs développés au cours de cette thèse permettent de détecter le mercure Hg^{2+} dans une gamme de concentration comprise entre 10 μM et quelques millimolaires de façon sélective, puisque aucune modification n'est observée dans le cas des autres cations testés. La limite de détection de ces capteurs n'est pas suffisamment basse en comparaison aux technologies existantes mais l'intérêt de ces travaux repose sur l'originalité des stratégies de modification de surface et leurs choix en fonction de la méthode de détection. De plus, la plupart des technologies existantes, pour la détection du mercure utilisent des sondes biologiques qui posent alors des problèmes de stabilité, de temps de réponse... Les procédures utilisées lors de la réalisation de ces capteurs mettent en jeu des méthodes expérimentales simples et facilement reproductibles. On peut donc envisager d'élargir ces travaux à n'importe quel type de sonde chimique pour la détection d'analytes différents.

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses. La réalisation du capteur multianalyte n'a pas pu aboutir, mais les résultats préliminaires sont très encourageants. Nous avons pu démontrer que le polymère, qui présente les groupements photolabiles, a pu être déprotégé et refonctionnalisé avec différentes sondes. Les résultats démontrent que la sonde couplée au support se comporte comme un système adsorbé et qu'il était possible de générer le signal ECL à la surface de ce polymère. Nous avons tenté d'employer cette stratégie pour la fonctionnalisation localisée du polymère en utilisant une photodéprotection locale à l'aide d'un laser. Le problème, qui est alors rencontré, est la longueur d'onde du laser disponible sur notre microscope qui n'est pas compatible avec le groupement photolabile utilisé. Le choix d'un autre groupement photolabile ou l'utilisation d'un laser à la bonne longueur d'onde pourrait donc résoudre le problème rencontré lors de ces travaux. De plus, l'utilisation du silane photolabile, plutôt que le polymère, n'a pas été exploitée, mais peut présenter une

alternative intéressante pour la réalisation de capteurs fluorescents ou électrochimiluminescents.

Dans le dernier chapitre de cette thèse, nous avons développé une méthodologie pour la réalisation d'un réseau de nanoélectrodes collectives basée sur le positionnement du réseau dans une matrice polymère, en utilisant l'étude des forces de cisaillement. L'isolation entre les pointes du réseau a alors été réalisée avec une peinture électrophorétique, qui se dépose uniformément sur la surface de la fibre qui est en contact avec la solution. Le réseau de nanoélectrodes ainsi obtenu est caractérisé par voltamétrie cyclique et nous avons pu démontrer que le comportement du réseau est alors similaire à celui d'une microélectrode. L'obtention d'un courant stationnaire a été exploitée en SECM et les courbes d'approches démontrent que le réseau se comporte comme si les couches de diffusion de chaque électrode étaient partiellement indépendantes. La compréhension du comportement de ces réseaux nécessite des résultats supplémentaires. En contrôlant la profondeur de pénétration du réseau dans la couche de PDMS, il semble possible d'obtenir différentes tailles d'électrodes. L'influence de ce paramètre sur les courbes d'approches SECM doit être approfondie, afin de comprendre le comportement de ces réseaux. L'application de ces réseaux denses de nanoélectrodes pourra alors être envisagée, par exemple, pour la structuration de surfaces par SECM.

L'utilisation des réseaux de fibres optiques présente donc de nombreuses possibilités pour le développement de capteurs électrochimiques et luminescents. Leurs domaines d'applications peuvent s'étendre largement depuis le domaine biomédical au domaine industriel, en passant par leur utilisation dans les procédés de microfabrication. Leur exploitation offre de nombreuses alternatives, autant au niveau des possibilités de structuration et de fonctionnalisation que pour le choix des méthodes de détections. La combinaison de l'électrochimie et de la spectroscopie permet d'élargir encore leur utilisation et d'améliorer les performances des capteurs réalisés à partir de ces réseaux. Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en jeu des techniques variées et illustrent le potentiel des réseaux de fibres optiques pour le développement d'outils analytiques performants.

Section expérimentale

I.	Eléments communs à la préparation des fibres optiques	159
I.1.	Le réseau de fibres optiques	159
I.2.	Microscopie électronique à balayage (MEB)	160
I.3.	Métallisation du réseau	160
II.	Conception d'un capteur fluorescent pour la détection de Hg^{2+}	161
II.1.	Fonctionnalisation du réseau	161
II.2.	Etude du réseau fonctionnalisé par microscopie confocale	162
III.	Polymère électrochimiluminescent aux propriétés modulables pour la détection de Hg^{2+} à distance	164
III.1.	Electropolymérisation des complexes de Ruthénium	164
III.2.	Mesures ECL	164
III.3.	Capteur multianalytes	166
IV.	Conception d'un réseau de nanoélectrodes collectives	166
IV.1.	Préparation du film de PDMS	166
IV.2.	Préparation des électrodes	167
IV.3.	Positionnement Shearforce	167
IV.4.	Isolation avec la peinture électrophorétique	168
IV.5.	Approche SECM	168

I. **Éléments communs à la préparation des réseaux de fibres optiques**

I.1. **Le réseau de fibres optiques**

Dans les travaux présentés dans cette thèse, le support utilisé est un réseau de fibres optiques contenant 6000 fibres individuelles assemblées de façon cohérente dans un câble. Les caractéristiques de ces réseaux sont représentées dans le tableau 1.

Nom du réseau de fibres (Fabricant)	Diamètre total	Diamètre de la zone de transmission	Nombre de cœurs dans le réseau	Diamètre d'un coeur	Composition du coeur	Composition de l'enveloppe
IGN-035/06 (Sumitomo Electric Ind.)	350 μm	315 μm	6000	3 μm	Silice dopée GeO_2	Silice dopée fluor

Tableau 1 : caractéristiques du réseau de fibres optiques

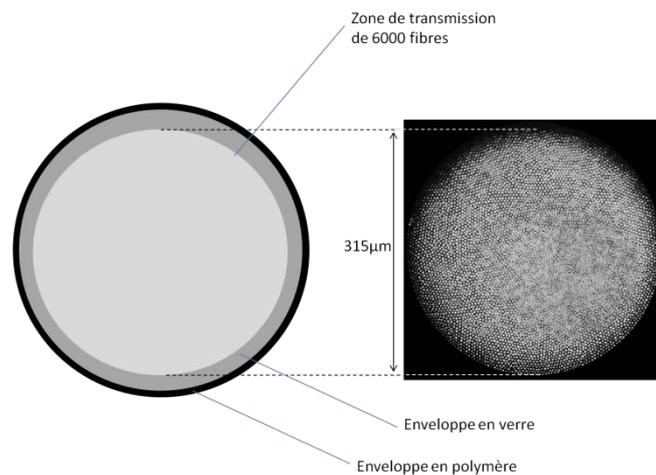


Figure 1 : Coupe transversale d'un faisceau de fibres optiques

Le faisceau est reçu sous forme de rouleau de plusieurs mètres. La première étape consiste au clivage du réseau. Pour cela, la fine enveloppe protectrice en polymère de la fibre est éliminée avec un peu d'acétone et un coton afin de déprotéger le verre. Le clivage est ensuite effectué à l'aide d'une cliveuse à pointe de diamant (VYTRAN LDC 200) qui permet de couper le réseau de façon nette et d'obtenir une surface plane.

Le réseau clivé est ensuite microstructuré par dissolution chimique sélective. Pour cela, une extrémité des fibres clivées est immergée dans une solution d'acide fluorhydrique

tamponnée $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}/\text{H}_2\text{O}$ (NH_4F et HF à 40% et 48% respectivement) (5/1/1 en proportions volumiques) pendant un temps de 1h20.

ATTENTION LES SOLUTIONS DE HF SONT EXTREMEMENT CORROSIVES !!!!

Cette étape de dissolution chimique permet d'obtenir le réseau de 6000 nanopointes utilisé dans tous les travaux de cette thèse.

1.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Lors de la préparation des réseaux et pour suivre les différentes étapes de modification réalisées tout au long de cette thèse, la microscopie électronique à balayage a été utilisée de façon routinière. L'utilisation d'un plot incliné à 45° permet d'imager la surface des réseaux de fibres. Les fibres sont immobilisées sur le support à l'aide d'un adhésif conducteur (carbone). Le microscope employé (Hitachi – TM 1000) ne nécessite pas de couper le réseau ni de métalliser le réseau avec une fine couche d'or ce qui permet de garder intact et de réutiliser l'échantillon après l'imagerie.

1.3. Métallisation du réseau

Afin de transformer le réseau en électrode, une étape de métallisation est nécessaire. Cette métallisation a été réalisée avec deux matériaux et deux appareils différents. Pour déposer la fine couche d'or, la métallisation est réalisée avec un métalliseur EMITECH K550X avec un temps de dépôt de 30 sec ($I = 35\text{mA}$) sous pression en Argon de 10^{-1} mbar. Les fibres sont immobilisées sur un plot et la face microstructurée est dirigée vers la cible d'or. Dans le cas des dépôts d'or réalisés au LCPME de Nancy, une procédure similaire est utilisée à la seule différence qu'une sous couche de chrome est déposée pour améliorer l'adhésion de l'or sur le réseau (cible de chrome : 1 min de dépôt à $I = 100$ mA).

Pour les dépôts d'ITO, la cible utilisée est une cible composée à 90% d'oxyde d'indium (In_2O_3) et 10% d'oxyde d'étain (SnO_2) d'une pureté de 99.99% (Cerac). La pulvérisation cathodique magnétron est réalisée avec l'Alcatel SCM 451. Avant de réaliser le dépôt, un vide poussé est atteint (10^{-6} mbar) à l'aide d'une pompe à diffusion pendant au moins 6h. Le dépôt est réalisé pendant 10 min sous pression d'oxygène ($2 \cdot 10^{-5}$ mbar) et d'argon (10^{-2} mbar) à une puissance du générateur environ égale à 250-280 W.

Dans chaque cas ; les fibres sont orientées face à la cible et le dépôt ne se réalise pas uniquement à la surface du réseau mais également sur les côtés. Le contact électrique est alors réalisé en enroulant un fil de cuivre (RS - Kynar Insulated 30 awg) autour du réseau métallisé et une goutte de laque d'argent (Agar Scientific - G302) permet d'assurer la connexion.

Pour finir, une fine couche de vernis noir est appliquée sur le tour de la fibre pour ne garder que l'extrémité conductrice.



Figure 2 : photographie d'un réseau de fibres optiques modifié en électrode

II. Conception d'un capteur fluorescent pour la détection de Hg^{2+}

II.1. Fonctionnalisation du réseau

Après l'étape de dissolution dans la solution d'acide fluorhydrique, la surface en verre est oxydée avec un plasma oxygène (Harrick Plasma – PlasmaFlo PDC-FMG) pendant 20 minutes ($pO_2 = 1200$ Torr). Cette étape permet d'optimiser le nombre de groupements hydroxyles à la surface du verre et peut également être réalisée par immersion dans une solution piranha (3/1, H_2SO_4/H_2O_2 , v/v) pendant un temps très court (30 sec maximum) pour ne pas abîmer la structure du réseau.

La silanisation est réalisée dans une solution de Silane-NVOC (**B**) (synthétisé par le groupe de M. Schmittel) à 10% dans le toluène sec pendant 20h à 80°C. Après rinçage, une étape de recuit est réalisée pendant 2h à 100°C pour finaliser la fonctionnalisation.

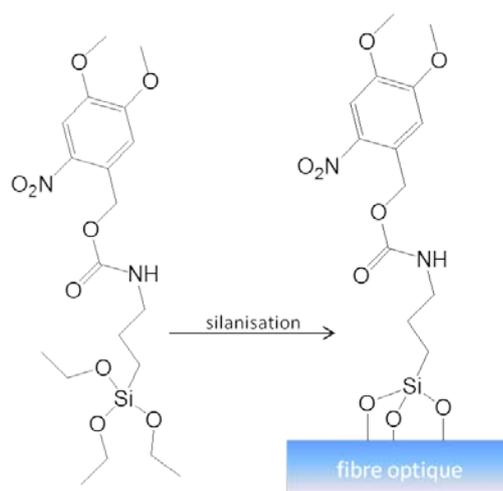


Figure 3 : Silanisation de la surface de la fibre avec le silane-NVOC

La photodéprotection du groupement NVOC est réalisée à l'aide d'une lampe UV (Hamamatsu, LC8 - 45 mW/cm²) avec le filtre (A9616-05) pendant 40 min dans le méthanol. Le suivi de la photodéprotection sur plaque de verre a été réalisé avec un spectromètre UV-vis (Varian Cary 100 Scan) en plaçant la plaque modifiée dans le trajet optique. Après déprotection, les fibres sont rincées au dichlorométhane et séchées à l'azote. Elles sont immédiatement introduites pour 12h dans la solution d'ester activé **C** (synthétisé par le groupe de M. Schmittel) dans le dichlorométhane (1 mM) puis rincées copieusement avec du dichlorométhane et du méthanol.

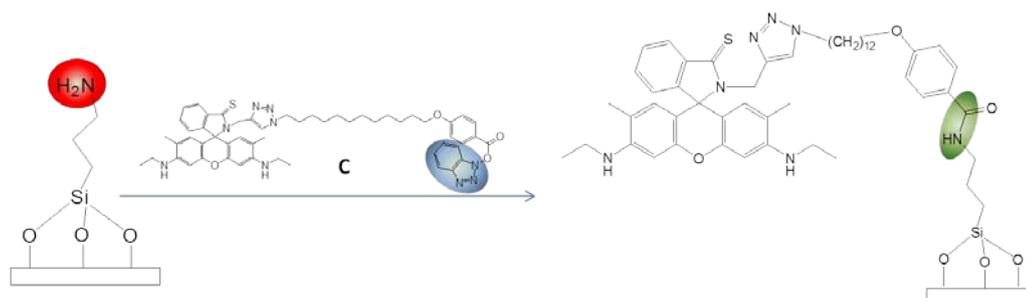


Figure 4 : immobilisation du dérivé de la rhodamine à la surface du verre

II.2. Etude du réseau fonctionnalisé par microscopie confocale

II.2.1. Microscope confocal

Le microscope qui a été utilisé pour réaliser l'étude est un microscope confocal (Leica TCS SP5 II). Le principe de fonctionnement est expliqué dans la figure 5. Une source

lumineuse (ici le laser) est projetée à l'aide d'un miroir dichroïque à la surface de l'échantillon. Par un système de filtre, le signal émis par fluorescence par l'échantillon est sélectionné et détecté avec le photomultiplicateur. L'utilisation du sténopé (*pinhole*) permet de sélectionner uniquement un seul plan focal.

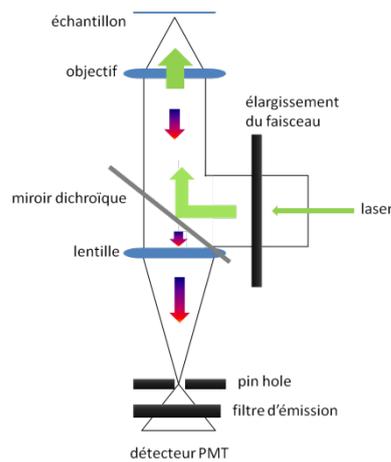


Figure 5 : schéma explicatif du microscope confocal

II.2.2. Etude du réseau fonctionnalisé pour la détection de cations

L'image en épifluorescence est enregistrée en exposant la face distale de la fibre avec un laser ($\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$, puissance : 50%) comme représenté sur la figure 6. Les longueurs d'ondes du détecteur (PMT) sont sélectionnées pour collecter le signal fluorescent (entre 520 nm et 600 nm). Chaque image est enregistrée après un temps de mise en contact avec le cation de 600 sec dans une solution contenant 95-5 (Acétonitrile-HEPES) en proportions volumiques.

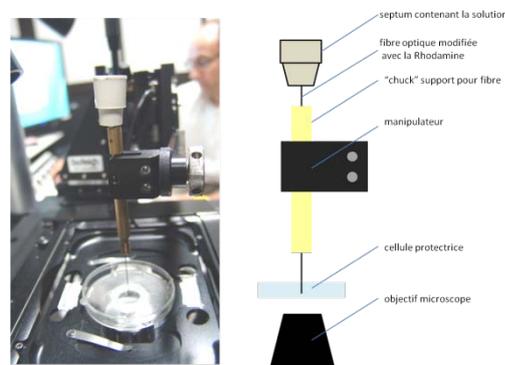


Figure 6 : photographie du système utilisé pour l'étude de complexation des cations

Les solutions des différents cations : K^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} (1mM dans un mélange ACN : HEPES 95 : 5) sont préparées avant l'expérience à partir de leur sel de perchlorate. Chaque réseau n'est utilisé qu'une fois pour des raisons de photobleaching important sur les dérivés de la Rhodamine.

III. Polymère électrochimiluminescent aux propriétés modulables pour la détection de Hg^{2+} à distance

III.1. Electropolymérisation des complexes de Ruthénium

L'électropolymérisation des complexes est réalisée par voltamétrie cyclique avec un système à trois électrodes où l'électrode de travail est notre réseau de fibres optiques métallisé (*pseudo*-référence : Ag, CE : Pt) connecté à un potentiostat (μ -Autolab type III). Les voltamétries cycliques sont enregistrées avec GPES dans une solution des complexes **1** à **3** (synthétisés par le groupe de M. Schmittel) dans l'acétonitrile avec 0.1 M de tetra-*n*-butylammonium hexafluorophosphate (*n*-Bu₄NPF₆) comme électrolyte support.

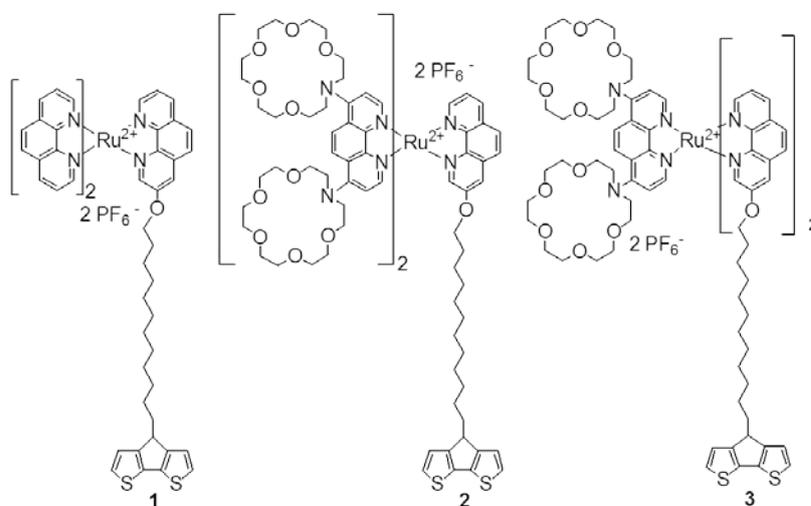


Figure 7 : complexes de Ruthénium(II) **1**, **2** et **3** (synthétisés par le groupe de M. Schmittel)

III.2. Mesures ECL

III.2.1. Photomultiplicateur

Les mesures du signal ECL sont réalisées dans une cellule en Téflon avec un fond transparent (lamelle de verre épaisseur 0.17 mm) (*cf.* fig. 8) dans une solution à 95-5 (ACN

$n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ 0.1M – PBS 0.1M) en présence de TPrA (50 mM). Le potentiel est appliqué avec un potentiostat (PGSTAT 30 - Autolab) alors que le système est placé dans une boîte noire. L'électrode de travail est notre réseau de fibres optiques modifié par électropolymérisation (*pseudo*-référence : Ag, CE : Pt). L'intensité ECL est mesurée en plaçant l'électrode de travail en face du photomultiplicateur (Hamamatsu – R5070) à une tension de 750V appliquée grâce à un générateur de haute tension (Hamamatsu – high voltage power supply C9525). Le signal est ensuite amplifié par un ampèremètre (Keithley picoammeter 6485) avant d'être collecté sur la deuxième entrée du potentiostat (ADC 164).

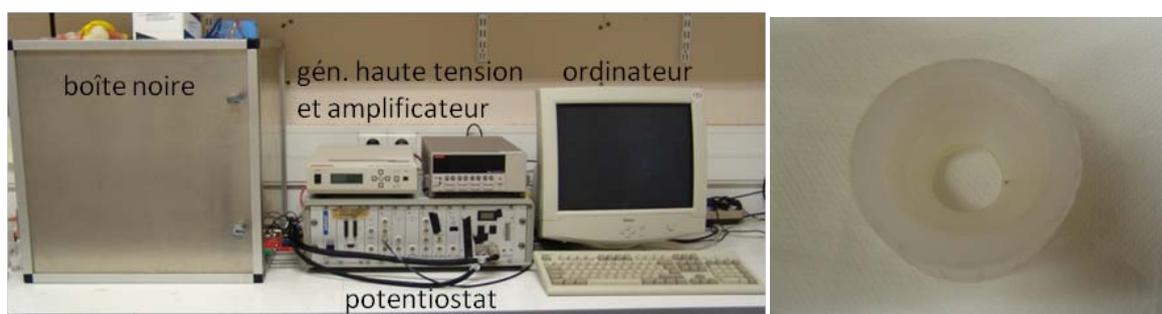


Figure 8 : montage expérimental ECL et cellule utilisée

Deux configurations ont été utilisées pour réaliser les mesures ECL sur le réseau de fibres optiques (Fig. 9). Dans un premier temps, l'intensité du signal est mesurée en face de la surface modifiée du réseau et dans un deuxième temps au travers du réseau en plaçant le photomultiplicateur à l'autre extrémité du réseau.

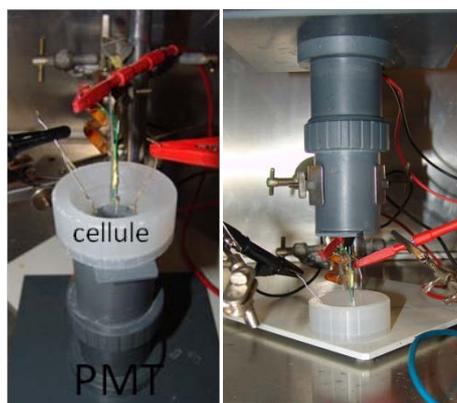


Figure 9 : les deux configurations utilisées pour les mesures d'ECL : en face (gauche) et au travers (droite) du réseau de fibres optiques modifié

III.2.2. Spectre ECL

Le spectre ECL est enregistré dans la même cellule que précédemment par un spectromètre (Princeton Instruments Acton - SpectraPro 2300i). La fibre optique connectée au détecteur (camera CCD) est placée en face de notre électrode de travail (réseaux de fibres optiques modifiées). Le spectre est mesuré pendant l'application d'un potentiel de 1.2 V à l'aide d'un potentiostat (μ -Autolab type III).

III.3. Capteur multianalytes

III.3.1. Photodéprotection globale et refunctionalisation

La photodéprotection du réseau est réalisée avec la lampe (Hamamatsu, LC8 - 45 mW/cm²) avec le filtre (A9616-05) pendant 130 min dans le méthanol. La plaque est ensuite séchée à l'azote liquide puis sous vide pendant 1h. Elle est ensuite directement introduite dans la solution de refunctionalisation (acide carboxylique 1 mM ; HOBt 1.1 éq., DCC 1.1 éq.). La plaque est retirée du mélange après un temps de 17h à 20h puis rincée copieusement avec du dichlorométhane.

III.3.2. Photodéprotection localisée

La photodéprotection localisée est réalisée par microscopie confocale avec le laser de longueur d'onde 405 nm à différentes puissances (3 %, 6 %, 12.5%) et pour différents temps d'expositions (30 sec, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min) en gardant la plaque immergée dans le méthanol.

IV. Conception d'un réseau de nanoélectrodes collectives (en collaboration avec le LCPME)

IV.1. Préparation du film de PDMS

Le film de PDMS est réalisé par spin coating à 4000 tpm pendant 30 sec d'un mélange 0.9 mL du pot A et 0.1mL du pot B (Momentic Performance Materials – Kit RTV 615) dans 2 mL de toluène sur une lamelle en verre. L'échantillon est ensuite déposé à l'étuve pendant 4h à 60°C. L'épaisseur du film est mesurée par AFM et estimée à une valeur d'un micron.

IV.2. Préparation des électrodes

Dans le cadre de ce projet, les électrodes faites à partir du réseau de fibres optiques sont préparées de façon différente. Il est nécessaire de mettre le réseau dans un capillaire afin de pouvoir le positionner dans le support pour la réalisation des approches Shearforce et SECM. Le réseau structuré en nanopointes est inséré dans un capillaire en borosilicate (Clark Electromedical Instruments – GC12OF-10 : 1.2mm O.D. x 0.69 I.D.). Un fil de cuivre étamé est inséré à l'autre extrémité du capillaire et une goutte de résine époxy argent (Technifr - EPOTEK-H20S) permet d'assurer le contact électrique. L'immobilisation du réseau dans le capillaire est assurée par l'ajout d'une goutte de résine epoxy (Radiospare - Quick set epoxy adhesive RS850-940) aux deux extrémités du réseau. Un recuit de 2h à 80°C est enfin réalisé pour finir de fixer les deux résines époxy. Pour finir, du vernis est utilisé pour isoler le contour de la fibre jusqu'à l'entrée du capillaire.

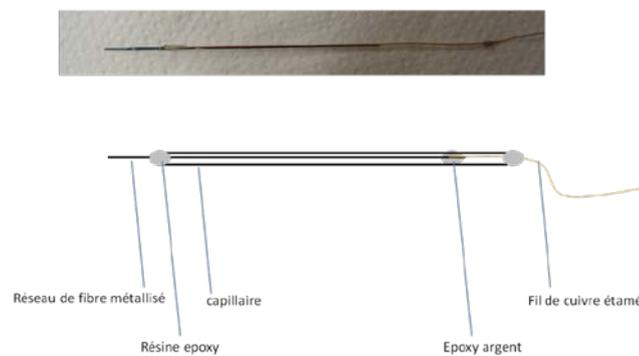


Figure 10 : électrode réalisée à partir du réseau de fibres optiques dans le capillaire en verre

IV.3. Positionnement Shearforce

Le positionnement par les forces de cisaillement est réalisé à l'aide d'un amplificateur Lock-in AMETEK 7280 selon le schéma représenté dans la figure 11.

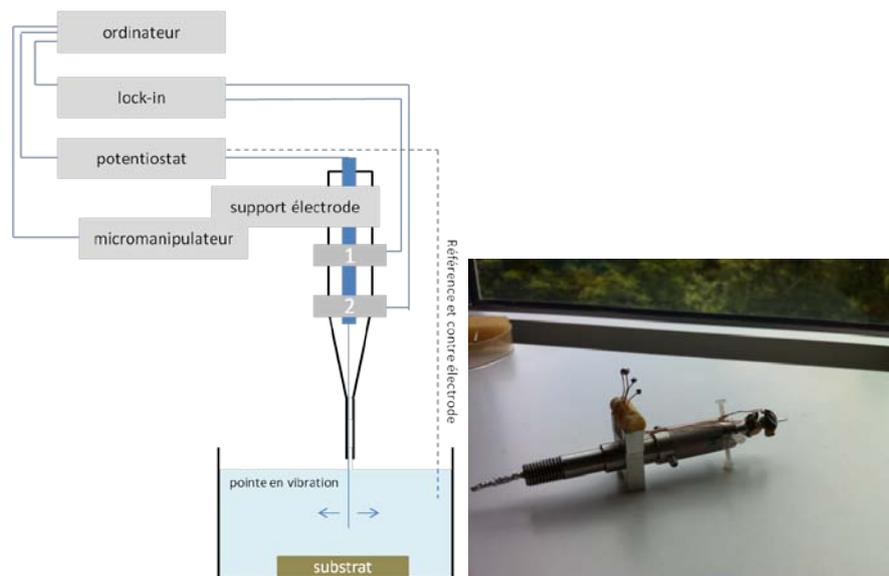


Figure 11 : Schéma du système SECM couplé avec le Shearforce (1 et 2 représentent les piézoélectriques) et photographie du porte-électrode

Le porte-électrode (figure 11) permet d'immobiliser l'électrode dans le capillaire et contient les connectiques nécessaires au branchement de deux petits piézoélectriques sur le Lock-In, qui viendront se placer au voisinage de la pointe de l'électrode.

IV.4. Isolation avec la peinture électrophorétique

La peinture électrophorétique (BASF) est déposée pendant un temps de 240 sec à une valeur de potentiel de $-2.8V$ à l'aide d'un bipotentiostat PalmSens (Palm instruments BV, Houten, Pays-Bas). Un recuit de 30 minutes à $135\text{ }^{\circ}C$ est ensuite réalisé pour finaliser la fixation de la peinture électrophorétique.

IV.5. Approche SECM

Le système SECM est basé sur un instrument développé par Sensolytics (RuhrUniversität, Bochum, Allemagne), équipé avec un bipotentiostat PalmSens (Palm instruments BV, Houten, Pays-Bas). Toutes les mesures ont été réalisées dans une solution de ferrocènediméthanol (1mM, 98%, Aldrich) dans 0.1M KCl (99.9%, Wormapur).

Liste des publications

Les travaux présentés dans ce manuscrit et réalisés au cours de cette thèse ont menés aux publications suivantes :

- **Functionalization of Optical Nanotip Arrays with an Electrochemical Microcantilever for Multiplexed DNA Detection**

Descamps E., Duroure N., Deiss F., Leichlé T., Adam C., Mailley P., Aït-Ikhlef A., Livache T., Nicu L., Sojic N.

Lab on a Chip, 13 (15), 2956 - 2962, 2013

- **Lighting up redox propulsion with luminol electrogenerated chemiluminescence**

Bouffier L., Zigah D., Adam C., Sentic M., Fattah Z., Manojlovic D., Kuhn A., Sojic N.

ChemElectroChem, DOI: 10.1002, celc.201300042, 2013

- **Electrochemiluminescent polymer film with suitable redox “turn-off” absorbance window for remote selective sensing of Hg²⁺**

Shu Q., Adam C., Sojic N., Schmittel M.

Analyst, 138, 4500-4504, 2013

- **Photochemical functionalisation of optical nanotips with a rhodamine chemosensor for remote through-fiber detection of Hg²⁺**

Chen K., Adam C., Sojic N., Schmittel M.

RSC Advances, 2013

Résumé

La structuration et la fonctionnalisation de réseaux de fibres optiques ont été utilisées afin de réaliser différents capteurs électrochimiques et luminescents. Ce type de support permet de concevoir des capteurs capables de détecter à distance dans un milieu confiné, difficilement accessible ou dangereux. Deux capteurs pour la détection du mercure cationique (Hg^{2+}) sont décrits dans cette thèse. Le premier utilise un dérivé de la rhodamine, qui est lié de façon covalente à la surface en verre du réseau, par silanisation. Le signal fluorescent de cette sonde est augmenté en présence de mercure ce qui permet de le quantifier. Le second capteur combine l'électrochimie sur ces réseaux de fibres optiques, grâce à une fine couche conductrice déposée à sa surface. Le réseau est ensuite modifié avec un complexe de Ruthénium(II), qui peut être électropolymérisé par l'intermédiaire de la fonction cyclopentadithiophène (CPDT). La détection du mercure est alors réalisée par électrochimiluminescence (ECL), qui est collectée à distance, grâce aux propriétés électro-modulables du film polymère. Les réseaux de fibres optiques nanostructurés ont également été utilisés pour la réalisation d'une sonde SECM, présentant un réseau dense de nanoélectrodes collectives. La réalisation d'un tel outil utilise le positionnement basé sur les forces de cisaillement et peut être utilisé pour la structuration de surfaces conductrices ou isolantes par SECM.

Mots Clés

Capteurs – Réseaux de fibres optiques – Silanisation – Fluorescence –
Electrochimiluminescence – Electropolymérisation – SECM – Réseaux de nanoélectrodes

Abstract

The structuration and the functionalisation of optical fiber bundles have been used to design different optical and electrochemical sensors. The use of these tools allows the realisation of sensors for remote detection in a confined environment, which may be dangerous or not easily accessible. Two sensors for the detection of inorganic mercury (Hg^{2+}) are described in this thesis. The first sensor uses a rhodamine derivative, which is covalently functionalized on the surface of the glass optical fibers by silanisation. The fluorescent signal of this probe increases in presence of mercury, which allows its quantification. The second sensor uses the combination of electrochemistry on the optical fiber bundle, thanks to a thin conductive layer deposited on its surface. The bundle is then modified by electropolymerisation of a Ruthenium (II) complex through the cyclopentadithiophene (CPDT) moiety. The detection of mercury is then realised by electrogenerated chemiluminescence (ECL), which is collected through the optical fiber bundle, thanks to the optical properties of the polymer film. The nanostructured array of optical fibers has also been used to create a new SECM probe composed of a dense nanoelectrode array. Such a tool is obtained through Shearforce positioning and can be used for the structuration of conductive or insulating surfaces by SECM.

Keywords

Sensors – Optical fiber bundles – Silanisation – Fluorescence – Electrogenerated
Chemiluminescence – Electropolymerisation – SECM – Nanoelectrode array