



HAL
open science

Couplage de la microscopie de fluorescence à la microscopie électrochimique : des solutions aux surfaces

Laetitia Legras

► To cite this version:

Laetitia Legras. Couplage de la microscopie de fluorescence à la microscopie électrochimique : des solutions aux surfaces. Autre. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLN066 . tel-02895793v1

HAL Id: tel-02895793

<https://theses.hal.science/tel-02895793v1>

Submitted on 10 Jul 2020 (v1), last revised 15 Jul 2020 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Couplage de la microscopie de fluorescence à la microscopie électrochimique : des solutions aux surfaces

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à École Normale Supérieure Paris-Saclay

École doctorale n°571 Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation
et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Cachan, le 12 décembre 2019, par

LAETITIA GUERRET (LEGRAS)

Composition du Jury :

Frédéric Kanoufi Directeur de recherche CNRS, ITODYS Paris	Rapporteur, Président
Eric Levillain Directeur de recherche CNRS, MOLTECH Angers	Rapporteur
Renaud Cornut Ingénieur CEA, CEA Saclay	Examineur
Corinne Lagrost Directrice de recherche CNRS, ISC Rennes	Examinatrice
Fabien Miomandre Professeur des universités, PPSM Cachan	Directeur de thèse
Galina Dubacheva Chargée de recherche CNRS, PPSM Cachan	Co-directrice de thèse
Pierre Audebert Professeur des universités, PPSM Cachan	Invité

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier M. Fabien Miomandre pour son encadrement durant cette thèse, mais plus généralement pour son soutien et sa confiance au cours de l'ensemble de mon parcours à l'ENS Paris-Saclay. Je le remercie également pour ses idées et ses conseils qui ont permis au projet d'avancer. Je remercie Mme Galina Dubacheva d'avoir co-encadré ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à tous les membres du jury – M. Frédéric Kanoufi, M. Eric Levillain, Mme Corinne Lagrost et M. Renaud Cornut – pour avoir accepté de lire le manuscrit et d'évaluer mon travail, mais également pour leurs conseils et leurs idées abordées lors de la soutenance.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans M. Jean-Frédéric Audibert. Son aide fut plus que précieuse dans la mise en oeuvre des expériences de microscopie. De plus, nos nombreuses discussions concernant l'interprétation des données ou le développement instrumental ont été très enrichissantes, souvent fructueuses pour l'avancée du projet et sa structuration. Merci encore.

Ce travail est également le fruit de plusieurs collaborations. Au PPSM, je remercie chaleureusement M. Pierre Audebert pour ses idées sur la partie "polymères conducteurs", M. Gilles Clavier pour les calculs DFT, M. Laurent Galmiche pour la synthèse de l'alkoxytétrazine et M. Robert Pansu pour nos discussions concernant la modélisation du couplage SECM-microscopie de fluorescence. Je remercie également M. Philippe Lang pour les mesures Infra-rouge, l'institut Charles-Gerhardt de Montpellier pour la synthèse des monomères, M. Jean-Marc Noel pour l'aide à la préparation de nanoélectrodes.

Je tiens à remercier spécialement Mme Indra Gonzalez et M. Baptiste Maillot, que j'ai eu la chance d'encadrer durant leur stage au laboratoire, pour leurs contributions respectivement au développement du couplage SECM - microscopie de fluorescence et à la préparation des monocouches. Je leur souhaite beaucoup de réussite dans leurs futurs travaux.

Je remercie M. Jacky Fromont, Mme Elise Michel, M. Stéphane Maisonneuve, Mme André Husson et Mme Sylvie Zucha dont le travail a permis le bon déroulement du projet.

Plus généralement, je remercie l'ensemble des membres du PPSM pour leur accueil chaleureux et leur disponibilité.

Enfin, je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à ma famille et à mes amis.

Je remercie en particulier ma belle-mère et mon mari pour leurs relectures attentives, et mes filles pour leur patience et leur bonne humeur contagieuse.

Je remercie enfin très chaleureusement mes parents pour leurs encouragements et leur soutien indéfectible.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Table des figures	7
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	17
Introduction	1
1 L'électrofluorochromisme : principe, systèmes moléculaires et instrumentation	3
1.1 Introduction	3
1.2 L'électrochimie : principe et technique de microscopie	4
1.2.1 Notion de couche de diffusion	4
1.2.2 Les Ultra-MicroElectrodes - UME	4
1.2.3 Le microscope électrochimique à balayage (SECM)	6
1.3 La photoluminescence et la fluorescence	9
1.3.1 Principe général	9
1.3.2 Grandeurs caractéristiques de la fluorescence	11
1.3.3 Mesure de fluorescence résolue spatialement : la microscopie de fluorescence	13
1.3.4 Mécanismes d'extinction de la fluorescence [96]	15
1.3.5 La modulation de la fluorescence par électrochimie : l'électrofluorochromisme	20
1.4 Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome	22
1.4.1 Les dyades moléculaires composées d'un système électroactif et d'un fluorophore	22
1.4.2 Les fluorophores directement électroactifs	25
1.4.3 La famille des tétrazines	25
1.4.4 Polymères et autres matériaux électrofluorochromes	33
1.5 Des applications diverses : de l'électrofluorochromisme en solution à l'électrofluorochromisme solide	35
1.5.1 Exemple d'applications de l'électrofluorochromisme en solution	35
1.5.2 La mise au point de dispositifs	35
1.5.3 L'électrofluorochromisme à l'échelle de la monocouche	36
1.6 Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux	36
1.6.1 Intérêt et enjeux	36
1.6.2 Utilisation de cellules spectroélectrochimiques de type "couche mince"	37

1.6.3	Utilisation de la microscopie de fluorescence : vers une amélioration des résolutions spatiale et temporelle	39
1.6.4	Le choix de la sonde : les deux stratégies	43
1.6.5	La recherche de la résolution spatiale avec la microscopie électrochimique à balayage	45
1.7	Conclusion	48
2	L'électrofluorochromisme de polymères conducteurs à base d'unité TBT fonctionnalisée par des chloroalkoxytétrazines	49
2.1	Mise en contexte et présentation des objectifs	49
2.1.1	Les polymères conducteurs	50
2.1.2	Tétrazines et polymères conducteurs	51
2.1.3	Stratégie : choix des monomères et propriétés attendues du polymère correspondant	54
2.2	Les monomères : synthèse et caractérisation	55
2.2.1	Synthèse des monomères	55
2.2.2	Les propriétés photophysiques	56
2.2.3	Les propriétés électrochimiques	58
2.3	Les polymères : électropolymérisation et caractérisation	59
2.3.1	Électrosynthèse des polymères	59
2.3.2	Caractérisation électrochimique des polymères	61
2.3.3	Caractérisation photophysique des polymères	65
2.4	Étude des propriétés électrofluorochromes des polymères	67
2.4.1	Mise en oeuvre expérimentale	67
2.4.2	Modulation de la fluorescence des films de poly(TBTbisTz) par contrôle du potentiel appliqué au substrat	68
2.5	Conclusions et perspectives	71
3	L'électrofluorochromisme de monocouches de tétrazines greffées sur une électrode d'ITO	75
3.1	Introduction	75
3.1.1	La molécule tétrazine siloxane	76
3.1.2	Description de la stratégie adoptée	81
3.2	Préparation et caractérisation des monocouches	85
3.2.1	Protocole de greffage	85
3.2.2	Caractérisation des surfaces fonctionnalisées	85
3.3	Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique	88
3.3.1	Dispositif expérimental pour l'étude de la modulation	88
3.3.2	Modulation de la fluorescence : mise en évidence à l'aide de la caméra CCD	89
3.3.3	Modulation de la fluorescence observée à l'aide du spectrophotomètre : mise en évidence du spectre de la tétrazine	91
3.3.4	Influence de la valeur et de la durée d'application du potentiel de réduction	97
3.3.5	Influence de la concentration en acide de la solution de greffage	97
3.4	Conclusions et perspectives	104

4	Couplage de la microscopie électrochimique à balayage à la microscopie de fluorescence : utilisation d'une unique sonde à la fois électroactive et fluorescente	105
4.1	Présentation des objectifs du couplage SECM - microscopie de fluorescence par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome	105
4.1.1	Rappel des enjeux	105
4.1.2	Adressage de la sonde électrofluorochrome avec la pointe SECM pour un contrôle local de la fluorescence dans trois configurations du SECM	106
4.1.3	Le choix de la sonde électrofluorochrome	108
4.2	Mise en œuvre expérimentale	110
4.2.1	Description du montage	110
4.2.2	Description et caractérisation de la solution	112
4.2.3	Procédure d'acquisition	114
4.3	Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback négatif	115
4.3.1	Influence du potentiel de la pointe SECM	115
4.3.2	Influence de la distance pointe-substrat	116
4.3.3	Caractérisation spectrale de la modulation : effet du potentiel de pointe et de la distance pointe-substrat	121
4.3.4	Conclusion partielle	122
4.4	Modulation de l'intensité de fluorescence en mode "feedback" positif	122
4.4.1	Influence de la distance pointe-substrat	123
4.4.2	Influence de la nature et du potentiel du substrat	125
4.5	Le mode génération-collecte	127
4.5.1	Mise en évidence de la détection électrochimique du radical anion par voltamétrie cyclique	127
4.5.2	Mise en évidence de la détection par fluorescence : influence des potentiels de la pointe et du substrat	127
4.5.3	Relation entre les deux signaux de collecte : le courant de pointe et l'intensité de fluorescence locale	130
4.6	Modélisation des modes feedbacks positif et négatif à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics	131
4.6.1	Définition de la géométrie du problème pour une distance pointe-substrat donnée	131
4.6.2	Définition de la physique du problème : équation de la diffusion, conditions aux limites et conditions initiales	131
4.6.3	Paramétrage du problème : variation de la distance pointe-substrat	133
4.6.4	Exploitation des différents profils de concentration : modélisation du taux de modulation de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat	135
4.6.5	Mise en œuvre et résultats de la modélisation	135
4.7	Conclusions et perspectives	137
5	Couplage de la microscopie de fluorescence résolue en temps avec le SECM par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome	139
5.1	Objectifs	139
5.2	Mise en œuvre expérimentale du couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps	140
5.2.1	Description du dispositif expérimental	140

5.2.2	Les différentes configurations	143
5.3	Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré	144
5.3.1	Mise en évidence expérimentale par modulation du potentiel appliqué à la pointe	145
5.3.2	Modélisation du mécanisme d'inhibition par un mécanisme d'inhibition dynamique simple	147
5.3.3	Modélisation du mécanisme d'inhibition par un couplage entre inhibition dynamique et inhibition statique	152
5.3.4	Etude de l'inhibition statique par chimie computationnelle	154
5.3.5	Discussion sur la qualité de l'évaluation de la durée de vie	161
5.4	Influence de la distance pointe-substrat dans le couplage SECM-microscopie de fluorescence	164
5.4.1	Procédure d'acquisition	166
5.4.2	Observations expérimentales	166
5.4.3	Affinage de la modélisation des courbes d'approche optique par la prise en compte de l'inhibition dynamique	168
5.5	Couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps sur substrat conducteur	175
5.6	Conclusion	178
6	Extension du couplage microscopie de fluorescence - SECM à une sonde électrofluorochrome soluble en milieu aqueux : la résorufine	183
6.1	Objectifs	183
6.2	Le système résazurine-résorufine-dihydrorésorufine	183
6.2.1	Propriétés électrochimiques et photophysiques	184
6.2.2	Exemples d'application du système résazurine-résorufine dans un couplage entre électrochimie et fluorescence	189
6.3	Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)	190
6.3.1	Le choix de la sonde	190
6.3.2	Dispositif expérimental, caractérisation électrochimique de la sonde et procédure d'acquisition	190
6.3.3	Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback négatif	193
6.3.4	Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback positif	201
6.3.5	Mode génération au substrat - collecte à la pointe et détection par fluorescence	207
6.4	Conclusion et perspectives	211
	Conclusion	215

Table des figures

1.1	Ultra-Microélectrode loin du substrat	6
1.2	Ultra-Microélectrode à proximité d'un substrat isolant	7
1.3	Ultra-Microélectrode à proximité d'un substrat conducteur	7
1.4	Courbes d'approche adimensionnelles	8
1.5	Appareillage nécessaire pour la mise en œuvre de mesures de microscopie électrochimique à balayage	9
1.6	Diagramme de Perrin-Jablonski	10
1.7	Système de filtres dans un microscope de fluorescence inversé	14
1.8	Différents modèles pour la configuration TIRF	15
1.9	Microscope confocal	16
1.10	Quelques valeurs de la constante d'inhibition dynamique k_q [96]	19
1.11	Transfert d'électron photoinduit	21
1.12	Principe de l'électrofluorochromisme entre un état éteint et un état allumé dans une dyade composée d'un fluorophore et d'une entité électroactive	23
1.13	Principe de l'électrofluorochromisme entre un état éteint et un état allumé pour des fluorophores directement électroactifs	24
1.14	Les trois isomères de la tétrazine	25
1.15	Voltamétries cycliques de quelques tétrazines	26
1.16	Spectres d'absorption de quelques tétrazines	27
1.17	Spectres d'émission de fluorescence de quelques tétrazines	28
1.18	Déclins de fluorescence de quelques tétrazines	28
1.19	Potentiel d'oxydation (E_{ox}) de divers donneurs d'électrons et constante de vitesse (k_{et}) de transferts d'électron photoinduits pour ${}^3\text{PhTz}^*$	29
1.20	Orbitales HOMO-1, HOMO, LUMO et LUMO+1 de la chlorométhoxytétrazine et de la diméthoxytétrazine	30
1.21	Energies des orbitales LUMO de différentes tétrazines en fonction de la différence de leurs potentiels standards	31
1.22	Spectroélectrochimie UV-visible et spectroélectrochimie de fluorescence dans une cellule OTTLE de la chlorométhoxytétrazine	32
1.23	Voltamétrie cyclique d'une solution de chlorométhoxytétrazine à la concentration de 1,5 M dans le dichlorométhane enregistré dans une cellule OTTLE positionnée sur un microscope de fluorescence	33
1.24	Modulation électrochimique de l'intensité de fluorescence sous l'effet de la réduction de la chlorométhoxytétrazine dans une cellule OTTLE positionnée sur un microscope de fluorescence	34
1.25	Schéma de principe d'une cellule OTTLE adaptée à la fluorescence	38
1.26	Schéma du montage du laboratoire couplant cellule électrochimique à trois électrodes et microscope de fluorescence [69]	40

1.27	Dispositif expérimental utilisé par Heinze et ses collaborateurs pour générer les gradients de pH et les observer par microscopie de fluorescence [11]	46
1.28	Dispositif expérimental utilisé par Bard et ses collaborateurs pour "écrire sur le substrat" grâce à la pointe SECM. Images que fluorescence qui en résultent. [47]	46
1.29	Principe de la détection des ROS grâce au couplage SECM -microscopie de fluorescence	47
2.1	Polymère avec tétrazine dans la chaîne	52
2.2	Polymère avec tétrazine comme groupe pendent	53
2.3	Schéma des deux monomères TBTmonoTz et TBTbisTz utilisés pour l'électropolymérisation	55
2.4	Schéma de la synthèse du monomère TBTmonoTz	55
2.5	Schéma de la synthèse du monomère TBTbisTz	56
2.6	Spectres d'absorption des deux monomères	57
2.7	Spectres d'absorption et d'émission du monomère TBTmonoTz	57
2.8	Spectres d'absorption et d'émission du monomère TBTbisTz	58
2.9	Voltamétries cycliques successives enregistrées d'abord en réduction puis en oxydation pour les deux monomères TBTmonoTz et TBTbisTz sur disque de carbone	59
2.10	Synthèse accumulative du poly(TBTmonoTz) par voltamétries cycliques successives dans une solution de TBTmonoTz sur disque de carbone	60
2.11	Synthèse accumulative du poly(TBTbisTz) par voltamétries cycliques successives dans une solution de monomère TBTbisTz sur disque de carbone	60
2.12	Synthèse d'un film de poly(TBTmonoTz) par chronoampérométrie sur une électrode de carbone	61
2.13	Synthèse d'un film de poly(TBTbisTz) par chronoampérométrie sur une électrode de carbone	62
2.14	Voltamétries cycliques d'un film de poly(TBTbisTz) en oxydation et en réduction	62
2.15	Courants de pics et de plateau enregistrés lors de l'oxydation d'un film de poly(TBTmonoTz)	63
2.16	Courants de pics en réduction enregistrés lors de l'oxydation d'un film de poly(TBTbisTz)	64
2.17	Voltamétries cycliques successives en réduction d'un film de poly(TBTmonoTz) sur une électrode de carbone	64
2.18	Voltamétries cycliques successives en réduction d'un film de poly(TBTbisTz) sur une électrode de carbone	65
2.19	Mise en évidence de la corrélation entre la charge ayant circulé lors de la formation du film de poly(TBTmonoTz) sur l'électrode d'ITO transparente et l'intensité de fluorescence moyenne du film mesurée à l'aide du microscope de fluorescence	66
2.20	Mise en évidence de la corrélation entre la charge ayant circulé lors de la formation du film de poly(TBTbisTz) sur l'électrode d'ITO transparente et l'intensité de fluorescence moyenne du film mesurée à l'aide du microscope de fluorescence	66

Table des figures

2.21	Spectres d'émission du polyTBT enregistrés au cours du temps parallèlement à la polarisation de la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz)	69
2.22	Fluorescence du polyTBT obtenue par intégration des spectres d'émission et courants enregistrés en fonction du temps parallèlement à la polarisation de la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz)	70
2.23	Spectres d'émission de la tétrazine enregistrés au cours du temps parallèlement à la polarisation de la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz)	71
2.24	Fluorescence de la tétrazine obtenue par intégration des spectres d'émission et courants enregistrés en fonction du temps parallèlement la polarisation de la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz)	72
2.25	Évolution du spectre d'émission d'un film de polymère au cours de l'électropolymérisation sur une lame d'ITO. (émission de la tétrazine)	72
3.1	La tétrazine siloxane, notée ESTZ	75
3.2	Schéma réactionnel de la synthèse d'ESTZ (notée 2) et d'une seconde tétrazine siloxane (notée 4)[58]	76
3.3	Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de la tétrazine siloxane ESTZ	77
3.4	Nanoparticules fonctionnalisées par la tétrazine siloxane ESTZ : schéma de principe et propriétés photophysiques	78
3.5	Nanoparticules fonctionnalisées par des tétrazines et des naphthalimides : fluorescence blanche	79
3.6	Voltamétrie cyclique de la ESTZ sur disque de platine	80
3.7	Voltamétrie cyclique de la ESTZ sur lame d'ITO	80
3.8	Procédure pour le dépôt de la tétrazine siloxane sur les électrodes fonctionnalisées par les nanoparticules de dioxyde de titane et dispositif expérimental pour l'étude de l'électrofluorochromisme	82
3.9	Electrofluorochromisme du dispositif à base de nanoparticules de TiO ₂ fonctionnalisées par ESTZ	83
3.10	Greffage de la molécule ESTZ sur des lames d'ITO activé en présence d'un catalyseur acide	84
3.11	Modulation de l'émission de fluorescence de la monocouche de tétrazine par polarisation du substrat	84
3.12	Protocole de greffage de la monocouche de tétrazines sur les lames d'ITO	85
3.13	Spectres IR-ATR de la molécule liquide ESTZ pure, de la molécule liquide ESTZ après hydrolyse en présence d'acide acétique et de la lame d'ITO après protocole de greffage	86
3.14	Voltamétrie cyclique. Electrode de travail : lame d'ITO greffée	87
3.15	Spectre d'émission d'un échantillon ITO-monocoucheTz enregistré avec le microscope de fluorescence	88
3.16	Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de l'électrofluorochromisme des lames d'ITO fonctionnalisées	89
3.17	Sélection d'images enregistrées avec la caméra CCD en émission parallèlement à la modulation du substrat fonctionnalisé par la monocouche	90

3.18	Chronofluorogramme enregistré parallèlement à la modulation du potentiel appliqué à l'ITO fonctionnalisé, corrigé du "blanc", du blanchiment et normalisé	91
3.19	Evolution de l'intensité de fluorescence mesurée parallèlement à la modulation du potentiel d'échantillons "blancs"	92
3.20	Spectres bruts enregistrés avec le spectrophotomètre lors de la modulation électrochimique du potentiel d'une lame de verre recouverte d'ITO traité avec la tétrazine ESTZ	93
3.21	Spectres bruts enregistrés avec le spectrophotomètre lors de la modulation électrochimique du potentiel d'une lame de verre recouverte d'ITO "blanc"	93
3.22	Spectres bruts de la Figure 3.20 auxquels a été soustrait un spectre "blanc" correspondant à un spectre de la même cinétique enregistré lorsque l'échantillon est polarisé pour la troisième et dernière fois à -0,65 V	95
3.23	Chronofluorogramme obtenu par intégration des spectres (préalablement soustraits du blanc) enregistrés parallèlement à la modulation du potentiel du substrat fonctionnalisé	96
3.24	Chronofluorogramme enregistré parallèlement à la modulation du potentiel d'une lame d'ITO fonctionnalisée, cycles d'extinction-rallumage de 15 secondes, corrigé du "blanc" et du blanchiment et normalisé.	98
3.25	Chronofluorogramme obtenu par intégration des spectres d'émission préalablement corrigés du blanc parallèlement à la modulation du potentiel du substrat fonctionnalisé, trois cycles de réduction successifs à potentiel décroissant	99
3.26	Voltamétrie cyclique d'un échantillon d'ITO traité avec la tétrazine en présence d'une concentration en acide acétique 100 fois plus faible, 1 cycle	100
3.27	Voltamétrie cyclique d'un échantillon d'ITO traité avec la tétrazine en présence d'une concentration en acide acétique 100 fois plus faible, 4 cycles	100
3.28	Sélections d'images auxquelles une image "blanc" a été soustraite enregistrées avec la caméra CCD parallèlement à la modulation du potentiel d'une lame d'ITO fonctionnalisée et chronofluorogramme correspondant	102
3.29	Spectres bruts soustraits d'un spectre "blanc" enregistrés parallèlement à la polarisation du substrat fonctionnalisé en présence d'une concentration en acide 100 fois plus faible	103
3.30	Même expérience que celle reportée sur la Figure 3.25 pour un échantillon fonctionnalisé en présence d'acide à une concentration 100 fois plus faible	104
4.1	Schéma de principe du couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique à balayage par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome en mode feedback	107
4.2	Schéma de principe du couplage de la microscopie de fluorescence avec la microscopie électrochimique à balayage par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome en mode génération au substrat - collecte à la pointe	109

Table des figures

4.3	Schéma de principe lors de l'utilisation de la chlorométhoxytrérazine en tant que sonde électrofluorochrome	109
4.4	Photo du dispositif couplant microscope électrochimique à balayage avec microscope de fluorescence	110
4.5	Photo de la cuve sur le couplage SECM -microscopie de fluorescence	111
4.6	Schéma du dispositif couplant un microscope électrochimique à balayage et un microscope de fluorescence par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome.	112
4.7	Voltamétries cycliques enregistrées avec la chlorométhoxytrérazine sur la pointe, sur un substrat ITO et sur un substrat ITO recouvert avec une couche d'or	113
4.8	Image en réflexion de la pointe et délimitation de la région d'intérêt (ROI)	115
4.9	Sélection d'une série d'images de la pointe enregistrées avec la caméra CCD lorsque son potentiel varie	116
4.10	Modulation de l'intensité de fluorescence par variation du potentiel de la pointe et de la distance pointe-substrat en mode feedback négatif	117
4.11	Intensité de fluorescence, émise par la solution de tétrazine et collectée dans la ROI, en fonction de la position de la pointe	119
4.12	Courant de pointe mesurés pour plusieurs distances pointe-substrat	120
4.13	Evolution du spectre d'émission sous l'effet de la variation du potentiel de pointe, pour différentes hauteurs par rapport au substrat de verre	121
4.14	Modulation de l'intensité de fluorescence en fonction du potentiel de la pointe et de la distance pointe-substrat dans le mode feedback positif	124
4.15	Variation du taux de modulation normalisé de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat pour différents potentiels appliqués au substrat ITO	126
4.16	Voltamétrie cyclique sur la pointe enregistrée pour deux potentiels du substrat (0 V et -0,8 V).	128
4.17	Sélection d'images de fluorescence montrant sa modulation sous l'effet de la polarisation de la pointe (potentiel du substrat -0,8 V)	129
4.18	Variation de l'intensité de fluorescence et du courant enregistré à la pointe sous l'effet de la variation de potentiel appliqué à la pointe en fonction du temps en mode génération-collecte	130
4.19	Géométrie du problème pour la modélisation du couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique à balayage définie dans le logiciel de simulation	132
4.20	Maillage utilisé lors de la simulation pour une distance pointe-substrat de 40 μm	133
4.21	Zoom sur le maillage au niveau de la pointe et de l'axe de symétrie	134
4.22	Représentation des champs de concentration calculés par Comsol en configuration "feedback" négatif pour trois distances pointe-substrat	134
4.23	Taux de modulation simulés, en fonction de la distance pointe-substrat	136
5.1	Dispositif expérimental du couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique à balayage adapté à des mesures de fluorescence résolues en temps	141

5.2	Evolution au cours du temps des courants de pointe, de l'intensité de fluorescence et de la durée de vie de fluorescence sous l'effet de la modulation du potentiel de pointe	146
5.3	Rapports I_0/I et τ_0/τ en fonction de la charge et modélisation	151
5.4	Géométries des complexes Tz-Tz optimisées	155
5.5	Orbitales moléculaires du dimère Tz – Tz, composé de deux tétrazines neutres	157
5.6	Diagramme énergétique des orbitales moléculaires du complexe Tz – Tz neutre	157
5.7	Géométries des complexes Tz – Tz ^{•-} optimisées	158
5.8	Orbitales moléculaires du dimère Tz – Tz ^{•-} , composé d'une tétrazine neutre et d'un radical anion	160
5.9	Densité de spin (APFD/6-311+g(d,p)) du dimère [Tz – Tz ^{•-}] ⁻	160
5.10	Diagramme énergétique des orbitales moléculaires du complexe Tz – Tz ^{•-}	161
5.11	Déclins de fluorescence enregistrés pour différentes valeurs de potentiel appliqué à la pointe en réduction	162
5.12	Carte des résidus pondérés calculés au cours de chaque déclin pour les différentes valeurs de potentiel de réduction appliqués à la pointe.	163
5.13	Valeur du $\chi^2_{\text{réduit}}$ calculée pour chaque déclin selon la valeur du potentiel de réduction appliqué à la pointe	164
5.14	Représentation des durées de vie obtenues pour les différentes valeurs du potentiel en réduction par les deux méthodes d'évaluation considérées : la valeur moyenne et l'ajustement numérique des déclins	165
5.15	Rapports des durées de vie $\frac{\tau_0}{\tau}$ obtenues pour les différents potentiels de réduction appliqués à la pointe calculés par valeur moyenne et par ajustement numérique des déclins	165
5.16	Évolution au cours du temps de l'intensité de fluorescence et de la durée de vie de fluorescence sous l'effet de la modulation du potentiel de pointe pour différentes distances pointe-substrat	167
5.17	Taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisés simulés en fonction de la distance pointe-substrat pour différentes valeurs de la constante d'inhibition dynamique	172
5.18	Taux de modulation normalisés de la durée de vie de fluorescence simulés en fonction de la distance pointe-substrat pour différentes valeurs de la constante d'inhibition dynamique	174
5.19	Evolution au cours du temps des courants de pointe, de l'intensité de fluorescence et de la durée de vie de fluorescence sous l'effet de la polarisation de la pointe, à différents potentiels de réduction. Substrat : ITO à son potentiel de court circuit	176
5.20	Evolution au cours du temps des courants de pointe, de l'intensité de fluorescence et de la durée de vie de fluorescence sous l'effet de la polarisation de la pointe, à différents potentiels de réduction. Substrat : ITO polarisé à -0,23 V	177
5.21	Rapports $\frac{\tau_0}{\tau}$, $\frac{I_0}{I}$ et $\frac{I_0}{I}$ sur $\frac{\tau_0}{\tau}$ en fonction de la charge coulombienne enregistrés sur ITO à différents potentiels : non polarisé et -0,23 V	179
6.1	Structure des molécules résazurine, résorufine et dihydrorésorufine	184
6.2	Voltamétrie cyclique de la résorufine et de la résazurine enregistrées sur électrode d'or polycristalline	185

Table des figures

6.3	Spectroélectrochimie d'absorption de la résorufine et de la résazurine	187
6.4	Spectroélectrochimie d'émission de fluorescence de la résorufine et de la résazurine	188
6.5	Système électrofluorochrome basé sur la conversion réversible de la résorufine fluorescente en dihydrorésorufine non fluorescente en milieu tamponné.	191
6.6	Voltamétries cycliques de la résorufine sur ITO et sur microélectrode de platine	192
6.7	Sélection d'images de la pointe enregistrées en émission avec la caméra CCD parallèlement à la modulation de son potentiel	193
6.8	Comparaison des courbes d'approches électrochimiques expérimentale et simulée	194
6.9	Image de la pointe en réflexion et délimitation des ROI	195
6.10	Évolution de l'intensité de fluorescence au cours de temps sous l'effet de la modulation du potentiel de pointe, pour différentes positions de la pointe	196
6.11	Évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat en l'absence de réaction électrochimique pour deux concentrations différentes en résorufine	197
6.12	Évolution des spectres d'émission de la résorufine au cours du temps sous l'effet de la modulation du potentiel de pointe	199
6.13	Comparaison des taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisés en fonction de la distance pointe-substrat obtenus avec la caméra (pour différentes tailles de ROI) et avec le spectromètre	200
6.14	Évolution de l'intensité de fluorescence au cours de temps sous l'effet de la modulation du potentiel de pointe, pour différentes positions de la pointe, en mode feedback positif	202
6.15	Pour différentes positions de la pointe, potentiel de l'ITO mesuré en circuit ouvert lors de la modulation du potentiel de pointe	204
6.16	Comparaison des courants de pointe et des taux de modulation de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat sur trois types de substrat : verre, ITO au potentiel de circuit ouvert et ITO polarisé à -0,5 V	206
6.17	Courants de pointe enregistrés pour différentes positions de la pointe lors qu'elle est polarisée à -0,7 V dans les trois configurations : substrat isolant, ITO à son potentiel de circuit ouvert, ITO polarisé à -0,5 V	207
6.18	Sélection d'images de la pointe enregistrées avec la caméra CCD quand son potentiel varie dans la configuration génération-collecte. Substrat : ITO polarisé à -0,85 V.	208
6.19	Intensités de fluorescence et courants traversant l'Ultra-MicroElectrode enregistrés parallèlement à la modulation du potentiel de la pointe en mode génération-collecte, pour différentes positions de la pointe	209
6.20	Distance pointe-substrat en fonction de la racine carré du temps au bout duquel l'intensité de fluorescence chute suite à la polarisation négative du substrat	211
6.21	Intensités de fluorescence enregistrées avant polarisation de l'ITO I_{max} et pendant la période de collecte $I_{collecte}$ et ratio $I_{collecte}/I_{max}$ en fonction de la distance pointe-substrat	212

Liste des tableaux

1.1	Résumé de l'influence de l'inhibition statique seule, de l'inhibition dynamique seule et de celle des deux combinées sur les grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence	20
1.2	Potentiels de réduction de demi-vague de quelques s-tétrazines dans le dichlorométhane	26
2.1	Rendements quantiques calculés pour les monomères TBTmonoTz et TBTbisTz lorsqu'ils sont excités à 360 nm (excitation du TBT) et à 520 nm (excitation de la tétrazine)	58
3.1	Résumé des caractéristiques photophysiques et électrochimiques d'ESTZ [60]	81
5.1	Signal en potentiel appliqué à la pointe du microscope électrochimique, x varie de -0,45 V à -0,80 V, sur substrat isolant	145
5.2	Résultat des ajustements numériques pour la détermination de la constante d'inhibition statique K_S : modèle utilisé, valeurs déterminées pour les paramètres d'ajustement a'' et b'' , calcul de K_S et r^2 ou χ^2	154
5.3	Pour chaque géométrie optimisée de la Figure 5.4, valeur de l'angle formé par l'intersection des deux plans contenant chacun un des membres du dimère $[Tz - Tz]$	155
5.4	Energies calculées pour le dimère $[Tz - Tz]$ à partir de géométries préalablement optimisées avec trois fonctionnelles différentes : B3LYP, wb97xd et APFD dans la base 6-311+g(d,p).	156
5.5	Énergies de complexation du dimère $[Tz - Tz]$ composé de deux tétrazines neutres en kcal/mol évaluées à l'aide des trois fonctionnelles B3LYP, wb97xd et APFD	156
5.6	Pour chaque géométrie optimisée de la Figure 5.7, valeur de l'angle formé par l'intersection des deux plans contenant chacun un des membres du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^-$	158
5.7	Énergies calculées pour le dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^-$ à partir de géométries préalablement optimisées avec trois fonctionnelles différentes : B3LYP, wb97xd et APFD dans la base 6-311+g(d,p).	158
5.8	Énergies de complexation du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^-$ composé de deux tétrazines neutres en kcal/mol évaluées à l'aide des trois fonctionnelles B3LYP, wb97xd et APFD	159
5.9	Résultats des ajustements numériques des déclins obtenus pour chaque potentiel de pointe appliqué à la réduction	163
5.10	Signal en potentiel appliqué à la pointe du microscope électrochimique, x varie de -0,45 V à -0,80 V, sur substrat isolant	175

5.11 Résultat des ajustements numériques d'une fonction affine de la forme $y = a + bx$ sur la représentation graphique des rapports $\frac{I_0}{I}$ expérimentaux en fonction de la charge mesurés sur les trois substrats : isolant, ITO PCO et ITO polarisé à -0,23 V 178

5.12 Résultat des ajustements numériques d'une fonction affine de la forme $y = a + bx$ sur la représentation graphique des rapports $\frac{I_0}{I}$ et $\frac{I_0}{I_0}$ expérimentaux en fonction de la charge mesurés sur ITO à son potentiel de circuit ouvert 179

5.13 Résultat des ajustements numériques d'une fonction affine de la forme $y = a + bx$ sur la représentation graphique des rapports $\frac{I_0}{I}$ et $\frac{I_0}{I_0}$ expérimentaux en fonction de la charge mesuré sur ITO polarisé à -0,23 V 180

Liste des abréviations

UME

UltraMicroÉlectrode

SECM

Scanning Electrochemical Microscopy (microscopie électrochimique à balayage et, par extension, le microscope utilisé dans cette méthode)

TG/SC

Tip Generation / Substrate Collection (génération à la pointe / collecte au substrat)

SG/TC

Substrate Generation / Tip Collection (génération au substrat / collecte à la pointe)

TIRF

Total Internal Reflection Fluorescence (microscope à onde évanescente)

DFT

Density Functional Theory

TD-DFT

Time-Dependent Density Functional Theory

UV-vis

Ultraviolet Violet - Visible

OTTLE

Optically Transparent Thin Layer Electrochemical (électrochimique à couche minces optiquement transparente)

TBAH

TetraButylAmmonium Hydroxide (Hydroxyde de tétrabutylammonium)

ITO

Indium Tin Oxide (oxyde d'indium-étain)

CCD

Charge-Coupled Device (dispositif à transfert de charges)

ROS

Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)

CV

Cyclic Voltammetry (voltamétrie cyclique)

ROI

Region Of Interest (région d'intérêt, cf Figure 4.8)

PCO

Potentiel de Circuit Ouvert

Introduction

L'électrofluorochromisme est l'étude de la modulation de la fluorescence par contrôle électrochimique.

Un système moléculaire est électrofluorochrome s'il est stable sous plusieurs degrés d'oxydation et que ses propriétés d'émission diffèrent d'un degré d'oxydation à l'autre. Typiquement, si le système émet à un certain degré d'oxydation et n'émet pas à un autre, le contrôle électrochimique de son degré d'oxydation va permettre d'éteindre ou d'allumer, de manière réversible, la fluorescence du système.

Pour être électrofluorochrome, un système moléculaire doit donc posséder une entité électroactive et un fluorophore. Ces entités peuvent être distinctes : on parle alors de dyades et d'électrofluorochromisme indirect. Elles peuvent aussi être confondues : on parle alors d'électrofluorochromisme direct. C'est par exemple le cas des tétrazines qui sont des composés organiques fluorescents et qui peuvent être réduits réversiblement en un radical anion n'émettant pas de fluorescence.

L'étude de l'électrofluorochromisme peut prendre plusieurs formes :

- la synthèse de nouveaux systèmes moléculaires électrofluorochromes et l'étude de cette propriété en solution ;
- le développement de l'électrofluorochromisme solide avec la préparation de matériaux ou d'électrodes modifiées électrofluorochromes ;
- le développement de dispositifs expérimentaux permettant l'observation et/ou le contrôle spatialement et temporellement résolu des données optiques (la fluorescence) et électrochimiques.

Ces deux derniers aspects font l'objet du travail présenté dans ce document.

Dans le premier chapitre, les concepts mobilisés par les travaux rapportés dans la suite du manuscrit sont présentés. Les notions propres à l'électrochimie et à la fluorescence sont donc développées, mais également celles liées à leur couplage : l'électrofluorochromisme y est notamment défini. La pertinence de coupler les techniques d'électrochimie et de fluorescence y est discutée à partir d'exemples tirés de la littérature.

Les deux chapitres suivants regroupent les travaux effectués dans le cadre de cette thèse pour le développement d'électrodes transparentes modifiées électrofluorochromes. Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de l'électrofluorochromisme de films de polymères incorporant des unités tétrazines déposés sur des électrodes d'ITO. La synthèse et l'étude des propriétés photophysiques des monomères y sont décrites ainsi que l'électropolymérisation et l'étude de l'électrofluorochromisme des films de polymères obtenus. Cette dernière propriété y est ainsi mise en évidence. Elle est expliquée par le contrôle électrochimique du transfert d'électrons photoinduit entre la chaîne de polymère et les unités tétrazines.

Le troisième chapitre, quant à lui, décrit la préparation et la caractérisation d'électrodes d'ITO transparentes fonctionnalisées par des monocouches de tétrazines siloxanes, ainsi que l'étude de l'électrofluorochromisme de ces électrodes. Dans ce cas

également, la modulation de la fluorescence est observée sous l'effet de la polarisation de l'électrode modifiée; son amplitude est corrélée à la valeur du potentiel imposée à l'électrode. Les difficultés concernant la détection de la fluorescence de la monocouche et son blanchiment sont également discutées dans ce chapitre.

Dans les chapitres 2 et 3, la propriété d'électrofluorochromisme des électrodes modifiées est étudiée grâce à l'utilisation d'un dispositif expérimental, précédemment mis en place au laboratoire, couplant une cellule électrochimique à trois électrodes avec un microscope de fluorescence. La microscopie de fluorescence apporte un gain de résolution spatiale. Du point de vue de l'électrochimie, ce gain peut venir de l'utilisation d'un microscope électrochimique à balayage. Les trois derniers chapitres sont donc consacrés au développement de ce dispositif expérimental couplant la microscopie électrochimique à balayage à la microscopie de fluorescence. Un tel couplage est permis par l'utilisation d'une unique sonde à la fois électroactive et fluorescente (électrofluorochrome). Le dispositif décrit dans ces chapitres permet à la fois de contrôler les potentiels appliqués à une ultramicroélectrode et à un substrat transparent, d'enregistrer les courants qui découlent d'éventuelles réactions électrochimiques, d'imager les inhomogénéités de fluorescence ainsi générées, d'enregistrer des spectres d'émission marqueurs des espèces électrogénérées.

Tout d'abord, dans le chapitre 4, la démonstration de principe est faite avec la chlorométhoxytétrazine en tant que sonde électrofluorochrome. Il est montré que la modulation de la fluorescence peut être utilisée en guise de courbe d'approche optique puisque l'intensité de cette modulation dépend de la nature conductrice ou isolante du substrat en mode feedback. De plus, la courbe d'approche obtenue est plus sensible à la proximité du substrat que ne l'est le courant électrochimique dans une configuration de microscopie électrochimique classique. En mode génération-collecte, les espèces non émettrices générées au substrat peuvent être détectées à la caméra par la formation, à la pointe du microscope, de l'espèce émettrice. Enfin, nous présentons une utilisation de la méthode des éléments finis pour modéliser ce couplage de microscopies. Dans cette modélisation, seuls sont décrits les aspects diffusionnels. Une telle modélisation permet notamment de rendre compte de la différence de comportement entre substrat conducteur et substrat isolant.

Dans le chapitre 5, la technique de couplage est étendue à la microscopie de fluorescence résolue en temps toujours par l'utilisation de la chlorométhoxytétrazine en tant que sonde électrofluorochrome. Le dispositif ainsi modifié permet l'enregistrement de déclins de fluorescence et de durées de vie moyennes. Ces mesures constituent un complément d'informations utilisé, en guise d'exemple dans le cas de la chlorométhoxytétrazine, pour étudier le mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la sonde par le radical anion électrogénéré. La prise en compte de ces phénomènes dans la modélisation des courbes d'approche optiques fournit une explication à leur bonne sensibilité constatée expérimentalement dans le chapitre précédent.

Enfin, en vue d'éventuelles applications à l'étude de systèmes biologiques, une extension de principe aux milieux aqueux est proposée. A cette fin, la chlorométhoxytétrazine est remplacée par la résorufine, colorant organique électrofluorochrome soluble dans l'eau. L'étude est faite dans les différentes configurations : "feedback" négatif, "feedback" positif et "génération au substrat - collecte à la pointe". Dans ce cas également, des courbes d'approche optiques ont pu être enregistrées. Les différences de comportement entre les deux sondes sont soulignées.

Chapitre 1

L'électrofluorochromisme : principe, systèmes moléculaires et instrumentation

1.1 Introduction

Un système électrofluorochrome est un système dont on peut moduler les propriétés d'émission de fluorescence par contrôle électrochimique. Cette notion est à la croisée entre deux disciplines : l'électrochimie et la photophysique. En particulier, le travail décrit dans ce manuscrit s'articule selon deux axes :

- la préparation et la caractérisation d'électrodes modifiées électrofluorochromes (chapitres 2 et 3),
- le développement du couplage entre microscopie électrochimique à balayage et microscopie de fluorescence par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome (chapitres 4, 5 et 6).

Ainsi, dans ce chapitre, quelques notions propres à chacun des domaines que sont l'électrochimie et la fluorescence sont rappelées respectivement en 1.2 et en 1.3. En particulier, le principe général de la mesure avec un microscope électrochimique à balayage (SECM) est décrit, de même que celui du microscope de fluorescence dans ses différentes configurations d'éclairage.

La suite du chapitre s'articule autour du couplage entre ces deux disciplines. Ainsi, la notion de système électrofluorochrome est définie avec plus de précision dans la section 1.4. Puis, différentes applications de ces systèmes proposées dans la littérature sont décrites dans la partie 1.5. L'accent est mis sur les enjeux et les difficultés du développement de l'électrofluorochromisme solide et des électrodes modifiées électrofluorochromes.

L'étude de ces systèmes électrofluorochromes nécessite par ailleurs le développement de dispositifs expérimentaux permettant de collecter les deux types de signaux : électrochimique et de fluorescence. Cependant, le champ d'applications d'un tel dispositif n'est pas limité à l'étude des systèmes électrofluorochromes. Il peut également se rendre utile dans l'étude de phénomènes biologiques, de diffusion, etc. Dans ce cas, un système électrofluorochrome peut par contre faire office de sonde. Dans la partie 1.6 sont discutées les différentes situations dans lesquelles la mise en œuvre d'un tel dispositif peut se révéler effectivement pertinente et les choix que l'expérimentateur doit faire pour obtenir une résolution adaptée au phénomène sondé. L'acquisition de cette résolution peut passer par l'utilisation du microscope de fluorescence et/ou du microscope électrochimique à balayage.

1.2 L'électrochimie : principe et technique de microscopie

1.2.1 Notion de couche de diffusion

Considérons un montage à trois électrodes immergées dans une solution contenant par exemple l'oxydant d'un couple redox. Supposons qu'on applique un potentiel tel que la réaction de réduction puisse avoir lieu à l'électrode de travail. Elle va entraîner la consommation de l'espèce à proximité de cette électrode et l'apparition d'un gradient de concentration. L'espèce réactive est transportée du cœur de la solution vers l'électrode.

Lorsque la vitesse de transfert d'électrons est grande devant celle du transport, le régime est dit de diffusion pure. L'espèce électroactive est consommée dès qu'elle arrive à l'interface, la concentration de l'espèce réactive est nulle à l'électrode. L'expression du courant s'obtient par résolution des lois de Fick.

En régime permanent, l'épaisseur de la couche de diffusion δ est constante. En supposant un profil de concentration linéaire au voisinage de l'électrode (cas des électrodes planes), l'intensité du courant est donnée par :

$$i = \frac{nFADC}{\delta} \quad (1.1)$$

Avec i le courant, n le nombre d'électrons échangé, F la constante de Faraday, A l'aire de l'électrode, D le coefficient de diffusion, C la concentration au cœur de la solution (égale à la concentration initiale).

En régime transitoire (par exemple en chronoampérométrie), l'épaisseur de la couche de diffusion augmente au cours du temps. Dans ce cas, la réponse en courant, en fonction du temps t s'exprime pour l'électrode plane :

$$i(t) = \frac{nFADC}{\sqrt{\pi Dt}} \quad (1.2)$$

En comparant les équations 1.2 et 1.1, il apparaît que l'épaisseur de la couche de diffusion admet pour expression, en régime transitoire, $\sqrt{\pi Dt}$. La baisse du courant au cours du temps s'explique donc par le transport des espèces réactives au travers d'une couche de diffusion dont l'épaisseur augmente avec le temps.

Ainsi, la réaction électrochimique se joue au niveau de la couche de diffusion de l'électrode de travail. Dans le cadre d'un couplage entre fluorescence et électrochimie, il faut soit attendre suffisamment longtemps que l'électrolyse soit complète, soit focaliser la détection de fluorescence au niveau de cette couche de diffusion.

1.2.2 Les Ultra-MicroElectrodes - UME

Les ultramicroélectrodes sont des électrodes dont le diamètre est compris entre quelques nanomètres et quelques dizaines de micromètres. [68] [33]

L'un des avantages des ultramicroélectrodes est d'obtenir un régime de diffusion stationnaire sans qu'il soit nécessaire d'imposer de la convection au système électrochimique. Pour comprendre cela, considérons par exemple une électrode sphérique de rayon r_0 placée dans une solution contenant un électrolyte support, une sonde redox sous sa forme oxydée Ox à la concentration C_{Ox}^S ainsi qu'une électrode de référence et une contre électrode. On applique à l'électrode considérée un saut de potentiel de valeur suffisamment faible par rapport au potentiel du couple Ox/Red . La réduction de la forme oxydée se produit, ce qui se traduit par l'apparition d'un

1.2. L'électrochimie : principe et technique de microscopie

gradient de concentration de la forme Ox à la surface de l'électrode et par un courant cathodique à travers l'électrode sphérique.

La forme du gradient de concentration autour de la sonde redox est donnée par résolution de la seconde loi de Fick en coordonnées sphériques :

$$D \left[\frac{\partial^2 C_{Ox}(r, t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_{Ox}(r, t)}{\partial r} \right] = - \frac{\partial C_{Ox}(r, t)}{\partial t} \quad (1.3)$$

Avec les conditions aux limites suivantes :

$$C_{Ox}(r \rightarrow \infty, t) = C_{Ox}^S \quad (1.4)$$

$$C_{Ox}(r = r_0, t > 0) = 0 \quad (1.5)$$

Et la condition initiale :

$$C_{Ox}(r, t = 0) = C_{Ox}^S \quad (1.6)$$

Par des transformées de Laplace, on obtient l'expression du flux de la sonde redox à la surface de l'électrode $J(t)$ et celle du courant associé $i(t)$:

$$J_{Ox}(r_0, t) = -D(C_{Ox}^S - C_{Ox}^{el}) \left[\frac{1}{\sqrt{\pi D t}} + \frac{1}{r_0} \right] \quad (1.7)$$

$$i(t) = -nFAJ_{Ox}(r_0, t) = 4\pi n r_0^2 F D (C_{Ox}^S - C_{Ox}^{el}) \left[\frac{1}{\sqrt{\pi D t}} + \frac{1}{r_0} \right] \quad (1.8)$$

Avec C_{Ox}^{el} et C_{Ox}^S les concentrations en oxydant respectivement à l'électrode et dans la solution, D son coefficient de diffusion, n le nombre d'électrons impliqués dans la réaction aux électrodes, F la constante de Faraday et r_0 le rayon de l'UME.

D'après l'équation 1.8, le courant $i(t)$ est la somme de deux termes :

- Le premier, analogue à l'expression en diffusion plane semi-infinie, dépend du temps en $\frac{1}{t^{\frac{1}{2}}}$.
- Le second, indépendant du temps, est dû à la diffusion hémisphérique.

La forme de la réponse électrochimique est modulée par l'importance relative de ces deux termes et dépend donc de l'échelle de temps de la mesure. Ainsi, le premier terme domine aux temps courts et correspond donc à un régime transitoire. Il devient négligeable aux temps longs devant le second qui correspond à un état stationnaire de diffusion :

$$i_{P\infty}^{spherique} = 4\pi n F D r_0 C_{Ox}^S \quad (1.9)$$

Les notions relatives de temps courts et temps longs peuvent être précisées par l'utilisation d'un paramètre adimensionné construit comme le rapport entre les contributions transitoire et stationnaire du courant. Par exemple, pour une valeur typique de D de $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ en solution aqueuse et une électrode de 5 mm de rayon, il faut plus de 80 s pour que le terme correspondant au régime stationnaire soit dix fois plus important que celui correspondant au régime transitoire. Il ne faut plus que 80 μs pour une électrode de 5 μm .

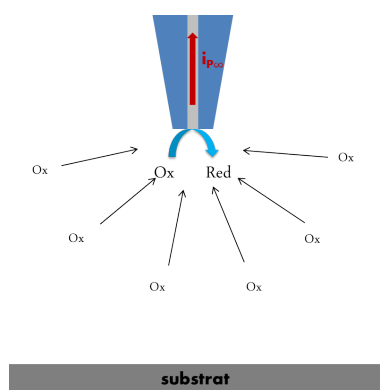


FIGURE 1.1 – Ultra-Microélectrode loin du substrat. Régime stationnaire de diffusion. La valeur du courant est donnée par i_p .

Dans le cas d'une UME à disque, ce qui correspond à la géométrie la plus courante (voir Figure 1.1), on obtient une valeur analogue de $i_{p\infty}$ à un facteur π près :

$$i_{p\infty}^{disque} = 4nFDr_0C_{Ox}^S \quad (1.10)$$

En microscopie électrochimique, c'est la perturbation de ce courant de pointe en régime stationnaire par la proximité d'une surface dans la couche de diffusion hémisphérique de la pointe qui constitue la réponse SECM. [48] [7]

1.2.3 Le microscope électrochimique à balayage (SECM)

À l'échelle locale, les propriétés électrochimiques et topographiques d'un échantillon sont accessibles à l'aide de la microscopie électrochimique (ou SECM) grâce à l'utilisation d'une microélectrode en tant que sonde. La microscopie électrochimique offre la possibilité d'imager la réactivité électrochimique d'échantillons de différentes natures ou encore d'en modifier localement les propriétés. La surface de l'échantillon est examinée par balayage de la microélectrode. Par analogie avec les autres microscopies AFM et STM, l'ultramicroélectrode est également appelée pointe même si la plupart des UME utilisées en SECM ont une géométrie disque plan. Contrairement à ces autres techniques, la microscopie électrochimique se mène en solution puisqu'elle utilise la réactivité électrochimique d'un médiateur redox entre la pointe et l'échantillon.[32] [8]

Principe de la mesure SECM

Si la pointe se trouve à proximité d'une surface isolante (voir Figure 1.2), le courant correspondant au nouvel état stationnaire i_p diminue par rapport à $i_{p\infty}$ parce que la présence de la surface gêne la diffusion de Ox à la surface de la pointe. Plus la pointe est proche de la surface, plus i_p est faible. Ce dernier tend à s'annuler à son contact. On parle de "feedback négatif". Au contraire, si la pointe se trouve à proximité d'une surface conductrice dont le potentiel est suffisamment haut pour réoxyder Red en Ox (voir Figure 1.3), le courant i_p correspondant est plus élevé que $i_{p\infty}$ car le flux en espèce Ox à la pointe – du fait de la réoxydation – s'en trouve augmenté. Ainsi, i_p est d'autant plus important que la distance à la surface d est faible. C'est le "feedback positif".

1.2. L'électrochimie : principe et technique de microscopie

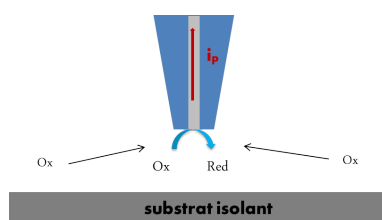


FIGURE 1.2 – Ultra-Microélectrode à proximité du substrat qui est isolant. La diffusion de la sonde redox vers la pointe est gênée par ce dernier. La valeur du courant mesuré est inférieure à i_p .

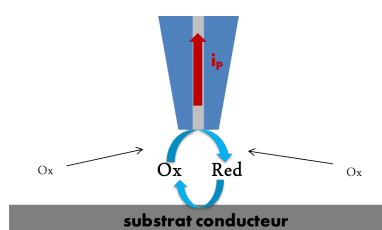


FIGURE 1.3 – Ultra-Microélectrode à proximité du substrat qui est conducteur. La sonde redox y est régénérée. On parle de rétroaction du substrat. La valeur du courant mesuré est supérieure à i_p .

Dans la suite sont détaillés les différents modes de fonctionnement du SECM.

Le mode "feedback" et les courbes d'approche

Utiliser le SECM en mode "feedback", c'est-à-dire en enregistrant le courant de pointe i_p lorsqu'on fait varier la distance pointe-substrat, permet de tracer des courbes dites "d'approche". L'allure générale de ces courbes selon que le "feedback" soit positif ou négatif est donnée Figure 1.4. Les deux cas de "feedback positif" et "feedback négatif" précédemment décrits sont en réalité des cas limites correspondant à des substrats idéaux : on parle respectivement d'isolant parfait pour lequel le réducteur formé à la pointe n'est pas du tout reconverti en oxydant et de conducteur parfait pour lequel le transfert d'électron est suffisamment rapide pour que la réaction de réoxydation soit contrôlée par la diffusion. Dans la plupart des cas expérimentaux, le comportement observé se situe entre ces deux cas limites.

Par leur corrélation avec des équations analytiques, les courbes d'approche apportent donc une information sur la cinétique du processus de transfert de charge au niveau de la surface de l'échantillon. Elles permettent également d'obtenir une valeur très précise de la distance pointe-substrat, information souvent nécessaire préalablement à la mise en œuvre d'autres manipulations. De plus, elles peuvent s'avérer très utiles pour la caractérisation géométrique des pointes. Les courbes d'approche électrochimiques ont été modélisées par différentes équipes, notamment par Cornut et Lefrou.[24] [22] [23]

Les courbes d'approche sont la plupart du temps utilisées pour positionner la pointe à une distance connue préalablement à l'utilisation du microscope, par exemple, en mode génération-collecte ou en imagerie.

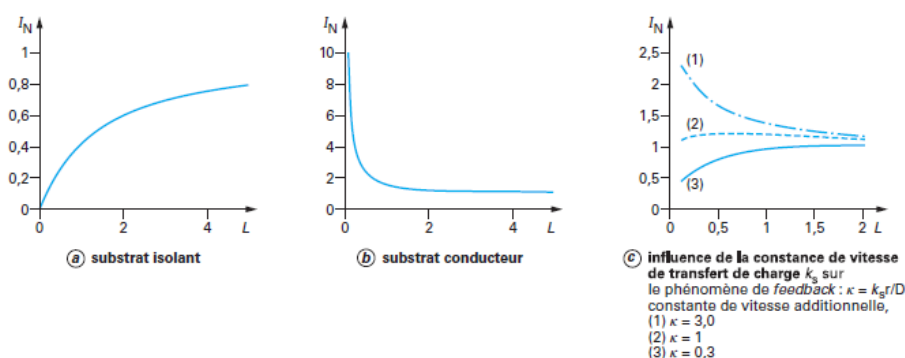


FIGURE 1.4 – Courbes d’approche adimensionnelles : courant adimensionnel mesuré à la sonde en fonction de la distance adimensionnelle UME/substrat.[8]

Le mode génération-collecte

Le mode génération-collecte présente deux modes de fonctionnement :

- Le mode “génération à la pointe / collecte au substrat” (TG/SC) : la sonde est portée à un potentiel tel qu’une espèce électroactive y est générée tandis que le substrat est placé à un potentiel tel que cette espèce soit détectable.
- Le mode “génération au substrat / collecte à la pointe” (SG/TC) : le rôle des deux électrodes est inversé. Le substrat génère l’espèce électroactive et la sonde la collecte. Ce dernier mode permet par exemple d’étudier les profils de concentration dans la couche de diffusion d’un échantillon macroscopique. La sonde (l’UME) détecte les variations de courant i_p qui reflètent les variations de concentration locale en espèce électroactive.

L’imagerie

Jusqu’ici, seul un déplacement vertical de la pointe a été envisagé. Or, le fait que le courant mesuré i_p dépende non seulement de la distance au substrat mais également de la nature chimique du substrat fait du SECM une technique particulièrement intéressante pour imager chimiquement une surface par un déplacement latéral de l’UME. Le choix de médiateurs redox différents va permettre au chimiste de "voir" le substrat en termes d’interactions chimiques. Généralement, les expériences d’imagerie sont précédées par l’enregistrement de courbes d’approche afin de positionner la pointe à la hauteur voulue par l’expérimentateur pour balayer l’échantillon.[52]

La résolution spatiale obtenue est actuellement de l’ordre du rayon de l’UME-sonde soit micrométrique ou sub-micrométrique. Elle devrait s’améliorer avec la généralisation des nano-électrodes.

Instrumentation

La Figure 1.5 représente l’ensemble du dispositif expérimental nécessaire à la mise en œuvre de manipulations de microscopie électrochimique. Le fond de la cellule électrochimique constitue le "substrat" plan. Le montage à trois électrodes associé a la particularité d’être double puisqu’on peut y connecter deux électrodes de

1.3. La photoluminescence et la fluorescence

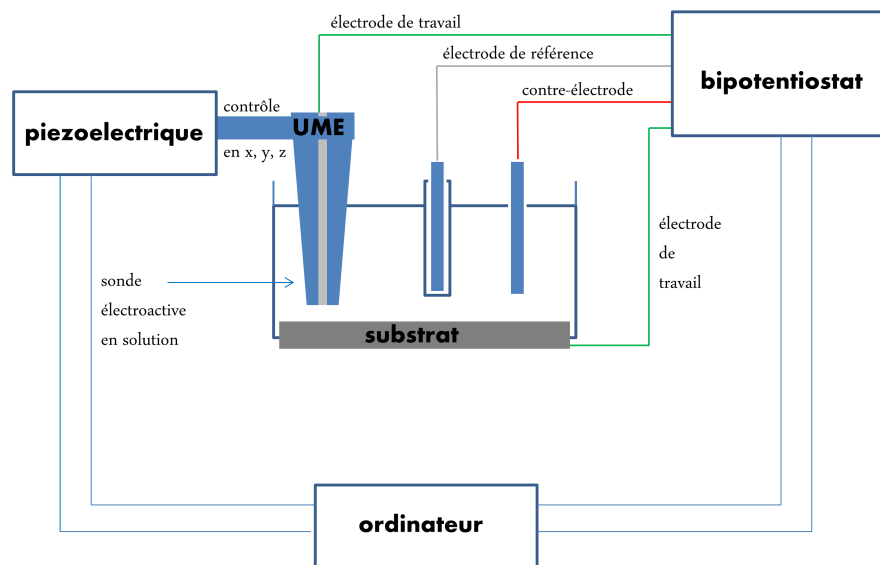


FIGURE 1.5 – Appareillage nécessaire pour la mise en œuvre de mesures de microscopie électrochimique à balayage

travail : un bipotentiostat permet de contrôler à la fois le potentiel de l'UME et celui du substrat lorsque ce dernier est conducteur. L'électrode de référence et la contre-électrode sont par contre intégrées dans les deux circuits. Le contrôle précis de la position de la pointe par rapport au substrat est assuré par un ensemble de piézo-positionneurs et de moteurs pas à pas. Les valeurs de consigne sont données par l'expérimentateur via un ordinateur relié à la fois au dispositif piézo-électrique et au bipotentiostat.

Dans le cadre de cette thèse, le microscope électrochimique est couplé à la microscopie de fluorescence pour l'étude de systèmes électrofluorochromes. Ainsi, la partie suivante définit quelques concepts de photophysique utilisés dans ce travail. On s'intéresse notamment aux grandeurs caractéristiques de la fluorescence, à leur évolution en présence d'inhibiteur et au principe général de la microscopie de fluorescence.

1.3 La photoluminescence et la fluorescence

1.3.1 Principe général

Le terme de luminescence, qui s'oppose à celui d'incandescence, fait référence à l'émission d'un rayonnement électromagnétique d'origine non thermique, le plus souvent dû à des transitions électroniques.

L'énergie libérée sous forme de lumière lors de la transition électronique peut avoir été initialement fournie au système sous différentes formes, par exemple électrique, chimique ou lumineuse. On parle alors respectivement d'électroluminescence, de chimiluminescence ou de photoluminescence.

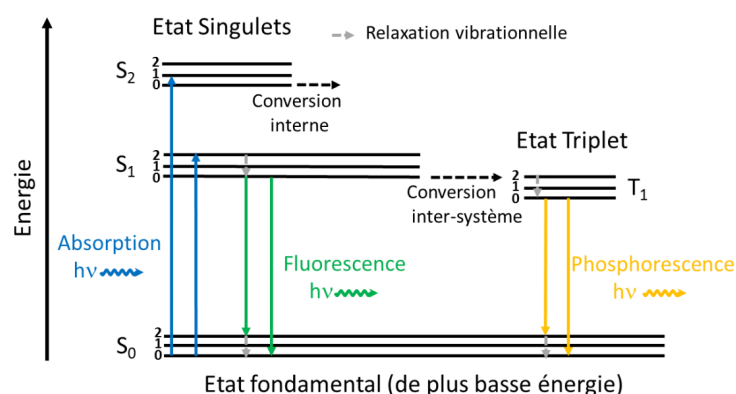


FIGURE 1.6 – Diagramme de Perrin-Jablonski

Le phénomène de photoluminescence se décompose donc en deux phases :

- La première – le passage de l'état fondamental à un état excité par l'absorption d'un photon d'énergie appropriée – est très rapide (de l'ordre de 10^{-15} s).
- La seconde – le retour à l'état fondamental par l'émission spontanée d'un photon à partir d'un état excité – peut avoir lieu via deux phénomènes : la fluorescence et la phosphorescence.

Fluorescence et phosphorescence sont toutes deux des formes de désexcitation dites radiatives. Toutefois, elles diffèrent par leur durée de vie (notion définie dans 1.3.2). En effet, l'émission de fluorescence est due à une transition entre deux états singulets. Étant donc "permise de spin", elle suit très rapidement l'excitation (de l'ordre de 10^{-8} s). L'émission de phosphorescence, quant à elle, est la conséquence d'une transition d'un état triplet à un état singulet, transition impliquant donc un changement de la multiplicité de spin du système. Étant "interdite de spin", elle intervient longtemps après que l'excitation ait eu lieu (de l'ordre de 10^{-3} s à quelques secondes).

Par ailleurs, fluorescence et phosphorescence sont en concurrence avec des formes de désexcitation dites non radiatives : la relaxation vibrationnelle, la conversion interne ou la conversion inter-système. La première implique la dissipation de l'énergie de la molécule vers ses voisines. La seconde intervient quand un état vibrationnel d'un état électronique peut se coupler avec un état vibrationnel d'un autre état électronique de plus faible énergie. La dernière correspond à la transition entre deux états électroniques de multiplicité de spin différentes et peut donner lieu à la phosphorescence.

L'ensemble de ces transitions peuvent être représentées sur un diagramme de Perrin-Jablonsky (Figure 1.6). L'axe vertical indique le niveau d'énergie. On y place les différents états électroniques notés selon leur multiplicité de spin et indicés selon leur position dans le diagramme (0 correspondant à l'état fondamental), ainsi que les états vibrationnels associés à chacun de ces états électroniques et indicés de la même façon.

Considérons par exemple une molécule initialement dans son état fondamental qui est singulet et donc noté S_0 . Ceci est notamment vérifié pour la plupart des molécules organiques puisque tous leurs électrons sont appariés à l'état fondamental. L'absorption d'un photon d'énergie appropriée la porte dans un état électronique

1.3. La photoluminescence et la fluorescence

et vibrationnel excité avec rétention de spin, vraisemblablement un état vibrationnel excité v_i des deux premiers états électroniques excités S_1 ou S_2 . Pour la plupart des molécules, s'ensuivent alors conversion interne et/ou relaxations vibrationnelles vers l'état vibrationnel fondamental v_0 de S_1 , ces phénomènes étant très rapides (de l'ordre de 10^{-12} s pour les relaxations vibrationnelles et de l'ordre de 10^{-13} – 10^{-11} s pour les conversions internes).

Une fois la molécule dans l'état v_0 S_1 , elle peut revenir à l'état fondamental selon différents processus représentés sur le diagramme de Perrin-Jablonsky :

- par conversion interne via le couplage entre l'état vibrationnel fondamental v_0 de S_1 et un état vibrationnel excité v_i de S_0 puis relaxation vibrationnelle vers l'état vibrationnel v_0 de S_0 . Ce processus est non radiatif.
- par émission spontanée d'un photon et retour de la molécule à un état vibrationnel v_i quelconque de S_0 correspondant à l'énergie du photon émis. C'est le phénomène de fluorescence. S'ensuivent des relaxations vibrationnelles jusqu'à l'état v_0 de S_0 .
- s'il existe un couplage spin-orbite fort impliquant l'existence d'un état électronique triplet T_1 plus stable que S_1 et le couplage entre l'état v_0 de S_1 avec un état v_i de T_1 , par croisement inter-système vers un état v_i de T_1 , relaxation vibrationnelle jusqu'à v_0 de T_1 puis émission spontanée d'un photon vers un état v_i de S_0 . C'est le phénomène de phosphorescence.

Par la suite, on s'intéresse principalement à la fluorescence et on définit les différentes grandeurs utilisées dans la littérature pour la caractériser. C'est l'objet du 1.3.2. Il s'avère que ces grandeurs peuvent être modifiées en présence d'autres molécules appelées inhibiteurs. Certains mécanismes décrivant l'interaction entre inhibiteur et fluorophore et leur influence sur les grandeurs caractéristiques de la fluorescence sont discutés dans la partie 1.3.4.

Ainsi, l'émission de fluorescence est particulièrement sensible à l'environnement du fluorophore. Cette propriété peut être mise à profit dans des expériences d'imagerie pour l'étude par exemple de phénomènes biologiques. Le principe du microscope de fluorescence est développé dans la partie 1.3.3. Elle peut également être utilisée pour la mise au point d'interrupteurs moléculaires. Cette idée est abordée dans la partie 1.3.5.

1.3.2 Grandeurs caractéristiques de la fluorescence

L'émission de fluorescence peut être caractérisée de différentes manières.

Durée de vie de l'état excité ou durée de vie de fluorescence

Soit une population d'un fluorophore noté F totalement isolée. Dans la suite, on néglige toute interaction entre les molécules.

Après excitation par un pulse de lumière très bref, une partie des molécules du fluorophore est excitée au niveau S_1 par absorption de photons. On note $[F^*]_0$ la concentration en fluorophores dans l'état excité au temps $t = 0$ juste après l'excitation. Les molécules F^* peuvent alors se désexciter de façon radiative ou de façon non radiative, phénomènes caractérisés respectivement par les taux de désexcitation radiatif et non radiatif notés respectivement k_r et k_{nr} (exprimés en s^{-1}).

Soit $[F^*]$ la concentration en fluorophore excité à un temps t après l'excitation. Son évolution au cours du temps est caractérisée par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k_r + k_{nr})[F^*] \quad (1.11)$$

$[F^*]$ suit donc une cinétique d'ordre 1 caractérisée par une décroissance exponentielle :

$$[F^*] = [F^*]_0 \exp[-(k_r + k_{nr})t] \quad (1.12)$$

Cette expression fait apparaître un temps caractéristique, la durée de vie de l'état excité S_1 :

$$\tau_F = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.13)$$

Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence i_F est quant à elle définie comme étant la quantité de photons (en mol) émis par unité de temps et par unité de volume de la solution (donc en mol.L⁻¹.s⁻¹) suivant l'équation de désexcitation par voie radiative de constante k_r :



Donc, par définition :

$$i_F(t) = \frac{d[\text{photon}]}{dt} = k_r[F^*] \quad (1.15)$$

Ainsi, i_F est à tout instant t proportionnelle à $[F^*]$ et le coefficient de proportionnalité est la constante de désexcitation radiative.

D'après l'expression de $[F^*](t)$ 1.12, l'intensité de fluorescence s'exprime à un instant t :

$$i_F(t) = k_r.[F^*]_0 \exp[-(k_r + k_{nr})t] \quad (1.16)$$

i_F décroît au court du temps selon une monoexponentielle.

Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence rend compte de la compétition entre les phénomènes de désexcitation radiatifs et non radiatifs. Il se définit comme la probabilité pour une molécule excitée d'émettre un photon :

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1.17)$$

Sur un très grand nombre de molécules à l'état excité, il représente la part de molécules se désexcitant par voie radiative. Autrement dit, pour un échantillon donné, il est égal au rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de molécules ayant été excitées ou encore au rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons préalablement absorbés.

1.3. La photoluminescence et la fluorescence

$$\Phi_F = \frac{\text{Nombre de photons émis}}{\text{Nombre de photons ayant été absorbés}} \quad (1.18)$$

$$\Phi_F = \frac{\int_{t=0}^{\infty} i_F(t) dt}{[F^*]_0} \quad (1.19)$$

On retiendra que durée de vie de fluorescence et rendement quantique de fluorescence sont reliés de la façon suivante :

$$\Phi_F = k_r \cdot \tau_F \quad (1.20)$$

Intensité de fluorescence stationnaire

Sous illumination continue, le système est à l'état stationnaire donc la concentration en fluorophore à l'état excité $[F^*]$ est constante au cours du temps. Si on note I_0 l'intensité du faisceau de lumière incident (en mol de photons par litre et par seconde) et α la proportion de photons absorbés alors :

$$\frac{d[F^*]}{dt} = \alpha I_0 - (k_r + k_{nr})[F^*] = 0 \quad (1.21)$$

Il vient que la quantité de photons émis par unité de temps et par unité de volume, donc l'intensité de fluorescence en régime stationnaire est donnée par :

$$I_F = k_r \cdot [F^*] = \frac{\alpha I_0 k_r}{k_r + k_{nr}} = \alpha I_0 \Phi_F \quad (1.22)$$

1.3.3 Mesure de fluorescence résolue spatialement : la microscopie de fluorescence

Principe de fonctionnement

La microscopie de fluorescence est une technique utilisant un microscope optique à la différence que la formation de l'image se fait non pas par réflexion mais par détection de la fluorescence ou de la phosphorescence émise par la molécule excitée grâce à la source lumineuse du microscope. On distingue plusieurs types de microscopie de fluorescence selon la manière d'exciter la molécule. La configuration "classique" est appelée microscopie à épifluorescence et le schéma du dispositif est représenté sur la Figure 1.7. Une lampe blanche couplée à un filtre dit "d'excitation" sert de source excitatrice. Un miroir dichroïque réfléchit le faisceau émis par la source. Puis, ce faisceau passe à travers l'objectif qui le focalise dans l'échantillon. Les molécules excitées luminescent. La lumière ainsi émise est collectée à travers l'objectif, transmise par le miroir dichroïque et filtrée par un filtre dit "d'émission". Le faisceau d'émission peut finalement être analysé par un spectrophotomètre, une caméra CCD ou encore une carte de comptage dans le cas de la fluorescence résolue en temps. Filtres d'excitation et d'émission sont choisis respectivement à partir des spectres d'absorption et d'émission de la molécule sondée. Le miroir dichroïque, quant à lui, doit réfléchir le faisceau d'excitation et transmettre le faisceau d'émission.

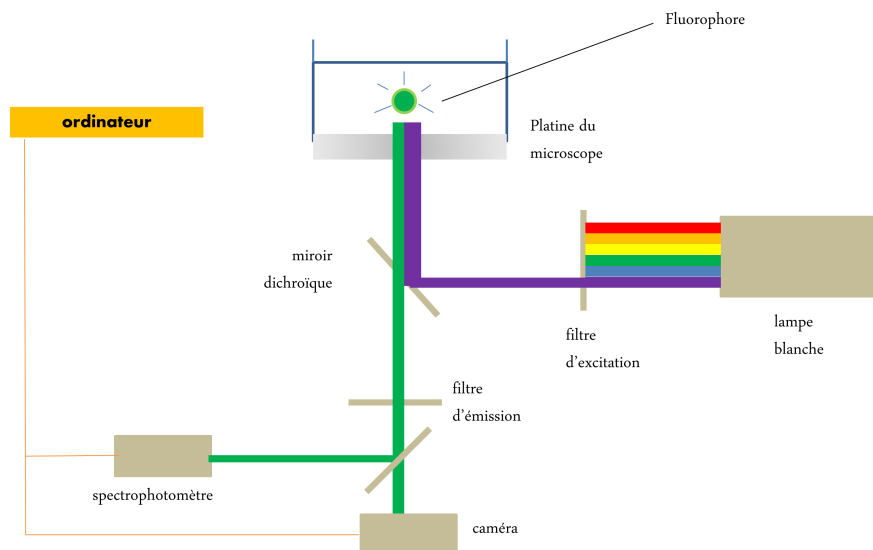


FIGURE 1.7 – Système de filtres dans un microscope de fluorescence inversé

Résolutions spatiale et temporelle de la microscopie de fluorescence : les différentes configurations

L'avantage principal de la microscopie de fluorescence par rapport à la technique de fluorimétrie classique est de fournir une information résolue spatialement grâce à la collecte de la lumière, par exemple, au moyen d'une caméra CCD. Cette résolution spatiale est fixée par la zone de l'espace dans laquelle se font l'excitation et la collecte de lumière émise. De plus, par rapport à d'autres techniques de microscopie, elle offre une visualisation directe, sans balayage, du plan (x,y) , ce qui augmente la résolution temporelle.

Résolution spatiale : limites et perspectives

Dans cette configuration classique dite d'épifluorescence, la résolution spatiale, c'est-à-dire la zone de l'espace dans laquelle ont lieu l'excitation et la collecte de la lumière émise, est limitée :

- selon le plan (x,y) du substrat, par la diffraction ;
- selon l'axe z dans la profondeur de la solution, par le système d'éclairage.

Des configurations particulières du microscope de fluorescence permettent d'améliorer la résolution spatiale selon l'axe z :

- la configuration TIRF (réflexion totale). Dans cette configuration, l'angle du faisceau d'excitation avec l'axe z est supérieur à l'angle limite de réfraction si bien qu'il y a réflexion totale : seule une onde évanescente traverse le substrat. Cette onde décroît exponentiellement et permet donc une résolution à proximité du substrat de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. Plusieurs dispositifs expérimentaux permettent de se placer dans une telle configuration : un prisme (schéma A de la Figure 1.8), un objectif de grande ouverture numérique (schéma C de la Figure 1.8), la réflexion multiple dans le substrat (schéma B de la Figure 1.8), etc. Toutefois, cette méthode présente l'inconvénient de limiter l'étude aux phénomènes ayant lieu au voisinage du substrat.

1.3. La photoluminescence et la fluorescence

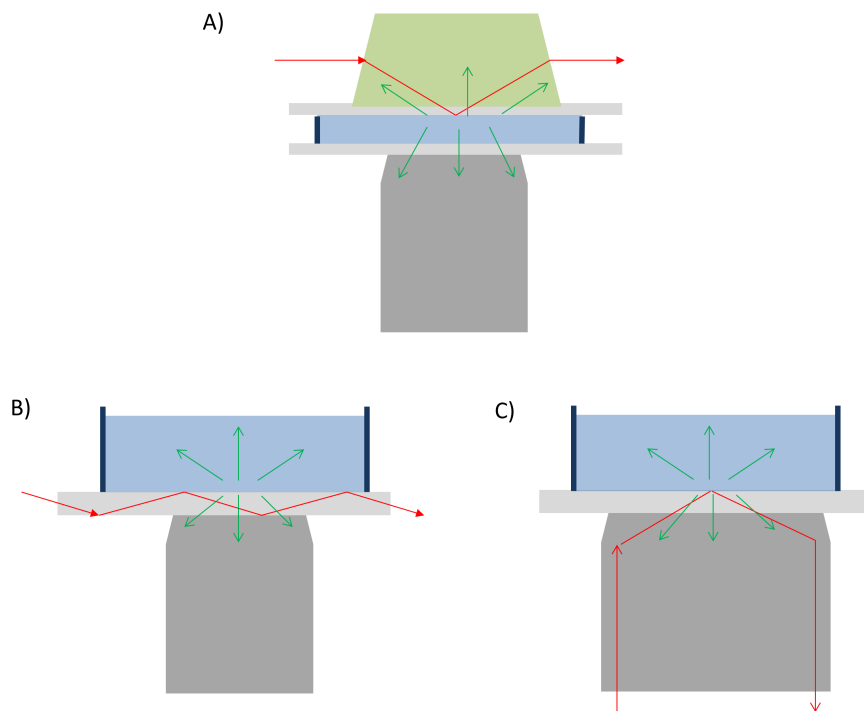


FIGURE 1.8 – Différents modèles pour la configuration TIRF

- la configuration confocale inventé par Marvin Minsky en 1957. Sur la Figure 1.9 est représentée le schéma qu'il en a fait. Cette configuration est mise en œuvre expérimentalement par l'utilisation d'un trou permettant de ne pas collecter les lumières émises hors du plan focal. Concrètement, deux diaphragmes sont placés sur le trajet de la lumière : un juste après la source d'excitation et l'autre juste avant la collecte. Le premier diaphragme permet de focaliser le faisceau incident sur une toute petite partie de l'échantillon. Si des fluorophores sont présents sur ce point, ils émettent de la lumière ensuite filtrée par le miroir dichroïque et le filtre d'émission. Un deuxième diaphragme est placé au point de focalisation du faisceau image. Il ne laisse passer que la lumière provenant du point de l'échantillon dont on veut faire l'image en fluorescence. Il est ensuite possible de déplacer soit l'échantillon, soit le montage optique pour balayer la surface de l'échantillon avec le faisceau dans le plan (x,y) afin d'en former l'image en fluorescence à une hauteur z donnée. Le déplacement des diaphragmes permet d'enregistrer plusieurs coupes (x,y) à différentes hauteurs z . Un traitement informatique permet de reconstruire une image en 3 dimensions.

La configuration confocale permet également d'améliorer la résolution selon x et y , puisqu'elle permet de descendre en dessous de la limite de diffraction.

Actuellement, la meilleure résolution se rapproche de la molécule unique.

1.3.4 Mécanismes d'extinction de la fluorescence [96]

Certains processus photophysiques intermoléculaires influent sur les caractéristiques de l'émission de fluorescence précédemment définis dans le paragraphe 1.3.2

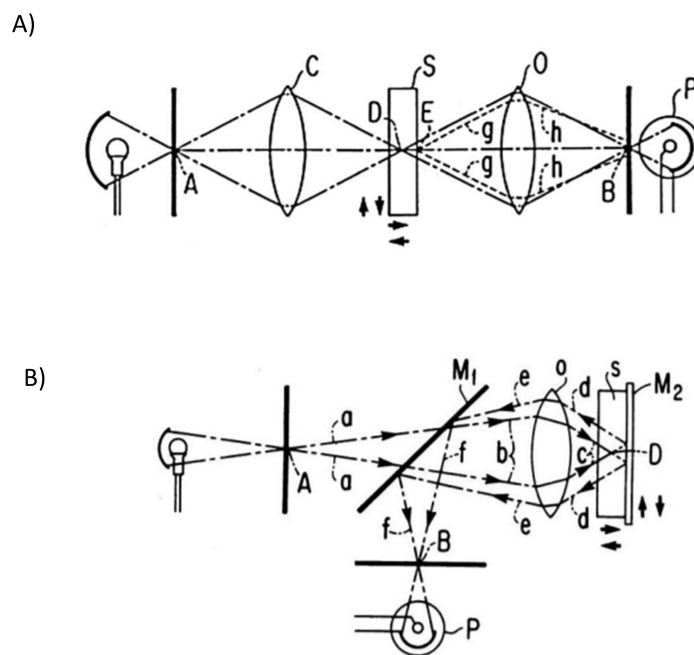


FIGURE 1.9 – Microscope confocal inventé par Marvin Minsky et breveté en 1957. A) Dans ces conditions, toute lumière parasite située hors du plan focal (exemple «E») sera défocalisée sur le diaphragme «B» (trajet des rayons en «g» et «h») et ne pourra atteindre le détecteur. Un déplacement progressif du spécimen (flèches verticales) permet de le scanner point par point. B) Dans le deuxième schéma, une seule lentille «O» permet à la fois de focaliser l'éclairage en «D» et de refocaliser la lumière émise par le spécimen sur le point «B» du diaphragme placé devant le détecteur. Dans ce deuxième modèle, il est nécessaire de disposer un miroir de renvoi «M2» et un miroir dichroïque «M1» permettant de séparer la lumière d'excitation «a» et la lumière d'émission «f»

1.3. La photoluminescence et la fluorescence

(l'intensité de fluorescence en régime stationnaire, le rendement quantique et la durée de vie de l'état excité).

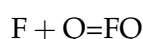
Ils impliquent le plus souvent l'interaction du fluorophore F à l'état fondamental ou dans son état excité avec une autre molécule usuellement désignée sous le nom d'inhibiteur (en anglais *quencher*) Q. Selon que l'interaction avec l'inhibiteur se fasse dans l'état fondamental ou dans l'état excité, on parle respectivement d'inhibition statique ou d'inhibition dynamique.

Dans la suite, l'inhibition statique, l'inhibition dynamique et la combinaison des deux sont successivement étudiées, l'objectif étant de voir comment, à partir de la mesure des grandeurs caractéristiques de la fluorescence, ces différents mécanismes peuvent être détectés expérimentalement. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.1.

Le transfert d'électron photoinduit est également abordé.

L'inhibition statique

Dans le cas de l'inhibition statique, la molécule fluorescente forme un complexe avec l'inhibiteur lorsqu'elle est dans son état fondamental, avant excitation. Le complexe ainsi formé possède alors des propriétés d'absorption qui lui sont propres et il est, dans la plupart des cas, non fluorescent.



À l'équilibre, on définit K_S la constante d'association du complexe :

$$K_S = \frac{[FQ] \cdot C^\circ}{[F]_{stat}[Q]} \quad (1.23)$$

Avec $[FQ]$ la concentration en complexes fluorophore-inhibiteur, $[F]$ la concentration en fluorophores libres F et $[Q]$ la concentration en inhibiteur Q.

Donc :

$$[FQ] = K_S [F]_{stat} \frac{[Q]}{C^\circ} \quad (1.24)$$

D'après la loi de conservation de la masse, et en considérant que les intensités de fluorescence sont proportionnelles à la concentration en espèce fluorescente (ce qui est vrai dans les solutions diluées),

$$\frac{I_F}{I_{stat}} = \frac{C_F}{[F]_{stat}} = \frac{[F]_{stat} + [FQ]}{[F]_{stat}} = 1 + K_S \frac{[Q]}{C^\circ} \quad (1.25)$$

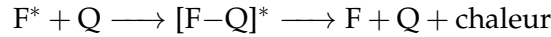
avec C_F la concentration en fluorophore introduit.

Ainsi, expérimentalement, on enregistre une diminution de la fluorescence due à la diminution de la concentration en molécules fluorescentes. De plus, le rapport entre les intensités de fluorescence sans et en présence d'inhibiteur dépend linéairement de la concentration en inhibiteur. Le coefficient directeur de la droite donne la constante de formation du complexe fluorophore-inhibiteur.

Étant donné que l'inhibiteur interagit avec la molécule dans son état fondamental, les propriétés d'émission de la molécule fluorescente – à savoir le fluorophore à l'état excité – ne sont pas impactées par la présence de l'inhibiteur et ses propriétés d'émission demeurent inchangées. La durée de vie de fluorescence ne dépend donc pas de la concentration en inhibiteur.

L'inhibition dynamique

Dans le cas de l'inhibition dynamique, l'action de l'inhibiteur se fait sur le fluorophore pendant la durée de vie de l'état excité. L'efficacité de l'inhibition est liée à la constante de diffusion du milieu. Dans l'ordre, il y a donc excitation du fluorophore F qu'on note alors F*. Puis des effets hydrophobes ou électrostatiques induisent l'association F*-Q. Enfin, différents mécanismes induisent un transfert de l'énergie d'une partie des F* vers Q. Donc seule une partie des F* fluoresce normalement, la présence d'inhibiteur offrant une voie de désexcitation supplémentaire :



Soit k_q la constante associée aux taux de désexcitation via cette nouvelle voie. Dans une première approximation, on la considère indépendante du temps. Il s'agit d'une constante du deuxième ordre qui s'exprime en $L.s^{-1}.mol^{-1}$.

L'équation 1.11 devient :

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k_r + k_{nr} + k_q[Q])[F^*] = -\left(\frac{1}{\tau_F} + k_q[Q]\right)[F^*] \quad (1.26)$$

L'intégration de cette équation avec la condition initiale $[F^*] = [F^*]_0$ à $t = 0$ donne :

$$[F^*] = [F^*]_0 \exp\left[-\left(\frac{1}{\tau_F} + k_q[Q]\right)t\right] \quad (1.27)$$

L'intensité de fluorescence s'exprime donc de la façon suivante :

$$i(t) = k_r[F^*] = k_r[F^*]_0 \exp\left[-\left(\frac{1}{\tau_F} + k_q[Q]\right)t\right] \quad (1.28)$$

où k_r est le taux de dissociation radiatif du fluorophore excité.

Ainsi, la fluorescence en présence d'inhibition dynamique décline toujours selon une mono-exponentielle. Toutefois, on isole un nouveau temps caractéristique :

$$\tau_{dyn} = \frac{1}{\frac{1}{\tau_F} + k_q[Q]} = \frac{\tau_F}{1 + k_q\tau_F[Q]} \quad (1.29)$$

Finalement, on retiendra l'expression du rapport $\frac{\tau_F}{\tau_{dyn}}$:

$$\frac{\tau_F}{\tau_{dyn}} = 1 + k_q\tau_F[Q] \quad (1.30)$$

Quant au rendement quantique de fluorescence, il s'exprime en présence d'inhibiteur :

$$\Phi_{dyn} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]} \quad (1.31)$$

De la même façon que pour la durée de vie, on calcule le rapport $\frac{\Phi_F}{\Phi_{dyn}}$ à l'aide de la relation 1.17 :

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{dyn}} = \frac{k_r + k_{nr} + k_q[Q]}{k_r + k_{nr}} = 1 + \frac{k_q[Q]}{k_r + k_{nr}} \quad (1.32)$$

D'après les relations 1.13 et 1.22, il vient que :

1.3. La photoluminescence et la fluorescence

Tab. 4.3. Exemples de k_q values for various fluorophore–quencher pairs (from Eftink, 1991b)

Fluorophore	$k_q/(10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$			
	O_2	Acrylamide	Succinimide	I^-
Tyrosine	12	7.0	5.3	
Fluorescein		0	0.2	1.5
Anthracene-9-carboxylic acid	7.7	2.4	0.1	
PRODAN		0	0	2.8
DENS	7.7	3.2	0.1	0.03
Eosin Y		0	0	2.2
Pyrenebutyric acid	10	3.4	0.06	
Carbazole		7.0	5.4	

Abbreviations: PRODAN: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene;
DENS: 6-diethylaminonaphthalene-1-sulfonic acid.

FIGURE 1.10 – Quelques valeurs de la constante d'inhibition dynamique k_q [96]

$$\frac{I_F}{I_{dyn}} = \frac{\Phi_F}{\Phi_{dyn}} = 1 + \tau_F k_q [Q] \quad (1.33)$$

On note $K_{SV} = \tau_F k_q$ la constante de Stern-Volmer.

À titre indicatif, des valeurs de la constante k_q sont reportées sur le tableau de la Figure 1.10 pour plusieurs fluorophores et plusieurs inhibiteurs. En réalité, dans le cas où la réaction n'est pas limitée par la diffusion, la constante d'inhibition apparente k_q s'écrit comme :

$$k_q = p \cdot k_1 \quad (1.34)$$

avec k_1 la constante de vitesse associée à la réaction de diffusion et p l'efficacité de l'inhibition pour la paire fluorophore/inhibiteur.

Inhibition statique et inhibition dynamique simultanées

Les inhibitions statique et dynamique peuvent se produire simultanément, ce qui conduit à la non-linéarité de la représentation $\frac{I_F}{I} = f([Q])$, avec I l'intensité de fluorescence mesurée en présence des deux formes d'inhibition.

En effet, si on considère que, dans le cas de l'inhibition statique, seule une fraction $\frac{[F]}{C_F}$ des molécules est fluorescente (celles qui sont non complexées), le rapport $\frac{I_{dyn}}{I_F}$ obtenu dans le cas de la seule inhibition dynamique doit être pondéré de cette fraction :

$$\frac{I}{I_F} = \frac{I_{dyn}}{I_F} \frac{[F]}{C_F} \quad (1.35)$$

Ainsi le rapport $\frac{I_F}{I}$ peut être écrit comme une combinaison des relations 1.25 et 1.33 :

	inhibition dynamique	inhibition statique	inhibition dynamique + inhibition statique
durée de vie	$\frac{\tau_F}{\tau} = 1 + K_{SV}[Q]$	$\frac{\tau_F}{\tau} = 1$	$\frac{\tau_F}{\tau} = 1 + K_{SV}[Q]$
intensité de fluorescence	$\frac{I_F}{I} = 1 + K_{SV}[Q]$	$\frac{I_F}{I} = 1 + K_S[Q]$	$\frac{I_F}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_S[Q])$

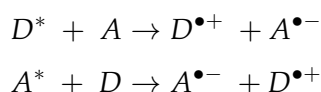
TABLEAU 1.1 – Résumé de l'influence de l'inhibition statique seule, de l'inhibition dynamique seule et de celle des deux combinées sur les grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence

$$\frac{I_F}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_S[Q]) = 1 + (K_{SV} + K_S)[Q] + K_{SV}K_S[Q]^2 \quad (1.36)$$

Expérimentalement, les constantes K_{SV} et K_S peuvent être déterminées par l'ajustement numérique de l'équation 1.36 à la représentation graphique de $[\frac{I_F}{I}]_{exp}$ en fonction de $[Q]_{exp}$ ou, alternativement, par régression linéaire de $[\frac{I_F/I-1}{[Q]}]_{exp}$ en fonction de $[Q]_{exp}$.

Transferts d'électrons photoinduits

Les propriétés réductrices ou oxydantes des molécules peuvent être amplifiées à l'état excité. Le principe du transfert d'électron photoinduit est résumé sur la Figure 1.11 et correspond aux équations chimiques suivantes :



Les équations de Rehm-Weller permettent d'estimer l'enthalpie libre standard associée à ces réactions. Ainsi, en phase gaz, pour la première équation par exemple :

$$\Delta G^\circ = E^\circ(D^{\bullet+}/D^*) - E^\circ(A/A^{\bullet-}) - \Delta E_{00}(D) \quad (1.37)$$

où E° est un potentiel redox standard et ΔE_{00} est l'énergie d'excitation. ΔG° est obtenu en Volt.

De la même façon, une équation de Rehm-Weller peut être établie lorsque le fluorophore présente un fort caractère oxydant à l'état excité (deuxième équation chimique). Le passage de la phase gaz à la solution nécessite de tenir compte de l'enthalpie de solvatation et de l'énergie Coulombienne de la paire d'ions.

Dans la suite, on s'intéresse au couplage entre électrochimie et fluorescence et plus particulièrement à la notion d'électrofluorochromisme et à ses applications.

1.3.5 La modulation de la fluorescence par électrochimie : l'électrofluorochromisme

La luminescence est non seulement sensible à la présence de certaines molécules dans l'environnement du fluorophore mais elle peut également être modulée par divers types de stimuli : température, pH, lumière. [90] [84] [53]

Lorsque la modulation de la luminescence se fait par électrochimie, on parle d'électrofluorochromisme.

1.3. La photoluminescence et la fluorescence

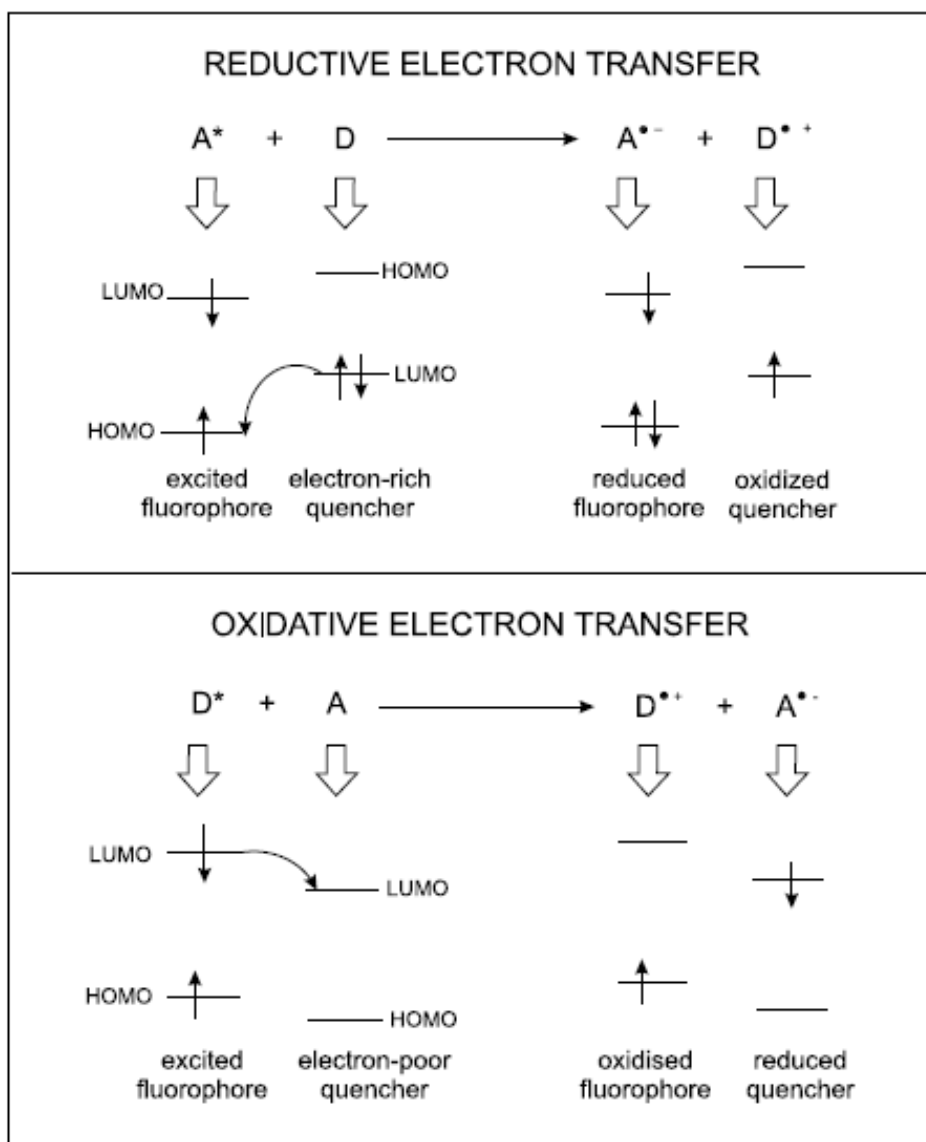


FIGURE 1.11 – Principe du transfert d'électron photoinduit selon que le fluorophore excité est un caractère plutôt accepteur ou plutôt donneur d'électrons. [96]

De tels dispositifs vont trouver des applications dans les capteurs, les afficheurs, en analyse, etc. Les enjeux sont donc multiples. Il s'agit de mettre au point de nouveaux systèmes moléculaires, de créer de nouveaux devices, de mettre au point des dispositifs expérimentaux pour permettre leur étude, etc. Les travaux effectués dans ces différents aspects font déjà l'objet de plusieurs revues : [3] [1] [91].

Dans la suite, la notion de système électrofluorochrome est définie avec plus de précisions dans la partie 1.4. La partie 1.5 est, quant à elle, consacrée aux différentes applications et aux enjeux de l'électrofluorochromisme. La partie 1.6 s'attarde sur les dispositifs expérimentaux développés par certaines équipes pour étudier conjointement électrochimie et fluorescence.

1.4 Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome

Pour être électrofluorochrome, un système doit présenter au moins deux états rédox stables dont l'un au moins de ces états est luminescent. Typiquement, dans la majorité des cas, les états sont au nombre de deux, l'un émet de la lumière et l'autre non. On est donc susceptible d'allumer ou d'éteindre le système de façon réversible par la modulation de la valeur du potentiel qu'on lui impose.

1.4.1 Les dyades moléculaires composées d'un système électroactif et d'un fluorophore

La mise au point d'un tel système nécessite de former une molécule en associant une entité électroactive et une entité luminescente reliées par un espaceur conjugué ou non-conjugué, l'entité électroactive devant à un certain degré d'oxydation inhiber la luminescence de l'entité émissive et dans l'autre non. L'extinction de luminescence peut se faire selon deux mécanismes :

- par transfert d'électrons photoinduit entre le fluorophore et l'entité électroactive comme schématisé sur la Figure 1.12. Dans ce cas, la réaction électrochimique, en s'opposant à ce transfert, empêche l'extinction de se produire. Le sens du transfert d'électrons entre fluorophore et entité électroactive à l'origine de l'extinction de fluorescence dépend du caractère oxydant ou réducteur de l'état excité du fluorophore. En effet, si le fluorophore présente un caractère réducteur à l'état excité, la forme oxydée de l'entité électroactive joue le rôle d'accepteur d'électrons : un transfert électronique a lieu depuis le fluorophore vers l'entité électroactive inhibant de cette manière l'émission de fluorescence. Une conversion électrochimique de l'accepteur en sa forme réduite bloque ce transfert électronique et restaure la fluorescence. À l'inverse, si l'état excité du fluorophore est oxydant, il n'y aura pas d'échange d'électrons entre la forme oxydée de l'entité électroactive et le fluorophore : le système émet de la fluorescence. Une conversion électrochimique de la forme oxydée en donneur d'électron a pour conséquence l'établissement d'un transfert électronique depuis la forme réduite de l'entité électroactive vers le fluorophore causant ainsi l'extinction de la fluorescence.

Systèmes utilisant des fluorophores riches en électrons

La plupart des exemples décrits dans la littérature utilisant des fluorophores riches en électrons, et donc qui présentent un fort caractère réducteur à l'état

1.4. Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome

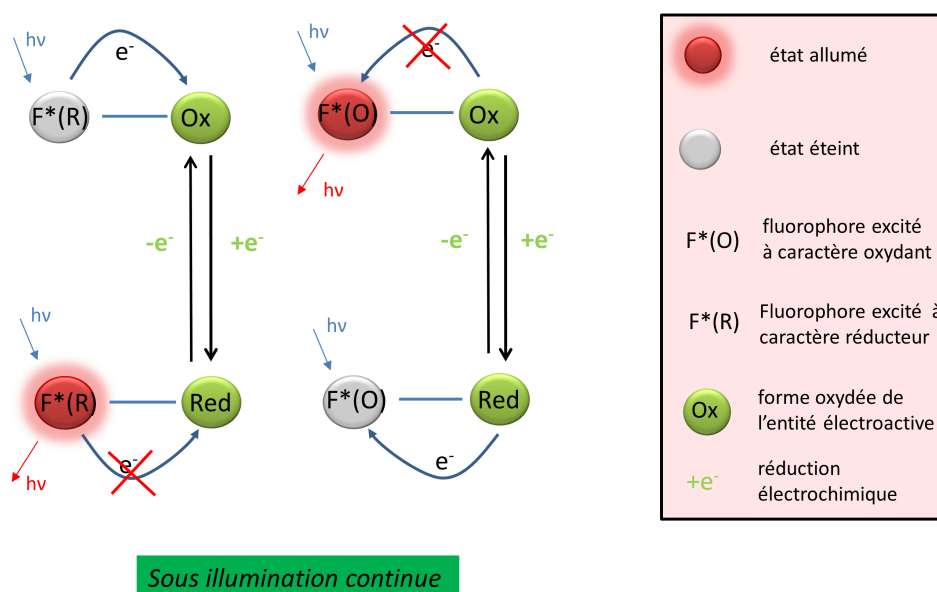
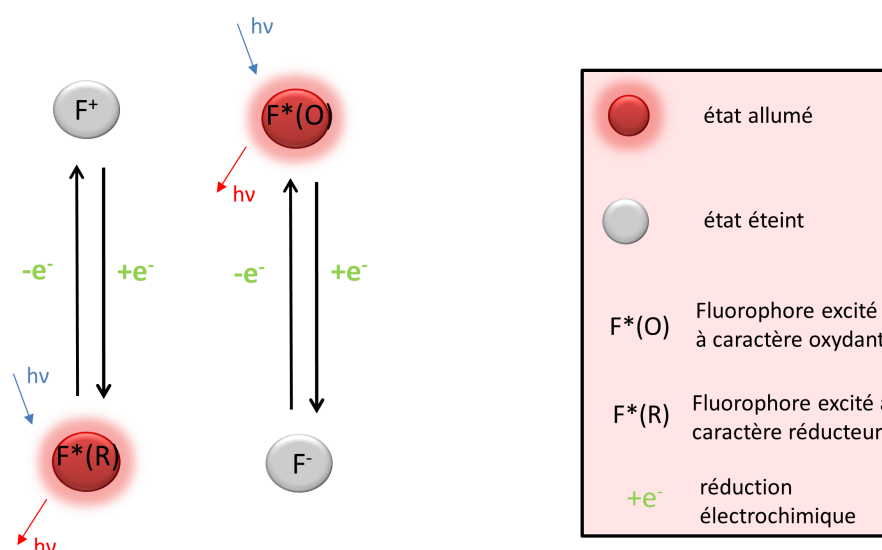


FIGURE 1.12 – Principe de l'électrofluorochromisme entre un état éteint et un état allumé dans une dyade composée d'un fluorophore et d'une entité électroactive. Le fluorophore est noté R ou O selon son caractère respectivement réducteur (à gauche) ou oxydant (à droite). Dans les deux cas, l'entité électroactive peut être réversiblement convertie en sa forme réduite (notée Red, en bas) ou en sa forme oxydée (notée Ox, en haut). Selon la nature du fluorophore (R ou O), le transfert électronique entre les deux entités est permis (état éteint) sous une forme et bloqué (état allumé) sous l'autre forme.



Sous illumination continue

FIGURE 1.13 – Principe de l'électrofluorochromisme entre un état éteint et un état allumé pour des fluorophores directement électroactifs. Selon son caractère réducteur (noté R, à gauche) ou oxydant (noté O, à droite), le fluorophore peut être respectivement réduit ou oxydé en une espèce non émettrice, et cela de façon réversible.

excité, font appel aux quinones en tant qu'entité électroactive acceptrice d'électrons. Dans une telle configuration, le système oxydé fluorophore*-quinone n'émet pas de fluorescence tandis que, sous la forme réduite fluorophore*-hydroquinone, la fluorescence est restaurée. Un tel schéma de principe a été appliqué aussi bien à des fluorophores organométalliques qu'à des fluorophores organiques.[99] [9]

Systèmes utilisant des fluorophores électrodéficients

Il existe des donneurs métalliques (ferrocènes, ferrocènes portant des périlène diimide, macrocycles) et des donneurs organiques (pérylène, quinones).

Plusieurs exemples ont ainsi été décrits utilisant plusieurs types de fluorophores organiques : dansyl [40], naphthalimide [100], azines [61], etc. La plupart de ces systèmes sont préparés dans les deux formes (oxydées et réduites) et leurs propriétés spectroscopiques sont étudiées *ex situ*.

- par transfert d'énergie. Ce mécanisme implique un recouvrement spectral entre l'émission du fluorophore et l'absorption de l'entité électroactive dans un certain état rédox. Dans ce cas, la réaction électrochimique doit entraîner un décalage spectral de l'absorption pour rétablir la luminescence.[74] [43] [76] Cette situation reste beaucoup moins fréquente.

1.4. Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome

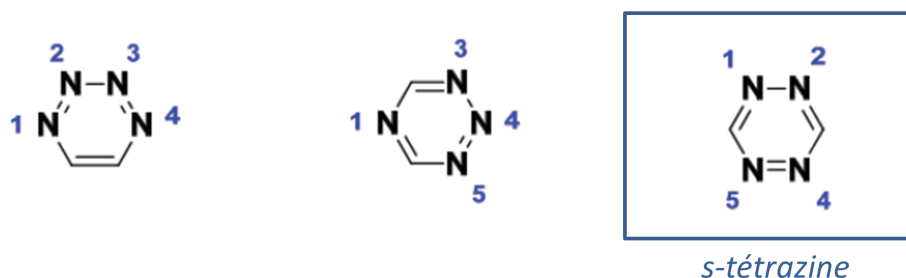


FIGURE 1.14 – Les trois isomères de la tétrazine

1.4.2 Les fluorophores directement électroactifs

Lorsque les entités électroactive et luminescente sont distinctes comme vu jusqu'à présent, on parle d'un phénomène d'électrofluorochromisme indirect. Le phénomène peut aussi être direct si le système présente une unique entité à la fois électroactive et luminescente mais cela implique que l'espèce électrogénérée à partir de cette entité soit non émissive. Ceci est très souvent vérifié dans le cas d'un transfert monoélectronique puisque la plupart des ions radicalux ne présentent pas de luminescence notable. Le principe de l'électrofluorochromisme direct est schématisé sur la Figure 1.13.

Il peut s'agir de composés organométalliques tels que des complexes de ruthénium ou d'iridium [66] [35], ou de composés organiques. Les composés organiques les plus couramment utilisés sont des fluorophores capables de stabiliser une charge positive ou négative, typiquement des molécules aromatiques souvent très conjuguées dans lesquelles on introduit des hétéroatomes et des groupements électroattracteurs et électrodonneurs.[89] [17]

Dans la suite, une famille de molécules organiques directement électrofluorochromes est étudiée plus en détails. Il s'agit de la famille des alkoxytétrazines. Ces molécules seront ensuite largement utilisées dans les chapitres suivants.

1.4.3 La famille des tétrazines

La famille des tétrazines regroupe des composés dérivés du benzène auquel quatre atomes de carbone ont été remplacés par des atomes d'azote. Elle est donc constituée de trois isomères représentés sur la Figure 1.14, parmi lequel l'isomère symétrique, la 1,2,4,5-tétrazine, également appelée s-tétrazine.

La dichlorotétrazine est un synthon clé permettant d'accéder à une large gamme de dérivés de la s-tétrazine par substitution nucléophile aromatique.

Dans la suite, on s'intéresse aux propriétés électrochimiques et photophysiques des dérivées de s-tétrazines.

Propriétés électrochimiques des dérivés de s-tétrazine

De part la substitution des carbones par des azotes plus électronégatifs, la tétrazine est beaucoup plus électrodéficiente que le benzène et peut donc facilement être réduite [18] [5].

molécule	E° (V)
dichlorotétrazine	-0,68
chlorométhoxytétrazine	-0,99
diméthoxytétrazine	-1,25

TABLEAU 1.2 – Potentiels de réduction de demi-vague de quelques s-tétrazines dans le dichlorométhane

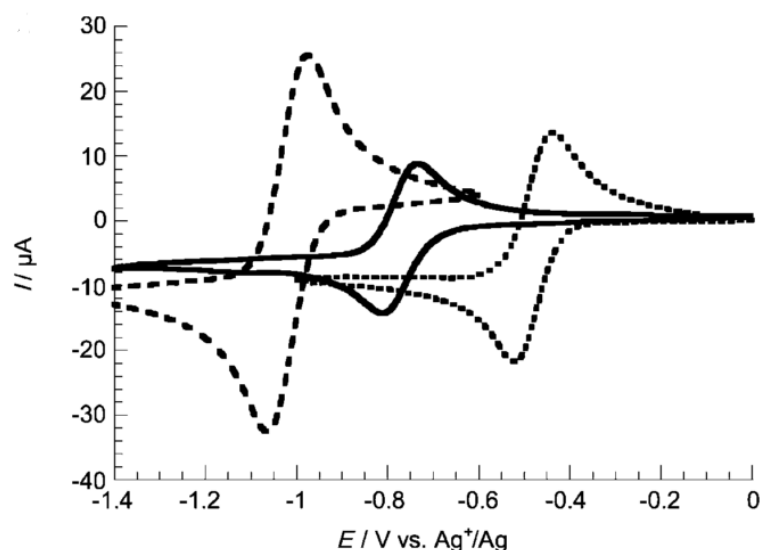


FIGURE 1.15 – Voltammétries cycliques de la dichlorotétrazine (pointillés), la chlorométhoxytétrazine (tirets) et la diméthoxytétrazine (trait continu) sur carbone vitreux à $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Dans le dichlorométhane, le tétrabutylammonium hexafluorophosphate est utilisé comme sel de fond. [5]

Au sein du laboratoire, il a été montré qu'en milieu organique, il était possible de réduire électrochimiquement tous les dérivés de la s-tétrazine (substitués par des hétéroatomes ou des aromatiques) en leur radical anion associé, et que cette transformation est réversible. De plus, le choix des substituants en positions 3 et 6 (voir schéma de la s-tétrazine de la Figure 1.14) permet de moduler le potentiel de réduction qu'ils influencent vraisemblablement par leurs effets électroniques. Dans le tableau 1.2 sont reportés les potentiels standard de quelques tétrazines (mesurés par rapport au ferrocène dans le dichlorométhane). Sur la Figure 1.15 sont représentées les voltammétries cycliques correspondantes.

Le radical anion formé est stable pour toutes les tétrazines, en l'absence de donneur de protons, ce qui différencie la tétrazine des autres hétérocycles à six membres portant des substituants halogénés. En effet, dans la plupart des cas, la réduction est accompagnée de l'élimination d'un halogénure conduisant à la formation d'un radical neutre qui peut ensuite réagir de différentes façons. Cette scission n'est jamais observée dans le cas de la tétrazine. La très grande électrodéficiance de son noyau aromatique lui permet de stabiliser efficacement la charge négative. Des calculs théoriques montre que la densité de spin est délocalisée sur les quatre atomes d'azote.

La plupart des radicaux anions issus des dérivés de tétrazine peuvent eux-mêmes

1.4. Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome

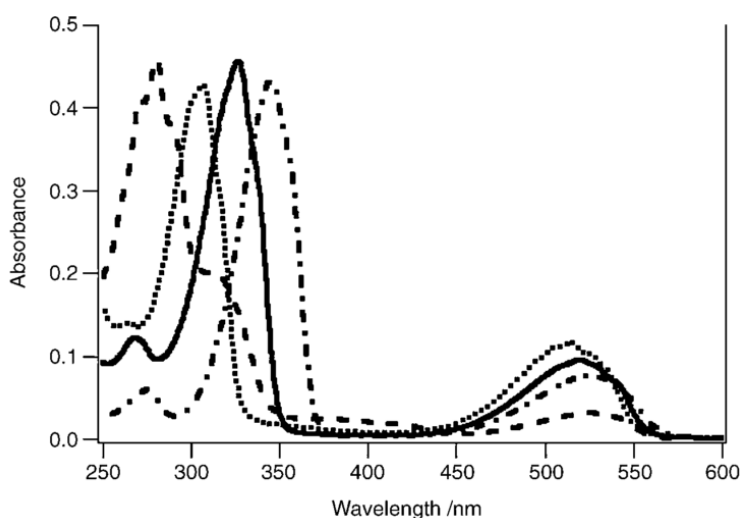


FIGURE 1.16 – Spectres d'absorption de la dichlorotétrazine (\cdots), la chlorométhoxytétrazine ($- - -$), la diméthoxytétrazine ($- \cdot - \cdot$) et la bis(chloro-s-tétrazinyloxo)butane (—) dans le dichlorométhane [5]

accepter un second électron. Le di-anion ainsi formé est quant à lui particulièrement instable. De part sa forte basicité notamment, il réagit avec toute trace d'eau dans le solvant d'analyse.

Propriétés photophysiques des dérivés de s-tétrazine

Propriétés d'absorbance Le spectre d'absorption des tétrazines présente deux bandes (voir Figure 1.16) :

- la première présente un maximum entre 510 et 530 nm. Le coefficient d'extinction molaire associé à cette bande est relativement faible (de l'ordre de $1000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La position de cette bande est faiblement influencée par la nature des substituants et il a été montré qu'elle n'était pas solvatochrome. Cette transition est responsable de la couleur des tétrazines (souvent violettes, oranges ou rouges). Elle est causée par la transition faible $n\text{-}\pi^*$ (voir diagramme d'orbitales moléculaires de la figure 1.20).
- la seconde bande apparaît dans l'UV. Sa position est fortement dépendante de la nature des substituants et corrèle avec la nature électro-donneuse ou acceptrice de ceux-ci. Il s'agit de la transition $\pi\text{-}\pi^*$ (voir Figure 1.20).

Propriétés d'émission Un grand nombre de tétrazines sont fluorescentes. La s-tétrazine et la diméthyl-s-tétrazine, par exemple, sont fluorescentes mais photochimiquement instables : elles se décomposent en diazote et acide cyanidrique ou en acétonitrile respectivement. Augmenter la taille des substituants permet d'augmenter largement la photostabilité. Par exemple, la diphényl-s-tétrazine est stable sous irradiation mais la durée de vie de l'état excité singulet est très courte (inférieure à 500 ps).

Certaines tétrazines substituées par des hétérotomes sont très fluorescentes. La position du maximum d'émission oscille entre 550 et 590 nm. Les spectres d'émission sont larges et non structurés dans le dichlorométhane (voir les spectres de la

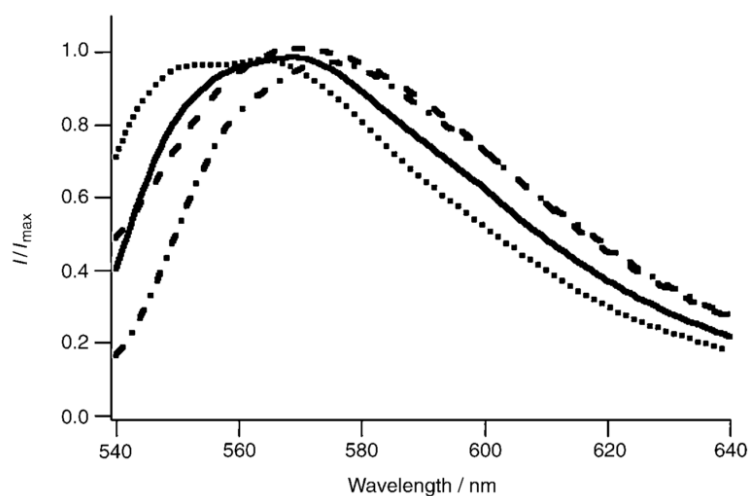


FIGURE 1.17 – Spectres d'émission de fluorescence de la dichlorotétrazine ($\cdot\cdot\cdot$), la chlorométhoxytétrazine ($- - -$), la diméthoxytétrazine ($- \cdot - \cdot$) et la bis(chloro-s-tetrazinyloxy)butane ($-$) dans le dichlorométhane [5]

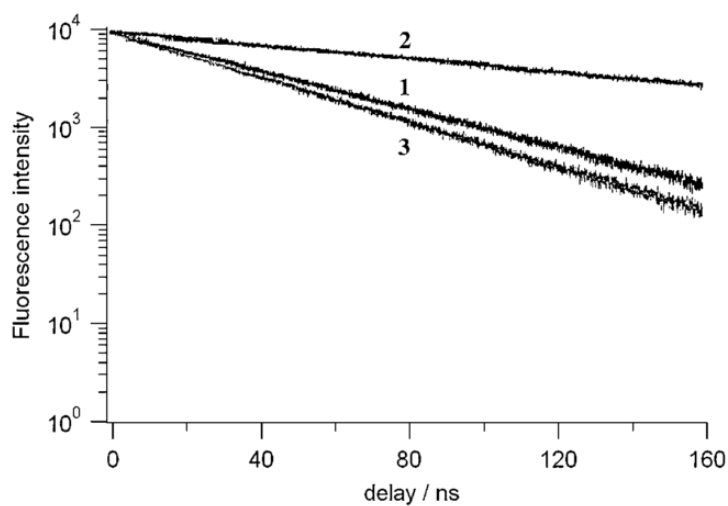


FIGURE 1.18 – Déclins de fluorescence de la dichlorotétrazine (1), la chlorométhoxytétrazine (2), la diméthoxytétrazine (3) dans le dichlorométhane, longueur d'onde d'excitation : 495 nm. [5]

1.4. Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome

electron donor	E_{ox} (V vs SCE)	k_{et} ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)
decamethylferrocene	-0.08	1.2×10^{10}
dimethylferrocene	0.26	9.5×10^9
ferrocene	0.37	7.6×10^9
<i>N</i> -benzyl-1,4-dihydronicotinamide	0.57	3.6×10^9
4-methyl- <i>N,N</i> -dimethylaniline	0.69	1.5×10^9
<i>N,N</i> -dimethylaniline	0.78	6.4×10^8
4-bromo- <i>N,N</i> -dimethylaniline	0.92	1.3×10^8
1,2,4-trimethoxybenzene	1.12	6.3×10^6
1,4-dimethoxybenzene	1.34	1.5×10^5

FIGURE 1.19 – Potentiel d'oxydation (E_{ox}) de divers donneurs d'électrons et constante de vitesse (k_{et}) de transferts d'électron photoinduits pour ${}^3\text{PhTz}^*$ dans l'acétonitrile desoxygénée à 298 K [18]

Figure 1.17. Les rendements quantiques sont très dépendants de la nature des substituants et varient entre 10^{-4} et 0,4. Sur la Figure 1.18 sont représentés les déclins de fluorescence enregistrés pour trois tétrazines différentes. Leur état excité se caractérise par une durée de vie relativement longue (typiquement entre 10 et 160 ns). Un tel ordre de grandeur peut s'expliquer par la nature de la transition responsable de l'émission : la transition $\pi^* - n$. Il est à noter enfin que les dérivés présentant les plus hauts rendements quantiques sont aussi ceux avec les durées de vie les plus longues.

La fluorescence de la tétrazine peut être inhibée par un grand nombre de donneurs d'électrons. En effet, le caractère électro-défficient de la tétrazine est encore plus prononcé à l'état excité qui présente donc un très grand pouvoir oxydant. Une application des équations de Rehm-Weller prévoit une augmentation du potentiel de réduction de 2,25 V en moyenne. Des représentations de Stern-Volmer ont clairement montré que meilleur est le donneur d'électron (avec un potentiel d'oxydation plus faible), plus rapide est l'inhibition. Ceci est en accord avec un mécanisme d'inhibition par transfert d'électron.

Enfin, la tétrazine présente un état triplet mais la phosphorescence de cet état est observée dans des conditions particulières. Le pouvoir oxydant de l'état triplet de la diphenyl-s-tétrazine a lui aussi été étudié. Sur le tableau de la Figure 1.19, il apparaît que plus le potentiel d'oxydation du donneur d'électron est faible, plus la constante cinétique de transfert d'électron photoinduit entre le donneur et la phényltétrazine acceptrice est grande.

Chimie computationnelle des dérivés de s-tétrazine

Afin de justifier les propriétés électrochimiques et photophysiques décrites ci-dessus, des calculs théoriques ont été menés.

Justification des propriétés photophysiques

Sur la Figure 1.20 sont représentées les orbitales frontières HOMO et LUMO ainsi que la HOMO-1 et la LUMO+1 calculées par DFT. Pour ces deux tétrazines, la HOMO est une orbitale à caractère n et la densité électronique est concentrée sur le cycle. La HOMO-1 est une orbitale à caractère π . Pour certaines tétrazines dont les substituants possèdent un caractère fortement donneur, ces deux orbitales sont inversées et il y a une forte participation du substituant dans la répartition de la densité électronique dans la HOMO à caractère π . La conséquence principale est que dans le cas HOMO-1 à caractère π , HOMO à caractère n, les tétrazines sont fluorescentes. Dans le cas inverse, elles ne le sont pas.

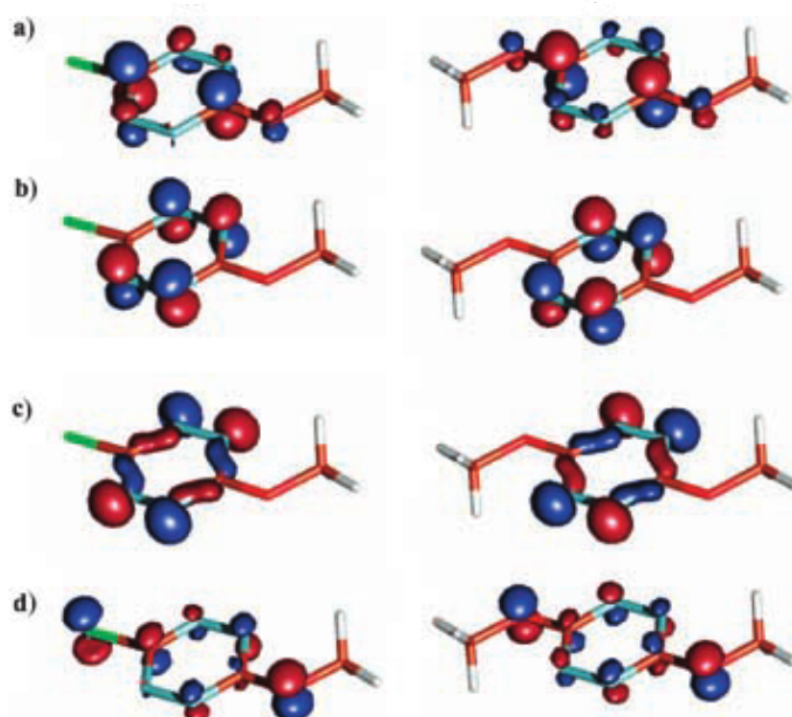


FIGURE 1.20 – Orbitales HOMO-1 (d), HOMO (c), LUMO (b) et LUMO+1 (a) de la chlorométhoxytétrazine (à gauche) et de la diméthoxytétrazine (à droite) [5]

1.4. Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome

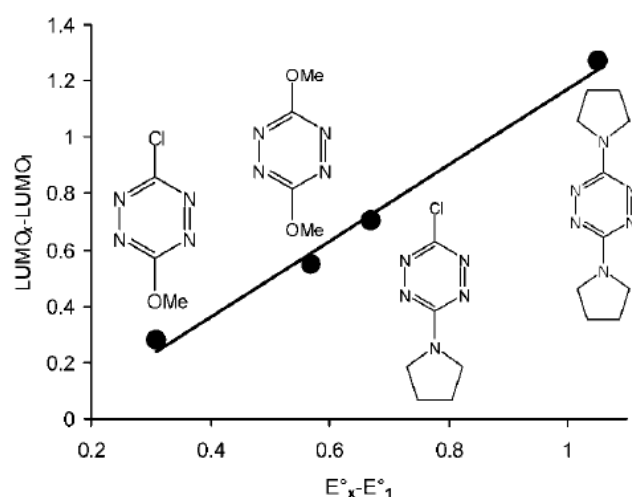


FIGURE 1.21 – Représentation graphique des énergies des orbitales LUMO de différentes tétrazines en fonction de la différence de leurs potentiels standards [18]

Justification des propriétés électrochimiques

Sur la Figure 1.21 sont représentés les énergies des LUMO de différentes tétrazines en fonction de leur potentiel standard. Les calculs permettent donc une bonne estimation des potentiels de réduction relatifs des différentes tétrazines par comparaison des énergies de leur orbitale la plus basse vacante, comme attendu.

Propriétés électrofluorochromes des dérivés de s-tétrazine

Finalement, les tétrazines sont des composés à la fois électroactifs et fluorescents. Le radical anion électrogénéré n'émet a priori pas de fluorescence (comme la plupart des radicaux organiques) et la réaction électrochimique d'une espèce à l'autre est réversible. Elles constituent donc de bons candidats à la possession de propriétés électrofluorochromes.

Ces propriétés ont été mises en évidence à plusieurs reprises avec la chlorométhoxytétrazine. [67]

Sur la Figure 1.22 sont représentés en haut les spectres d'absorption de la chlorométhoxytétrazine enregistrés lors de la conversion électrochimique de la molécule en radical anion : les deux bandes à 330 nm et 520 nm correspondant respectivement aux transitions $\pi-\pi^*$ et $n-\pi^*$ disparaissent au profit de trois nouvelles bandes à 255, 350 et 465 nm attribuées au radical anion.

Les points isobestiques et la bonne corrélation entre les spectres "simulés" par TD-DFT et expérimentaux du radical anion confirme sa stabilité sur la durée d'une expérience d'électrochimie telle que décrite ici. La réoxydation ne permet de régénérer que 85 % du composé neutre, alors que ce taux est de 100 % sur les cycles suivants, probablement du fait de phénomènes d'adsorption sur l'électrode.

Sur la Figure 1.22 sont représentés en bas les spectres d'émission en réduction puis en réoxydation enregistrés au cours d'une expérience similaire. Le spectre initial est caractéristique de la tétrazine. Il module en intensité sans changer de forme. Ainsi, la chlorométhoxytétrazine est électrofluorochrome et il apparaît clairement que le radical anion électrogénéré n'émet pas de fluorescence.

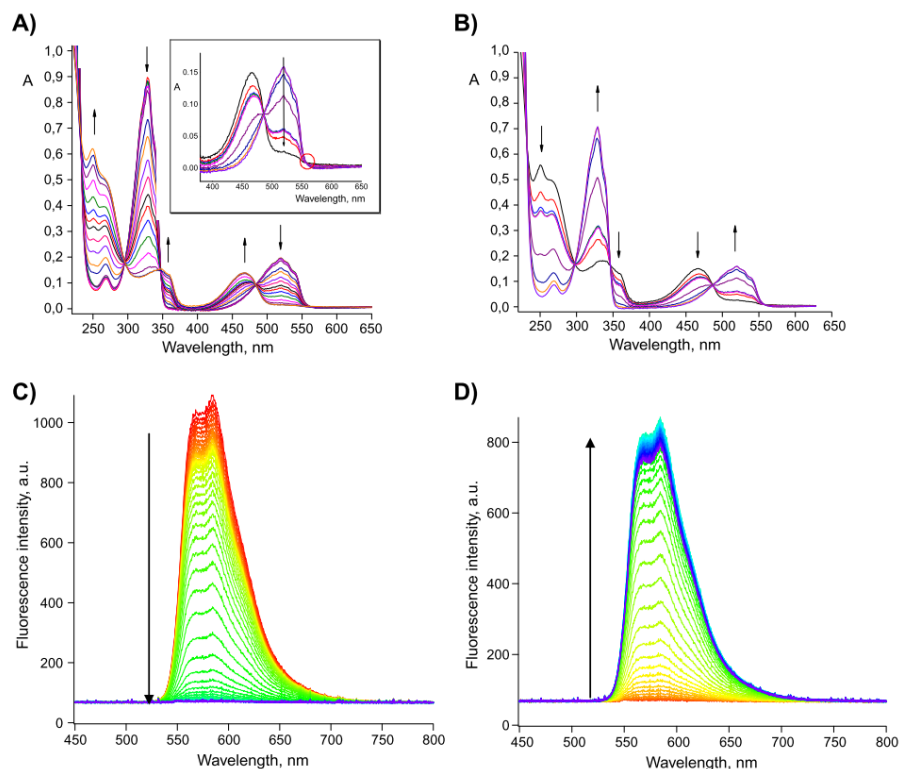


FIGURE 1.22 – Spectroélectrochimie UV-visible dans une cellule OTTLE (voir 1.6.2) à $T = 238$ K dans le dichlorométhane correspondant en A) à la réduction de la chlorométhoxytétrazine en son radical anion; en B) à la réoxydation du radical anion en composé neutre. En bas : spectroélectrochimie de fluorescence de la chlorométhoxytétrazine dans une cellule OTTLE positionnée sur un microscope en épifluorescence dans le dichlorométhane. Les spectres ont été enregistrés du rouge au bleu. C) réduction consécutive au passage de 0 V à -0,6 V. D) étape de réoxydation retour. [67]

1.4. Design moléculaire : les différents modes de fonctionnement d'un système électrofluorochrome

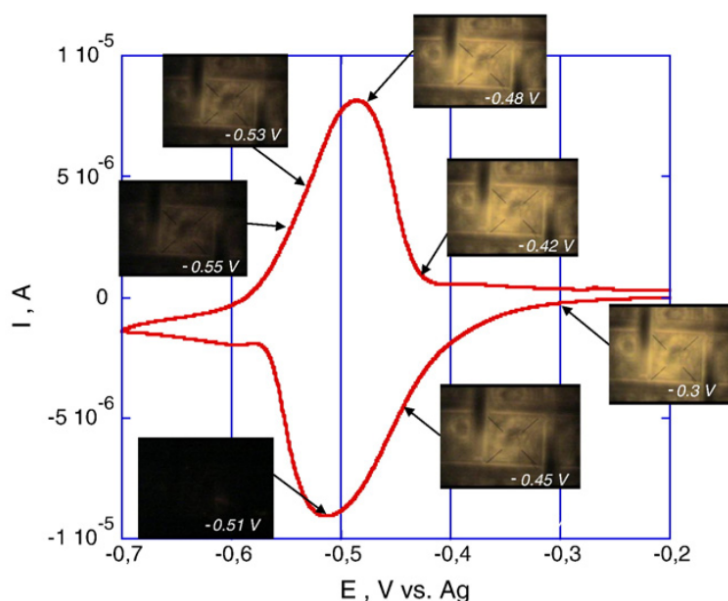


FIGURE 1.23 – Voltamétrie cyclique d'une solution de chlorométhoxytétrazine à la concentration de 1,5 M dans le dichlorométhane enregistré dans une cellule OTTLE positionnée sur un microscope de fluorescence (vitesse de balayage de $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.) Les encarts représentent des images de la cellule sous excitation laser à 515 nm à différents potentiels de l'électrode de travail Pt-minigrad au cours du cycle.[67]

La Figure 1.23 représente quant à elle la voltamétrie cyclique de la chlorométhoxytétrazine à laquelle ont été superposées les images de fluorescence enregistrées parallèlement à l'application du signal électrochimique. Quand le maximum de courant est atteint en réduction, la fluorescence disparaît : l'électrolyse est totale et le radical anion n'émet pas de fluorescence. La fluorescence est restaurée lors du balayage retour atteignant le maximum de brillance au pic anodique.

Afin de mieux visualiser la relation entre électrochimie et intensité de fluorescence, il est possible de construire des chronofluorogrammes, par exemple par intégration des spectres d'émission enregistrés au cours du temps parallèlement à l'application d'un signal en potentiel, et de les superposer au courant électrochimique enregistré dans le même temps. C'est ce qui est fait pour deux signaux potentiométriques différents sur la Figure 1.24 dans le cas toujours d'une solution de chlorométhoxytétrazine. Ces chronofluorogrammes permettent, entre autres choses, d'évaluer numériquement l'amplitude de la modulation en calculant par exemple des taux de modulation normalisés, ou de mettre en évidence les cinétiques d'extinction et de rallumage de la fluorescence.

1.4.4 Polymères et autres matériaux électrofluorochromes

Les fluorophores moléculaires ne sont pas les seules entités dont la fluorescence peut être contrôlée par conversion électrochimique. Certains polymères conjugués, par exemple, sont fluorescents à l'état neutre et perdent cette caractéristique lorsqu'ils sont oxydés ou réduits. [71] [72]

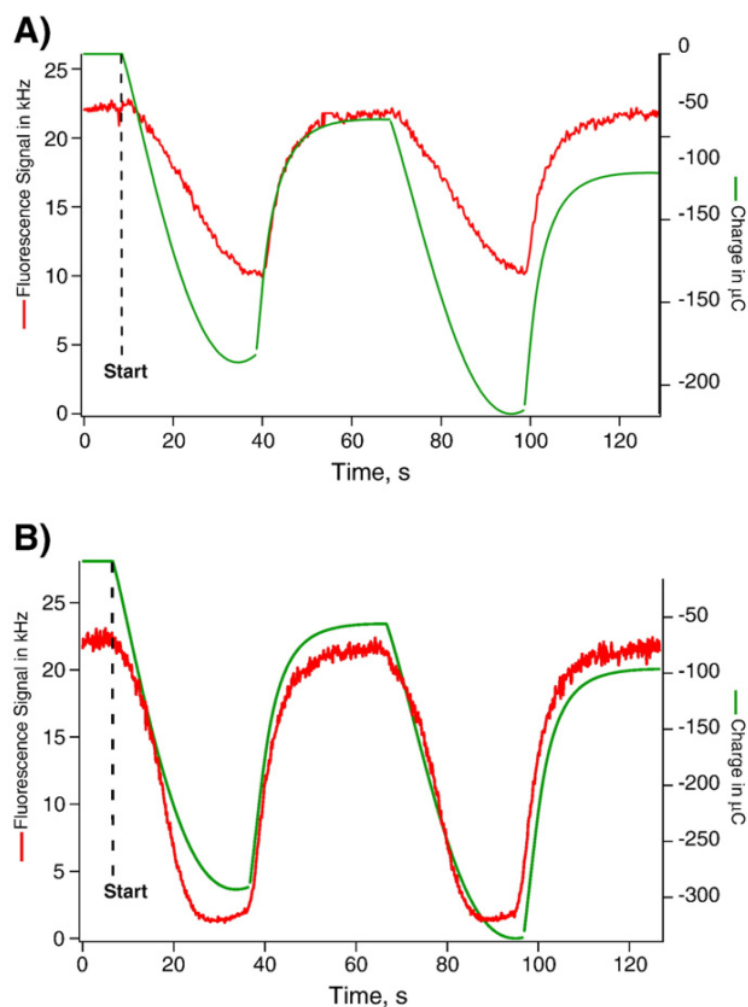


FIGURE 1.24 – Modulation électrochimique de l'intensité de fluorescence sous l'effet de la réduction de la chlorométhoxytétrazine (0,8 M dans le dichlorométhane / TBAH à 0,1 M) dans une cellule OTTE positionnée sur un microscope de fluorescence. (A) sauts de potentiel entre -0,2 V et -0,42 V. (B) sauts de potentiel entre -0,2 V et -0,48 V. Sauts de 30 s.[67]

1.5. Des applications diverses : de l'électrofluorochromisme en solution à l'électrofluorochromisme solide

On trouve également dans la littérature des exemples de polyoxométhallates électrofluorochromes. [98]

Les cristaux liquides ioniques, enfin, sont également des candidats prometteurs. Beneduci et son équipe ont développé pour la première fois un cristal liquide électrofluorochrome. [25]

Ces matériaux sont pour la plupart étudiés non pas en solution mais sous forme de films minces déposés sur l'électrode, et c'est le potentiel de cette électrode modifiée qui est modulé. De telles configurations ouvrent la voie à l'électrofluorochromisme solide et à de nombreuses applications telles que :

- le développement de dispositifs dont la fluorescence est modulable électrochimiquement,
- l'étude des cinétiques de transferts d'électrons.

Un aperçu de ces différentes applications est donné dans la partie suivante.

1.5 Des applications diverses : de l'électrofluorochromisme en solution à l'électrofluorochromisme solide

1.5.1 Exemple d'applications de l'électrofluorochromisme en solution

Au sein de l'équipe, des complexes d'iridium électrofluorochromes ont par exemple été greffés sur des nanoparticules métalliques. Les nanoparticules ainsi obtenues sont électrofluorochromes mais les taux de modulation sont plus faibles. L'objectif serait de mesurer un éventuel effet plasmonique sur cette propriété d'électrofluorochromisme. [70] [35]

1.5.2 La mise au point de dispositifs

Les matériaux électrofluorochromes peuvent trouver des applications dans le domaine des capteurs, de la mémoire optique ou encore de l'analyse biologique. Le développement de dispositifs et plus généralement de l'électrofluorochromisme solide représente donc un enjeu auquel plusieurs groupes ont déjà essayé de répondre.

Plusieurs types de dispositifs ont été proposés basés sur des stratégies différentes. L'objectif est d'y incorporer le matériau qui permette au dispositif de posséder le meilleur ratio ON/OFF, la meilleure cyclabilité (stabilité), la meilleure cinétique de conversion, etc.

Une stratégie possible consiste à encapsuler dans une matrice polymère la molécule électrofluorochrome, le polymère conducteur servant d'électrolyte. C'est la solution adoptée par Audebert. La molécule électrofluorochrome est une tétrazine. Le dispositif possède trois états et le potentiel appliqué permet de passer d'un état à l'autre. [45] et [46]

D'autres groupes préfèrent utiliser directement des polymères conducteurs fluorescents à l'état neutre déposés sous forme de film à la surface d'une électrode transparente. Une fois dopés p ou n, les polarons inhibent les excitons et le polymère conducteur n'émet plus. D'autres mécanismes peuvent intervenir tels que des réarrangement géométriques du film lors de la création de charges conduisant à une interaction plus grande avec le solvant ce qui offre une voie de désexcitation supplémentaire. Un tel mécanisme non faradique entraîne un retard au rallumage.

De tels polymères ont été directement intégrés à des dispositifs pour les rendre électrofluorochromes.[16] [93] Afin d'améliorer les propriétés des dispositifs, certains groupes travaillent sur la forme même du film polymère. Le groupe de Sun par exemple, a formé un film poreux afin de faciliter la diffusion du contre-ion et donc améliorer les cinétiques d'extinction et de rallumage.[92]

1.5.3 L'électrofluorochromisme à l'échelle de la monocouche

Les exemples précédents utilisant des polymères conducteurs sont des exemples d'électrofluorochromisme à l'échelle du film mince, pratiques pour le développement de dispositifs modulables.

La préparation d'électrodes modifiées et l'apparition de l'électrofluorochromisme à l'échelle de la monocouche permettent d'espérer le développement de dispositifs nanométriques. De plus, une telle géométrie permet, entre autre chose, d'éviter les limitations par la diffusion. Elle trouve donc aussi des applications plus fondamentales comme par exemple l'étude des cinétiques de transfert électronique, de l'interaction entre les molécules.

Ainsi, l'équipe de Lei [51] a immobilisé du crésyl-violet sur des électrodes d'TTO transparentes fonctionnalisées par des nanoparticules, ce qui lui a permis de déterminer la constante cinétique de transfert d'électron. L'équipe de Salverda a quant à elle immobilisé des protéines [86] de cuivre fluorescentes. Les voltamétries cycliques en fluorescence qu'ils obtiennent permettent l'observation directe des hétérogénéités thermodynamiques et cinétiques de la couche.

L'étude de l'électrofluorochromisme à de telles échelles nécessite des techniques très sensibles fortement résolues dans le temps et l'espace. Le développement de tels dispositifs expérimentaux prend donc une importance considérable. Dans la suite, différentes solutions proposées dans la littérature sont présentées.

1.6 Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux

Un dispositif expérimental couplant électrochimie et fluorescence est un dispositif capable d'enregistrer des variations d'intensité de fluorescence ou de spectres d'émission conjointement à l'excitation lumineuse du système émetteur et à l'application d'un signal électrochimique. Si ce dernier est un signal en potentiel, le courant électrochimique qui en résulte est une seconde variable de sortie que doit mesurer le dispositif expérimental.

1.6.1 Intérêt et enjeux

Un tel dispositif permet d'étudier et de caractériser les systèmes électrofluorochromes tels que ceux décrits dans la partie précédente : cinétiques d'extinction et d'allumage, taux de modulation, cyclabilité, etc. Toutefois, il n'est pas limité simplement à l'étude de ces systèmes. Il peut s'avérer utile dans d'autres conditions dès lors qu'un signal électrochimique impacte la fluorescence ou quand une double mesure de la fluorescence et de l'électrochimie apporte un complément d'information par rapport à l'utilisation d'une seule des deux techniques pour aboutir à une meilleure compréhension du phénomène étudié.

Donc, l'intérêt du couplage est double :

1.6. Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux

- soit l'électrochimie est utilisée pour déclencher un phénomène qui est détecté par fluorescence : modification d'une interface (sur laquelle est focalisée la détection optique), réaction électrochimique (espèce électrofluorochrome ou juste électroactive).
- soit ces deux techniques sont utilisées toutes les deux comme techniques d'analyse. Dans ce cas, l'électrochimie permet également la détection et apporte un complément d'information à la mesure de fluorescence pour une compréhension plus globale du phénomène étudié. Il s'agit alors de connaître les avantages et inconvénients de chaque technique pour exploiter au mieux leur complémentarité.

Lors de la mise en œuvre d'un tel dispositif, il faut faire deux choix :

- celui du fluorophore et éventuellement du médiateur redox,
- celui des appareils de mesures et de leur configuration.

La géométrie du dispositif expérimental est dictée par une contrainte, à savoir que l'électrochimie, l'excitation et la détection de fluorescence doivent avoir lieu dans la même zone de la solution. Or, l'électrochimie est un phénomène qui se fait au niveau d'une électrode de travail et les espèces électrogénérées se propagent ensuite par diffusion. Il y a donc deux possibilités :

- soit l'électrochimie est faite de façon macroscopique : l'électrolyse est alors globale, sur l'ensemble de la solution. Dans ce cas, la détection de fluorescence n'a pas besoin de focalisation précise. Pour obtenir une telle configuration, des équipes ont développé des cellules à couche mince.
- soit l'électrochimie n'est pas totale. Dans ce cas, il devient important de focaliser la détection optique au niveau de la couche de diffusion, ce que permettent les techniques de microscopie de fluorescence.

En ce qui concerne le choix de la sonde, l'expérimentateur peut décider :

- soit d'utiliser un médiateur redox et un fluorophore distincts, l'émission du fluorophore étant sensible aux variations locales causées par l'électrochimie.
- soit de choisir une unique sonde à la fois électroactive et fluorescente. Dans ce dernier cas, les espèces électrofluorochromes peuvent s'avérer intéressantes.

Dans la suite, ces différents aspects sont discutés au travers d'exemples de la littérature.

1.6.2 Utilisation de cellules spectroélectrochimiques de type "couche mince"

Il existe plusieurs contraintes géométriques à l'élaboration de telles cellules. En effet, elles doivent permettre la mesure de l'intensité de la lumière émise par l'échantillon sous l'effet d'un faisceau d'excitation (cellule pour spectrofluorimètre classique) et d'une électrolyse (cellule électrochimique à trois électrodes). De plus, le couplage entre électrochimie et fluorescence impose à l'électrode de travail d'être dans la zone éclairée par le faisceau d'excitation, ce qui ne doit pas être le cas pour la contre électrode et l'électrode de référence. Enfin, afin d'améliorer l'amplitude de la modulation de la photoluminescence mesurée, la géométrie de la cellule doit permettre une électrolyse complète ou au moins fortement avancée sur l'ensemble de la solution.

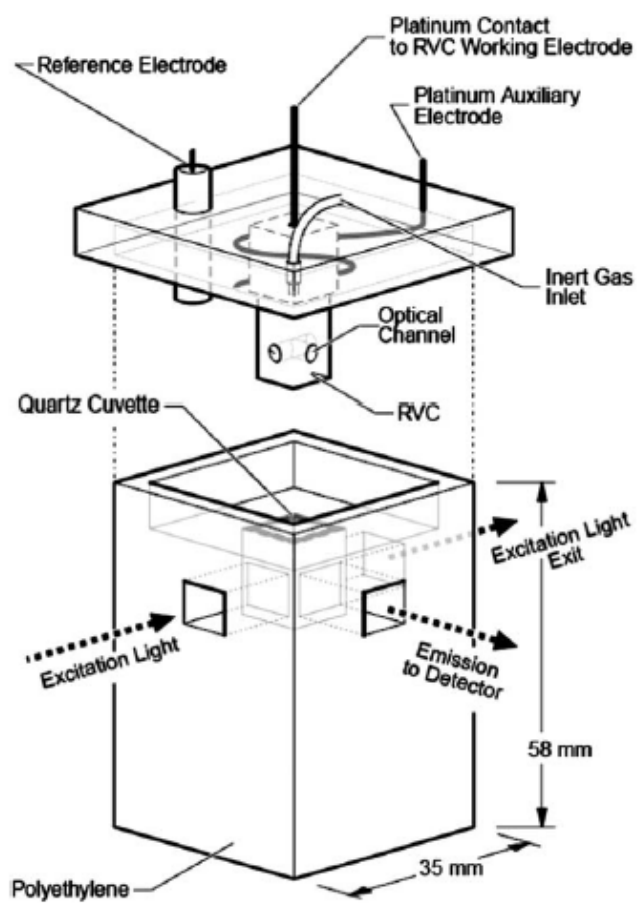


FIGURE 1.25 – Schéma de principe d'une cellule OTTLE adaptée à la fluorescence

1.6. Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux

Pour répondre à toutes ces contraintes, les cellules OTTLE (électrochimiques à couches minces optiquement transparentes), auparavant utilisées en spectroélectrochimie d'absorption, ont été adaptées à la spectroélectrochimie d'émission : le faisceau de sortie est mesuré perpendiculairement au faisceau incident (ou à 45°). Un schéma d'une telle cellule est représenté sur la Figure 1.25. Ces cellules ont par exemple été utilisées pour étudier la luminescence du radical anion de la tris(4-méthylphényl)amine et du radical anion du 9,10-anthracenedione électrogénérés in situ.[20]

Quelques années plus tard, la même équipe a mis au point des cellules à flux qui permettent de mesurer l'intensité de fluorescence en fonction du flux volumique de la solution. Un modèle théorique reliant ces deux grandeurs permet de calculer des constantes cinétiques de réactions en phase homogène couplées aux réactions électrochimiques. De cette façon, l'équipe de Compton a par exemple étudié la réduction du cristal violet et la formation du leucocrystal via un mécanisme EC.[21]

Une autre amélioration de ces cellules a ensuite été proposée. En effet, certains groupes ont construit des cellules à couche mince d'épaisseur variable. Le groupe de Levillain, par exemple, a voulu mettre au point une cellule qui puisse être utilisée pour coupler l'électrochimie à de nombreuses techniques spectroscopiques. Dans la cellule en question, la distance entre la fenêtre optique et l'électrode de travail peut varier entre 25 et 200 μm . Cette distance est ajustée de façon à obtenir les meilleures réponses électrochimiques et optiques possibles. Alors que le temps de conversion est de moins d'une seconde à 20 μm , il est d'environ 100 secondes à 200 μm . [26]

Ces cellules ont néanmoins des temps de réponses relativement longs et ne sont pas adaptées à l'étude de phénomènes courts. De plus, elles n'apportent pas d'information spatiale. Pour ces raisons, certains expérimentateurs préfèrent utiliser la microscopie de fluorescence.

1.6.3 Utilisation de la microscopie de fluorescence : vers une amélioration des résolutions spatiale et temporelle

Comme cela a déjà été discuté précédemment, il y a plusieurs façons d'envisager le couplage entre électrochimie et fluorescence. Si la microscopie de fluorescence est quasiment systématiquement utilisée pour imager un phénomène, l'électrochimie peut soit être utilisée comme déclencheur du dit-phénomène ou même être le phénomène faisant l'objet de l'étude, soit être une technique complémentaire de la fluorescence pour analyser le phénomène. [12]

Électrochimie et microscopie de fluorescence pour l'étude de systèmes électrofluorochromes

Comme avec les cellules de type couche mince, le couplage microscopie de fluorescence/cellule électrochimique peut servir à l'étude de nouveaux systèmes électrofluorochromes. Cependant, au lieu de mener l'étude sur l'ensemble de la solution, le microscope de fluorescence permet de limiter l'excitation et la collecte de lumière émise à une zone réduite de l'espace située dans la couche de diffusion de l'électrode de travail. Ceci permet de travailler sur des temps beaucoup plus courts et, par exemple, d'étudier des cinétiques d'extinction et de rallumage.

Un tel montage a par exemple été mis en place au sein du laboratoire. Il couple une cellule électrochimique à trois électrodes à un microscope de fluorescence (voir Figure 1.26). La cellule est posée sur la platine du microscope. Le substrat utilisé est

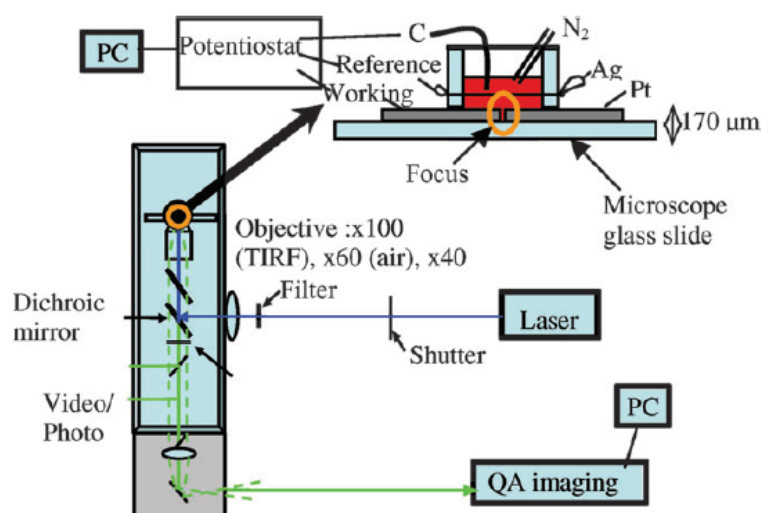


FIGURE 1.26 – Schéma du montage du laboratoire couplant cellule électrochimique à trois électrodes et microscope de fluorescence [69]

transparent, ce qui permet d'exciter et de collecter la fluorescence dans la cellule à travers ce même substrat. Il est également conducteur, ce qui permet de l'utiliser en tant qu'électrode de travail. Le phénomène d'extinction/rallumage est observé dans la couche de diffusion de cette dernière. Un tel montage a notamment servi à l'étude de fluorophores organiques, telles que les tétrazines, [69] ou de complexes organométalliques, comme par exemple un complexe de ruthenium [66]. Lorsque la cellule électrochimique classique est remplacée par une cellule de type couche mince, des taux d'extinction proche de 100 % sont enregistrés [67]. La caméra CCD est utilisée pour visualiser la modulation de la fluorescence, l'utilisation d'un spectrophotomètre permet de vérifier que la modulation observée est bien causée par l'espèce d'intérêt.

Le couplage électrochimie/microscopie de fluorescence n'est cependant pas réservé à l'étude de systèmes électrofluorochromes. Dans la suite, une liste non exhaustive des phénomènes étudiés dans la littérature par l'association de ces deux techniques est proposée. Il sera intéressant de constater que, dans certains cas, des auteurs ont fait le choix d'utiliser une espèce électrofluorochrome pour sonder le phénomène étudié. L'utilisation en tant que sonde dans des dispositifs analytiques est une autre application intéressante de ces systèmes.

Électrochimie et microscopie de fluorescence comme techniques d'analyse complémentaires

L'objectif est d'étudier spatialement et temporellement un phénomène, par exemple de nature biologique. Le choix de l'expérimentateur va se porter sur la technique d'analyse permettant d'obtenir la meilleure résolution possible dans l'espace et le temps. Il peut décider de coupler deux techniques ou plus si ces techniques s'avèrent complémentaires dans la mesure où leur association offre un complément d'information et/ou si l'information apportée par l'une est confirmée par l'autre.

La microscopie de fluorescence possède l'avantage d'une grande sensibilité de détection. De plus, si le phénomène étudié est inhomogène, l'association d'un fluorophore et du microscope de fluorescence va permettre d'imager directement cette

1.6. Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux

inhomogénéité dans le plan focal (x,y) . L'accès direct à une image selon (x,y) constitue un avantage notable par rapport aux techniques d'imagerie par balayage, tel que par exemple le microscope électrochimique à balayage (développé dans la partie suivante), qui ne peuvent imager que des phénomènes lents ou stationnaires. De plus, grâce à certains aménagements (tels que le TIRF ou le confocal), la microscopie de fluorescence permet d'obtenir également une bonne résolution spatiale que n'offrent pas les autres techniques électrochimiques dites "classiques" (autre que la microscopie).

L'électrochimie offre, quant à elle, une très bonne résolution temporelle (de l'ordre de la milliseconde) et permet d'identifier des espèces via leur potentiel redox et de les quantifier.

Le groupe d'Amatore a par exemple choisi d'utiliser l'association microscope de fluorescence - électrochimie pour l'étude de l'exocytose.[2] L'exocytose est un processus de communication intercellulaire au sein des systèmes vivants. Au cours de l'exocytose, une vésicule intracellulaire fusionne avec la membrane cellulaire et relâche son contenu dans l'espace extra-cellulaire sur un temps très court (de l'ordre de quelques millisecondes à quelques secondes). Pour l'étude de ce phénomène, une bonne résolution spatiale est nécessaire afin de visualiser les sites de relargage sur les cellules vivantes. La cinétique rapide de l'événement nécessite quant à elle une très bonne résolution temporelle.

Dans le cas de l'étude de l'exocytose, l'utilisation de macroélectrodes permet d'obtenir des informations temporelles sur l'instant où se produit l'exocytose avec une très bonne résolution et sur la nature des espèces relâchées dans le milieu extracellulaire grâce au potentiel appliqué à l'électrode. Elle n'offre cependant pas d'information sur la localisation de l'exocytose. Cette dernière est apportée par la microscopie de fluorescence en imagerie directe, même si sa résolution temporelle reste limitée par rapport à la durée du phénomène étudiée. Ces deux techniques sont donc complémentaires.

Microscopie de fluorescence pour l'imagerie d'un phénomène déclenché par l'électrochimie

En plus de technique d'analyse, l'électrochimie peut jouer le rôle de "déclencheur" d'un phénomène au niveau de la couche de diffusion de l'électrode de travail. Typiquement la polarisation de l'électrode va entraîner l'apparition d'un gradient de pH, la désorption d'une monocouche, etc. Ce phénomène est étudié par un microscope de fluorescence focalisé sur l'électrode de travail.

La nature locale du couplage permet, entre autre chose, l'étude de phénomènes de surface. Dans ce cas, le fluorophore "témoin" peut être immobilisé directement sur la surface de l'électrode de travail. Par exemple, l'équipe de Bizotto a étudié la désorption de monocouches autoassemblées sur des surfaces d'or. La désorption du fluorophore est induite par la réduction électrochimique de l'ancre thiol.[88] [14] Un tel couplage permet d'obtenir des informations sur les surfaces (faces cristallographiques, etc.). Il peut être utile pour l'étude de capteurs à ADN fonctionnalisés. [73] [64]

Il est à noter que la désorption de monocouches a également été étudiée par River-gandia mais par spectroscopie de fluorescence classique (non pas par microscopie). [82]

Microscopie de fluorescence pour l'imagerie de l'activité électrochimique

Dans la section précédente, il a été vu que l'électrochimie pouvait "déclencher" le phénomène d'intérêt ensuite étudié par microscopie de fluorescence. Dans certains cas, il se trouve que c'est l'électrochimie elle-même qui joue le rôle de phénomène d'intérêt. En effet, elle crée des inhomogénéités spatiales et temporelles et il peut être intéressant d'imager ces inhomogénéités afin d'améliorer directement les systèmes électrochimiques. Plusieurs types d'inhomogénéités électrochimiques peuvent être imagées par microscopie de fluorescence, dans le plan (x,y), voire dans les trois dimensions de l'espace.

Dans le plan (x,y), on peut par exemple imager les inhomogénéités de cinétique de transfert d'électrons selon la nature du matériau de l'électrode. Ainsi, Engström et son équipe ont cherché à identifier les sites actifs électrochimiquement sur des électrodes bimétalliques ou sur des électrodes composites lors de réactions telles que la réduction de l'oxygène, celle de l'eau ou également l'oxydation de cette dernière. Pour cela, ils ont mis à profit la propension de ces réactions à modifier le pH, en utilisant un fluorophore dont l'émission est sensible à ce dernier paramètre. Par exemple, la réaction de réduction de l'oxygène génère des ions hydroxydes. L'électrode est initialement immergée dans une solution contenant ce fluorophore à un pH légèrement acide et non tamponnée. La valeur initiale du pH est choisie de façon à ce que la fluorescence du fluorophore soit minimale. Puis, la réaction à l'électrode génère des augmentations locales de la concentration en ions hydroxydes : l'intensité de fluorescence mesurée localement est d'autant plus forte que cette concentration est forte, i.e. que la cinétique de transfert d'électrons est grande. [13]

Les inhomogénéités d'électroactivité imagées peuvent être de nature "volontaire", pour étudier différents matériaux d'électrodes ou pour faire du screening d'électrocatalyseurs par exemple; mais elles peuvent également être des défauts que la microscopie de fluorescence va permettre de mettre en évidence. [81] [83]

Plus simplement, lorsqu'une électrode, par exemple une microélectrode, est le siège d'une réaction électrochimique, elle génère une inhomogénéité spatiale puisqu'elle crée des gradients de concentration, de pH (comme vu avec Engström), etc. L'imagerie de ces gradients de pH ou de diffusion dans les trois dimensions de l'espace peut présenter un intérêt en soit, notamment pour le dimensionnement d'électrodes plus performantes. Des phénomènes de convection naturelle peuvent ainsi être mis en évidence. Ces aspects sont détaillés dans la partie suivante puisqu'ils nécessitent une configuration particulière du microscope de fluorescence.

Le choix de la configuration du microscope

Dans la section précédente, les différentes configurations dans lesquelles le couplage entre microscopie de fluorescence et électrochimie pouvait se révéler pertinent ont été détaillées. Afin de rendre cette association la plus efficace possible, le microscope de fluorescence peut être utilisé plutôt dans l'une ou l'autre des configurations détaillées dans la partie 1.3.3. Il s'agit de choisir celle permettant d'obtenir la résolution adaptée au phénomène étudié.

Le choix du TIRF Si le phénomène à imager a lieu au niveau de l'électrode de travail et s'il nécessite une très bonne résolution spatiale, il peut être intéressant d'utiliser la configuration TIRF. En effet, en plein champ (ou configuration d'épi-fluorescence), la lumière hors du plan focal contribue largement à l'ensemble de la

1.6. Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux

lumière collectée à travers l'objectif. La configuration TIRF permet d'améliorer le rapport signal sur bruit en s'affranchissant de cette lumière parasite provenant de la solution loin de l'interface. De plus, si le phénomène démarre à l'interface, il "disparaît" rapidement dans la solution. De ce point de vue, la configuration TIRF permet d'améliorer la résolution temporelle puisqu'elle permet de ne pas être aveuglé par les événements passés.

Cette solution a été adoptée par plusieurs groupes.

Dans notre équipe, la configuration TIRF a été mise en place à l'aide d'un objectif de grande ouverture numérique. Une telle configuration a permis d'obtenir les résultats décrits dans la partie précédente concernant l'étude de composés électrofluorochromes, que ce soient des composés organiques tels que les tétrazines ou des complexes organométalliques.[66] [65]

Le groupe d'Amatore également a adopté cette configuration pour l'étude de l'exocytose.[63] Contrairement à la configuration plein champ utilisée dans le premier article publié, la configuration TIRF offre une résolution spatiale suffisante pour observer spatialement les lieux où est relâché le fluorophore lors de l'exocytose. Le TIRF est dans leur cas réalisé avec un prisme, l'objectif se situant au-dessus de la cellule.

La technique du TIRF reste cependant contraignante dans la mesure où elle oblige l'expérimentateur à utiliser une électrode de travail transparente et conductrice (ex : ITO, etc.).

Le choix du confocal L'électrochimie peut déclencher un phénomène localisé au niveau de l'électrode de travail et ce phénomène va ensuite se propager par diffusion. L'objectif des expérimentateurs peut être d'imager simplement la surface de l'électrode de travail, par exemple pour détecter une différence d'électroactivité. Mais il peut vouloir imager l'ensemble du gradient de diffusion au cœur de la solution. Dans ce dernier cas, une très bonne résolution selon l'axe z peut s'avérer nécessaire non seulement au voisinage du substrat mais également dans la profondeur de la solution. Une telle résolution est permise avec la configuration confocale.

C'est ainsi que l'équipe de Rudd a réutilisé l'idée d'Engström et de ses collaborateurs pour rendre compte de phénomènes tels que les gradients de pH générés par les réactions électrochimiques aux électrodes, en remplaçant la microscopie de fluorescence plein champ par la microscopie confocale.[83] Une telle configuration permet par exemple d'imager la couche de diffusion autour d'une microélectrode d'or de 25 μm de diamètre. De cette façon, cette équipe a mis en évidence des phénomènes de convection naturelle, dont l'étude est utile pour affiner le dimensionnement d'électrodes. [27]

À l'échelle de la molécule unique, on peut citer les travaux de Scheurer. [28]

1.6.4 Le choix de la sonde : les deux stratégies

Une expérience de couplage entre microscopie de fluorescence et électrochimie nécessite une sonde électroactive et une sonde fluorescente qui vont émettre respectivement un signal de nature électrochimique et optique, ainsi qu'un dispositif expérimental capable de détecter les deux signaux. L'expérimentateur a donc plusieurs choix à faire :

- les raisons pour lesquelles utiliser un microscope de fluorescence et la question du choix de sa configuration ont été discutées dans les parties 1.6.2 et 1.6.3.

- celle du choix des sondes électroactive et fluorescente est étudiée dans cette section.

Dans les exemples précédemment décrits, deux grandes stratégies se dégagent quant à cette dernière problématique.

La première est une stratégie qualifiée d'indirecte dans laquelle la sonde électroactive et le fluorophore sont distincts. Une telle stratégie s'avère particulièrement "adaptée" lorsque le phénomène étudié n'est pas de nature purement électrochimique. Ainsi un fluorophore non électroactif mais dont l'intensité d'émission est sensible à la présence de composés spécifiques peut être utilisé dès lors que l'activité électrochimique affecte la concentration locale de cette espèce. Ces composés spécifiques peuvent être certains cations (par exemples oxonium), anions (par exemple hydroxydes), métaux lourds, espèces réactives de l'oxygène, etc.

C'est la stratégie adoptée par Rudd ou Engström qui ont utilisé la fluoresceine, fluorophore sensible aux variations locales de pH causées par la réaction électrochimique pour mettre par exemple en évidence les inhomogénéités d'électroactivité sur des électrodes bimétalliques.[83] [13]

La seconde est une stratégie qualifiée de directe dans laquelle le signal électrochimique mesuré est dû à la réduction ou à l'oxydation de la sonde électroactive et le signal de fluorescence à l'une des deux formes réduite ou oxydée de cette même sonde. C'est donc la réaction redox qui cause la modulation de fluorescence. Une telle stratégie est particulièrement adaptée lorsque le phénomène d'intérêt est la réaction électrochimique elle-même.

Elle a été utilisée par Doneux et Bouffier pour imager la couche de diffusion d'une microélectrode d'or par la réduction de la résazurine non fluorescente en résorufine fluorescente.[27] Elle a également été utilisée de façon indirecte par Guerrette. Dans l'expérience de ce dernier, utilisant un réseau d'électrodes bipolaires, le microscope de fluorescence image un pôle des électrodes pour rendre compte de l'activité électrochimique à l'autre pôle. Pour cela, la sonde fluorescente utilisée est encore une fois la résazurine. Sa réduction en résorufine crée de la fluorescence, et l'intensité de cette dernière rend compte de l'activité de la réaction d'oxydation à l'autre pôle.[38]

Parfois, l'utilisation d'une sonde à la fois électroactive et fluorescente peut être un avantage. Pour étudier l'exocytose par exemple, Amatore a utilisé une sonde redox et un fluorophore distincts. Toutefois, il observe beaucoup de signaux en fluorescence dits orphelins (correspondant à l'extinction d'une vésicule fluorescente de façon non corrélée à un signal électrochimique) et, réciproquement, de signaux électrochimiques orphelins (correspondant à un pic d'oxydation sans extinction de la fluorescence). Liu et son équipe ont repris ces travaux en utilisant le FFN102, une sonde à la fois électroactive et fluorescente sensible aux variations de pH.[56] Cette sonde "couplée" leur permet de diminuer le pourcentage de signaux orphelins de façon significative puisque l'efficacité passe de 22 % à 34 %.

Au sein de la stratégie directe, il est possible de distinguer encore deux sous-stratégies selon que la réaction d'extinction ou de rallumage de la fluorescence de la sonde soit réversible ou non. Dans les cas cités ci-dessus, la réaction électrochimique d'extinction ou d'allumage de fluorescence n'est pas réversible. Toutefois, l'utilisation d'une réaction réversible peut présenter des avantages, notamment un gain de résolution spatiale et temporelle. En effet, les travaux de Guerrette utilisant les réseaux d'électrodes bipolaires ont été repris par Oja qui a remplacé la résazurine par la dihydrorésorufine. Cette molécule, non fluorescente, peut être oxydée en résorufine fluorescente et, contrairement à la réduction de la résazurine, la réaction est

1.6. Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux

réversible. Dans ce cas, la réaction étudiée à l'autre pôle est une réduction. La réversibilité est utilisée pour régénérer la dihydrorésorufine à partir de la résorufine électrogénérée grâce à la présence de glucose dans la solution électrolytique.[77] [78] Cette astuce permet de supprimer la lumière parasite de la résorufine qui autrement s'accumulerait et donc, de gagner en résolution spatiale et temporelle. Un tel dispositif a permis à l'équipe d'imager la formation transitoire de la couche de diffusion autour d'une microélectrode de 25 μm de diamètre lors d'une expérience de voltamétrie cyclique.

Une telle sonde est à la fois électroactive et fluorescente. Une forme redox émet de la fluorescence et l'autre non. De plus, la réaction électrochimique permettant de passer de l'une à l'autre est réversible. Il s'agit donc d'une sonde électrofluorochrome. L'utilisation en tant que sonde apporte un intérêt supplémentaire au développement de nouveaux dispositifs présentant cette propriété.

1.6.5 La recherche de la résolution spatiale avec la microscopie électrochimique à balayage

Si le microscope de fluorescence a permis d'améliorer la résolution spatiale dans l'étude du couplage électrochimie-luminescence au niveau de la luminescence, l'utilisation d'une UME doit permettre d'augmenter la résolution au niveau de l'électrochimie. Le microscope électrochimique à balayage a déjà été couplé avec de nombreuses techniques optiques : l'imagerie par plasmons de surface [95], la chimiluminescence [31], la microscopie optique à balayage [50] [49], . Dans la suite, nous nous concentrerons sur les exemples de couplage de la microscopie électrochimique avec la microscopie de fluorescence.

Il y a plusieurs façons d'envisager ce couplage.

La pointe SECM peut permettre de déclencher localement un phénomène via une réaction électrochimique, phénomène qui va pouvoir être observé et/ou contrôlé par microscopie de fluorescence.

Par exemple, Heinze et ses collaborateurs ont utilisé ce couplage pour, d'une part, créer des gradients de pH locaux par génération électrochimique de H^+ et OH^- à l'aide de la pointe SECM et, d'autre part, mesurer ces gradients à l'aide de fluorophores sensibles au pH. [11] Sur la Figure 1.27, le dispositif expérimental utilisé ainsi que quelques exemples de cartographie de gradients de pH obtenus sont représentés.

Bard et ses collaborateurs ont, quant à eux, mis à profit ce couplage pour dessiner des motifs fluorescents de quelques centaines de nanomètres sur un substrat de verre à l'aide du SECM, et visualiser ces motifs par microscopie de fluorescence. Le schéma du dispositif expérimental utilisé ainsi qu'un exemple d'image de fluorescence obtenue sont reportés sur la Figure 1.28. Ils ont préparé en premier lieu des mono-couches autoassemblées fonctionnalisées par des azotures par immersion de substrat de verre dans une solution de 11-bromoundécyltrichlorosilane puis mise en présence de NaN_3 . Les substrats fonctionnalisés par des fonctions azotures sont mis en présence d'alcynes fluorescents et d'un complexe de cuivre (II). La pointe SECM est alors utilisée pour réduire localement le cuivre (II) Salen en cuivre (I) qui est alors capable de catalyser une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire pour immobiliser localement le fluorophore sur le substrat. [47]

La pointe SECM peut également être utilisée comme une sonde. Dans ce cas, l'expérimentateur bénéficie d'une détection locale double par électrochimie et par fluorescence. Les informations apportées par cette double détection peuvent être

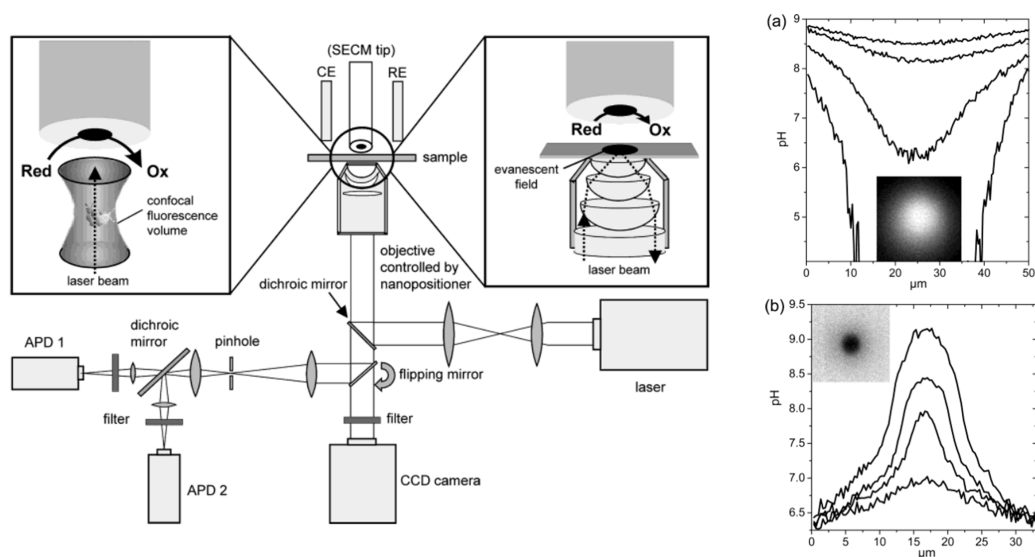


FIGURE 1.27 – Dispositif expérimental utilisé par Heinze et ses collaborateurs pour générer les gradients de pH et les observer par microscopie de fluorescence [11]

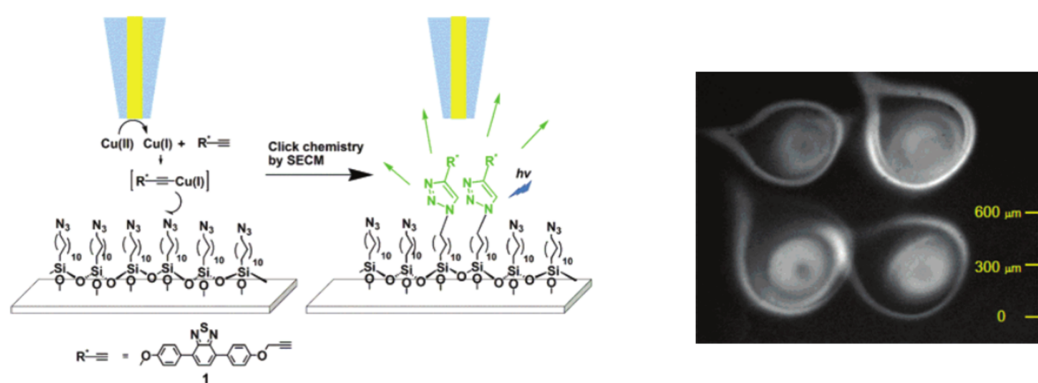


FIGURE 1.28 – Dispositif expérimental utilisé par Bard et ses collaborateurs pour "écrire sur le substrat" grâce à la pointe SECM. Images que fluorescence qui en résultent. [47]

1.6. Le couplage entre électrochimie et fluorescence : aspects expérimentaux

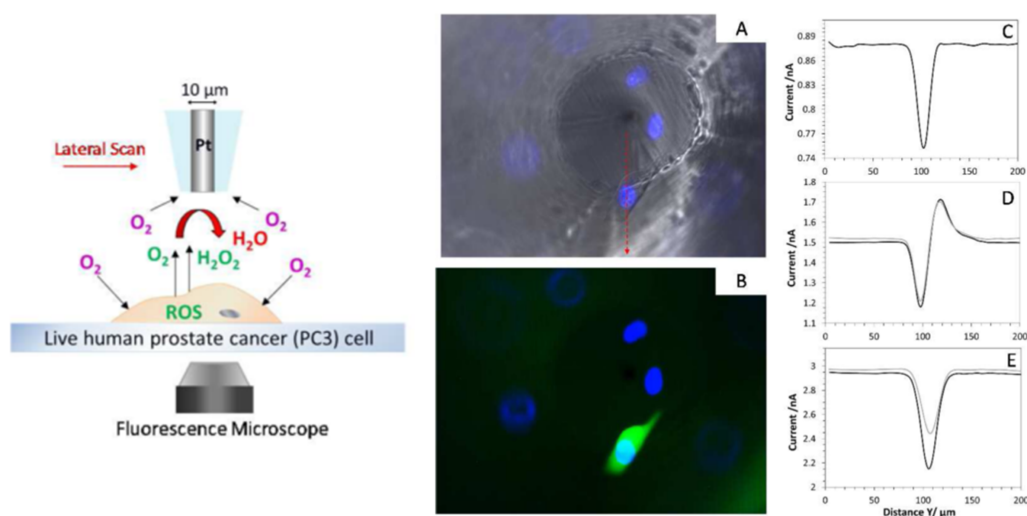


FIGURE 1.29 – Principe de la détection des ROS grâce au couplage SECM-microscopie de fluorescence. Courbe de courant enregistrées lors du balayage horizontal au-dessus des cellules. Images de fluorescence associées. [85]

croisées pour en vérifier la cohérence mais aussi se compléter l'une l'autre pour parvenir à une meilleure compréhension du phénomène observé.

S. E. Salamifar et R. Y. Lai ont notamment étudié la libération de ROS par des cellules du cancer de la prostate. Le schéma du dispositif expérimental utilisé est dessiné sur la Figure 1.29. Les cellules P3 sont déposées sur la platine du microscope de fluorescence. $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ est utilisé comme médiateur redox tandis que la pointe du microscope se déplace parallèlement à la surface de l'échantillon. L'application d'un potentiel de $-0,3 \text{ V}$ à la pointe lors de ce balayage donne une image topographique des cellules (voir Figure 1.29 C) : la présence de la cellule s'opposant à la diffusion du complexe de ruthénium à la surface de la pointe, on enregistre la décroissance du courant de pointe lorsque la distance pointe-cellule diminue. L'application d'un potentiel de $-0,65 \text{ V}$ étant suffisant pour réduire les ROS extracellulaires, le courant de pointe mesuré est alors la somme de deux contributions (Figure 1.29 D) : celle décrite précédemment sensible à la topographie tend à diminuer lorsque la pointe surplombe les cellules, tandis que celle due à la réduction des ROS extracellulaires tend à augmenter. Lors du passage de la pointe au-dessus d'une cellule, on observe d'abord une diminution du courant de pointe puis, à distance très faible pointe-cellule, une forte augmentation du fait de la réduction prépondérante des ROS. Enfin, le courant redescend à sa valeur initiale lorsque la pointe s'éloigne de la cellule. Les données recueillies ici par SECM sont cohérentes avec celles obtenues par le microscope de fluorescence, témoin des ROS intracellulaires (Figure 1.29 B). [85]

L'équipe d'Amemiya s'est intéressée à la perméabilité des noyaux cellulaires et plus particulièrement au complexe de pore nucléaire qui gère les transports nucléocytoplasmiques.[44] L'objectif est de comprendre comment délivrer efficacement au sein du noyau des macromolécules thérapeutiques. Pour cela, la pointe SECM est utilisée pour étudier quantitativement la perméabilité de ces complexes à différents ions sondes en fonction de leur caractère hydrophobe. Ils ont observé qu'à

concentration en ions extrêmement hydrophobes suffisamment importante, l'interaction entre le complexe et les ions devient assez significative pour perméabiliser les complexes nucléaires à des macromolécules auxquelles ils sont normalement imperméables. Dans leur cas également, la microscopie de fluorescence apporte une information complémentaire à la microscopie électrochimique puisqu'elle leur permet d'étudier le mécanisme de perméabilité. Selon ces études, le transport se fait à la périphérie des pores.

1.7 Conclusion

Les exemples de couplage entre microscope de fluorescence et microscope électrochimique restent cependant peu nombreux dans la littérature. De plus, dans tous les exemples cités dans le paragraphe 1.6.5, la réponse électrochimique et la réponse en fluorescence proviennent de composés différents. Une alternative pourrait donc être de développer des systèmes dans lesquels les signaux électrochimique et de luminescence sont mesurés simultanément à l'échelle locale à partir d'une unique molécule. Un tel développement fait l'objet des chapitres 4, 5 et 6. La preuve de concept est rapportée dans le chapitre 4. Dans le chapitre 5, le dispositif expérimental de couplage est adapté pour les mesures de fluorescence résolues en temps. Dans le chapitre 6, le concept est étendu aux milieux aqueux par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome soluble dans l'eau.

Avant cela, les chapitres 2 et 3 traitent du développement d'électrodes modifiées électrofluorochromes. Dans le chapitre 2, les électrodes sont modifiées par un film polymère. Dans le chapitre 3, elles le sont par une monocouche.

Chapitre 2

L'électrofluorochromisme de polymères conducteurs à base d'unité TBT fonctionnalisée par des chloroalkoxytétrazines

2.1 Mise en contexte et présentation des objectifs

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons au couplage entre électrochimie et fluorescence par la préparation d'électrodes fonctionnalisées par des films de polymères luminescents incorporant des tétrazines comme groupes pendants. Il est attendu de ces polymères des propriétés d'électrofluorochromisme originales puisqu'on espère contrôler le caractère électrofluochrome de la tétrazine non pas directement mais par l'intermédiaire du polymère (en oxydant puis réduisant ce dernier), mais également contrôler la luminescence du polymère (par réduction-oxydation des unités tétrazines). La stratégie adoptée est décrite plus en détail dans la section 2.1.3. Auparavant, les films de polymères étant préparés par électropolymérisation, une rapide description de cette technique et des propriétés des polymères conducteurs (plus particulièrement des propriétés de conduction et de luminescence) est proposée en introduction de ce chapitre, ainsi qu'un état de l'art sur l'intégration des tétrazines au sein de polymères conducteurs.

Dans la section 2.2, sont successivement décrites la synthèse des monomères (effectuée par l'équipe du laboratoire Architectures Moléculaires et Matériaux Nanostructurés de l'Institut Charles-Gerhardt de Montpellier) et la caractérisation de leurs propriétés photophysiques et électrochimiques. La section 2.3 est quant à elle consacrée aux polymères. L'électropolymérisation et la caractérisation électrochimique et photophysique de ces polymères y sont abordées. L'objectif est de s'assurer que la synthèse a bien permis d'obtenir des films de polymères, de montrer que la tétrazine est électroactive au sein des films et qu'une fluorescence peut être détectée.

Dans la dernière section 2.4, électrochimie et fluorescence sont couplées puisque l'électrofluorochromisme des films est étudié de deux façons :

- en regardant la fluorescence des tétrazines, l'électrochimie est utilisée pour oxyder ou réduire le polymère;
- en regardant la luminescence du polymère, l'électrochimie est utilisée pour réduire la tétrazine en radical anion puis régénérer la tétrazine neutre.

2.1.1 Les polymères conducteurs

Les différents modes de préparation des polymères conducteurs

La synthèse des polymères conducteurs peut se faire par voie chimique ou par voie électrochimique.

Parmi les méthodes de synthèse électrochimique, on distingue :

- la voie cathodique (la moins courante),
- la voie anodique (celle qui nous intéresse dans la suite).

La voie électrochimique est une méthode simple qui ne nécessite pas l'ajout d'un substrat redox sacrificiel ou d'un catalyseur redox. Elle est mise en œuvre sur une électrode de travail métallique immergée dans une solution électrolytique.

Le mécanisme de polymérisation envisagé par voie anodique commence par l'oxydation du monomère et la formation du radical cation associé. Deux radicaux cations réagissent ensemble et libèrent deux protons pour donner un dimère neutre.

Comme le dimère est plus oxydable, l'électrode l'oxyde à son tour en radical cation. Il réagit avec un nouveau radical cation du monomère pour former le trimère correspondant et ainsi de suite. Finalement, le polymère devenu insoluble précipite et forme un film à la surface de l'électrode de travail.

Le transfert d'électrons est assuré par l'électrode de travail. Le milieu électrolytique, composé du solvant et du sel de fond, doit permettre la solubilisation du monomère de départ. De plus, il doit rendre le radical cation le plus réactif possible afin d'éviter qu'il ne diffuse en solution favorisant ainsi la formation d'oligomères. Enfin, l'électrolyte-support intervient comme anion ou cation dopant dans la matrice polymère.

Le polymère ainsi formé est dit dopé-p. Dans la suite, nous définissons la notion de dopage et nous nous intéressons donc aux propriétés de conduction d'un polymère conducteur.

Propriétés de conduction des polymères conducteurs

Dans leur état neutre, les polymères conjugués sont non conducteurs, leur conductivité électrique étant de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-7} S/m. Cette conductivité augmente de plusieurs ordres de grandeur lorsque la chaîne est oxydée ou réduite. Cette opération est souvent appelée "dopage" par analogie avec les semi-conducteurs inorganiques. Le dopage p correspondant au polymère oxydé, et le dopage n au polymère réduit. Leur conductivité se rapproche alors de celle des métaux (jusqu'à 10^5 S/m).

L'analogie avec l'injection de charges dans les semi-conducteurs inorganiques est en réalité limitée. En effet, ce ne sont pas les porteurs de charges libres (les électrons et les trous) qui assurent la conduction mais des polarons et des bipolarons. Dans le semi-conducteur inorganique, trous et électrons se déplacent librement et le matériau acquiert un caractère métallique. Dans le polymère dopé, il peut être favorable énergétiquement de localiser la charge créée sur la chaîne et d'avoir autour de la charge une modification locale de la géométrie de la chaîne. Cette charge associée à la modification de la géométrie est appelée polaron. La création d'une deuxième charge peut se faire à un autre endroit de la chaîne. Dans ce cas, il y a formation d'un deuxième polaron. La création d'un polaron au même endroit de la chaîne nécessite la comparaison entre l'énergie nécessaire à l'appariement des deux électrons et celle gagnée par la relaxation de la structure. Si la deuxième est supérieure à la première,

2.1. Mise en contexte et présentation des objectifs

il y a création d'un bipolaron. Ces espèces ont la capacité de se déplacer le long de la chaîne par un mouvement des liaisons simples et des liaisons doubles.

Expérimentalement, cette propriété peut être étudiée par voltamétries cycliques successives en faisant varier la vitesse de balayage. L'objectif est d'étudier la relation entre courant de pic (courant faradique) ou courant de plateau (courant capacitif) et vitesse de balayage. En effet, une relation linéaire entre ces deux grandeurs est caractéristique d'un polymère conducteur, ou au moins d'un transfert de charge rapide (comparable à celui observé sur une électrode modifiée par une monocouche). Si la relation linéaire se trouve entre le courant et non plus la vitesse de balayage mais sa racine carrée, alors le transfert de charge est dit diffusif, le mécanisme est de type "hopping".

Propriétés de luminescence des polymères conducteurs

La description de la luminescence des polymères conducteurs fait appel, quant à elle, à la notion d'exciton. Ce dernier correspondrait à la recombinaison d'un polaron positif et d'un polaron négatif. La desexcitation de l'exciton ainsi formé produirait le phénomène de luminescence.

Propriétés d'électrofluorochromisme des polymères conducteurs

Pour certains polymères, cette luminescence peut être contrôlée par électrochimie car la présence de charges limite la desexcitation des excitons par voie radiative. Ils sont donc électrofluorochromes. Des exemples de polymères électrofluorochromes ont été donnés dans les sections 1.4.4 et 1.5.2.

2.1.2 Tétrazines et polymères conducteurs

Dans la littérature, les tétrazines ont déjà été incorporées dans des polymères conducteurs.

- soit directement dans la chaîne [4],
- soit comme groupe pendant fonctionnalisant la chaîne [54].

Ainsi, l'équipe d'Audebert a préparé un polymère dérivé du polythiophène intercalant des unités tétrazines directement dans la chaîne.[4] Le schéma du monomère ayant servi d'unité à ce polymère est représenté sur la Figure 2.1. Ce polymère est électroactif en oxydation et en réduction. Les voltamétries cycliques enregistrées en oxydation et en réduction sont représentées en bas à gauche de la Figure 2.1. Les deux entités thiophène et tétrazine influent l'une sur l'autre par leur caractère respectivement donneur et accepteur puisque le potentiel standard en oxydation du polymère ainsi obtenu est plus élevé que celui du polythiophène classique (+0,65 V contre +0,2 -0,4 V) tandis que celui en réduction est plus faible que celui de la bis-2thiényltétrazine (-1,2 V contre -0,9 V). Ceci est dû à l'accroissement des effets donneurs sur le noyau tétrazine lorsqu'on passe d'un à deux substituants thienyl. Toutefois, si le comportement est celui d'un polymère conducteur en oxydation, le transfert de charge cathodique est limité par un processus pseudo-diffusif. En effet, il est observé une relation linéaire entre les courants de pic anodique et la vitesse de balayage et entre les courants de pic cathodique et la racine carrée de la vitesse (Figure 2.1 en bas à droite). De plus, les propriétés spectroélectrochimiques du polymère ont été étudiées.

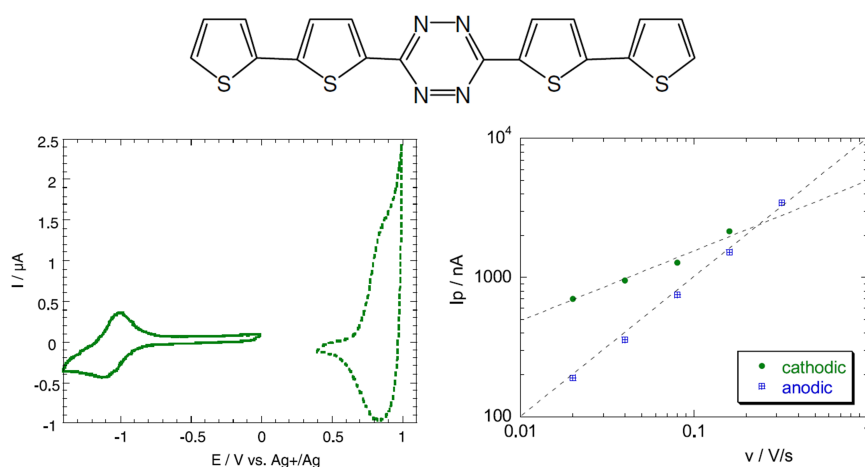


FIGURE 2.1 – En haut : monomère pour la synthèse du polymère contenant la tétrazine dans la chaîne. En bas à gauche : voltamétries cycliques en oxydation et en réduction d'un film de polymère dans le dichlorométhane sur électrode de platine, vitesse de balayage : 50 mV/s. En bas à droite : courants de pic, en oxydation et en réduction, enregistrés en fonction de la vitesse de balayage en échelle logarithmique.[4]

Dans des travaux postérieurs, la même équipe a incorporé la tétrazine à deux nouveaux polymères conducteurs, cette fois-ci en tant que groupe pendent.[54] Ainsi, des unités de carbazole et de thiophène-pyrrole-thiophène ont été fonctionnalisées par des groupes chloroalkoxytétrazines. Ces deux monomères, dont la voie de synthèse est représentée en haut de la Figure 2.2, présentent une fluorescence très faible (rendement inférieur à 1 %) probablement du fait d'un transfert d'électron photoinduit au sein de ces molécules bifonctionnelles. En effet, la tétrazine excitée possède un fort caractère oxydant et peut donc être facilement réduite par l'unité carbazole ou thiophène-pyrrole-thiophène. Réciproquement, le carbazole ou le thiophène-pyrrole-thiophène présentent à l'état excité un fort caractère réducteur. Ils peuvent donc être facilement oxydés par la tétrazine.

À partir de l'unité carbazole, il est possible d'obtenir un film polymère mais celui-ci s'avère très peu stable sous voltamétries cycliques successives en oxydation. De plus, la signature électrochimique de la tétrazine est visible une unique fois en réduction du fait probablement d'une dégradation ou d'une dissolution. Dans le cas de l'unité thiophène-pyrrole-thiophène au contraire, le film de polymère s'avère électroactif et très stable. En oxydation, le pic de courant varie linéairement avec la vitesse de balayage : le transfert d'électrons est donc rapide, comme visible dans l'encart en bas à gauche de la Figure 2.2. En réduction, la signature de la tétrazine est bien visible et se rapproche de celle d'un système idéal. A grande vitesse, le comportement tend vers celui d'un système pseudo-diffusif. Ceci est bien visible sur les voltamétries cycliques en bas à droite de la Figure 2.2. Un tel comportement diffère de celui observé pour le polymère avec la tétrazine incluse dans la chaîne pour lequel le transfert de charge était lent quelque soit la vitesse de balayage. Une telle différence peut venir du fait qu'incluse dans la chaîne, la tétrazine rigidifie beaucoup cette dernière.

2.1. Mise en contexte et présentation des objectifs

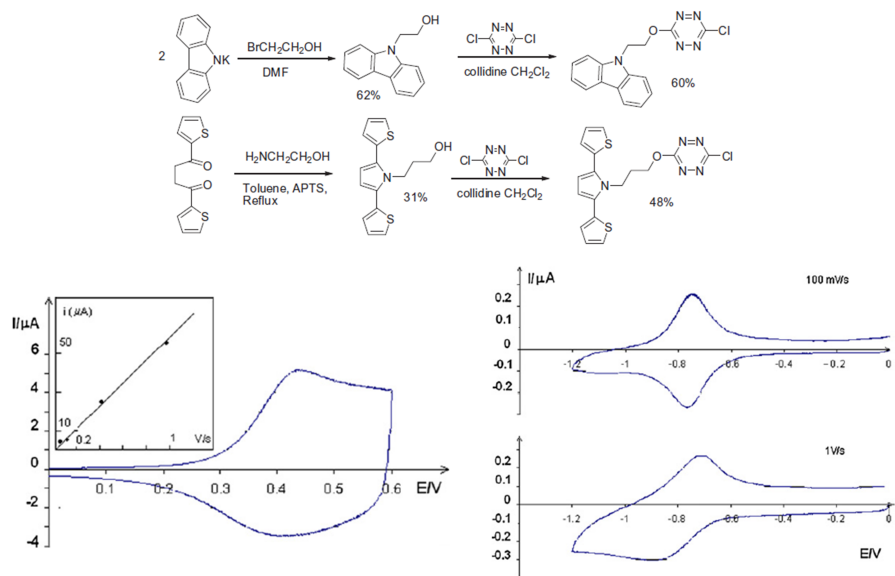


FIGURE 2.2 – En haut : schéma de synthèse des monomères utilisés pour la préparation des polymères à base de carbazole (CBTZ) et de thiophène-pyrrole-thiophène (SNSTZ). En bas à gauche : voltamétrie cyclique en oxydation d'un film de polymère poly(SNSTZ) préparé à partir de 10 cycles à 50 mV/s dans une solution de monomères à 10^{-3} M. Vitesse de balayage : 200 mV/s. Solvant : dichlorométhane. (encart : représentation des courants de pic en fonction de la vitesse de balayage) En bas à droite : voltamétrie cyclique en réduction d'un film de poly(SNSTZ) pour deux vitesses de balayage différentes. [54]

Dans le cadre de cette thèse, des travaux similaires ont été effectués en remplaçant les unités carbazole ou thiophène-pyrrole-thiophène par une unité thiophène-benzène-thiophène (TBT). Les objectifs et la stratégie employée font l'objet de la partie suivante.

2.1.3 Stratégie : choix des monomères et propriétés attendues du polymère correspondant

Dans la partie précédente, il a été vu que les polymères conducteurs pouvaient être électrofluorochromes. De plus, les travaux de l'équipe d'Audebert ont montré qu'il était possible d'incorporer la tétrazine dans un polymère conducteur, notamment en tant que groupe pendant, et que polymère et tétrazine restaient électroactifs respectivement en oxydation et en réduction.

L'objectif du travail effectué dans le cadre de cette thèse et décrit dans ce chapitre est de s'appuyer sur ces connaissances pour préparer un nouveau polymère luminescent incluant des unités tétrazines en tant que groupe pendant à partir duquel il sera possible de moduler électrochimiquement la fluorescence du polymère et des unités tétrazines au sein du polymère par le contrôle électrochimique du transfert d'électrons photoinduit entre les deux entités de ce polymère.[37]

En effet, cette modulation ne peut se faire par contrôle direct du degré d'oxydation de l'une ou de l'autre des deux unités mais de façon croisée. La modulation directe de la luminescence du polymère consisterait à oxyder la chaîne pour l'éteindre puis à la réduire pour l'allumer. La modulation directe de la fluorescence de la tétrazine consisterait, quant à elle, à réduire les unités tétrazines pour les éteindre puis à les réoxyder pour les rallumer. Or, à l'état neutre (état oxydé de la tétrazine et état réduit du polymère), la luminescence des deux unités s'inhibe mutuellement par transfert d'électron photo-induit (voir l'étude la fluorescence des monomères au paragraphe 2.2.2). En effet, la tétrazine à l'état excité est un très bon accepteur d'électron et est donc facilement réduite par le TBT neutre. Le TBT à l'état excité est, quant à lui, un très bon donneur d'électrons et peut donc facilement être oxydé par la tétrazine. Un contrôle croisé est par contre envisageable : si la fluorescence des unités "tétrazines" est inhibée à l'état neutre, l'oxydation du polymère doit permettre de bloquer le transfert d'électron photoinduit et donc de restaurer leur fluorescence. De même, si le polymère n'émet pas à l'état neutre, la réduction des unités tétrazines doit restaurer la luminescence du polymère.

Le polymère attendu doit donc être électrofluorochrome et présenter trois états : polymère éteint/tétrazines allumées, polymère éteint/tétrazines éteintes et polymère allumé/tétrazines éteintes, le passage d'un état à l'autre étant contrôlé par un mécanisme différent du mécanisme classique d'excitons mais se rapprochant de celui des dyades moléculaires décrit dans le premier chapitre.

Le choix de l'unité de polymérisation s'est porté sur le TBT puisque le polyTBT est un polymère luminescent dont la luminescence peut être décrite classiquement par le mécanisme des excitons. De plus, le potentiel standard associé à son oxydation est plus haut que ceux des polymères issus du carbazole ou du thiophène-pyrrole-thiophène précédemment utilisés par l'équipe d'Audebert, ce qui fait de ce polymère un meilleur candidat pour le contrôle électrochimique du transfert d'électron photoinduit. En effet, on espère ainsi que ce potentiel soit suffisamment haut pour éviter, à l'état déjà oxydé de la chaîne du polymère, le transfert supplémentaire d'électrons entre le polymère et la tétrazine, ce qui correspondrait à une suroxydation de la chaîne et ce qui ne permettrait pas de restaurer la fluorescence de la tétrazine.

2.2. Les monomères : synthèse et caractérisation

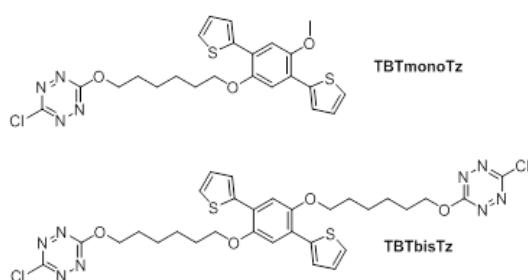


FIGURE 2.3 – Schéma des deux monomères TBTmonoTz et TBTbisTz utilisés pour l'électropolymérisation

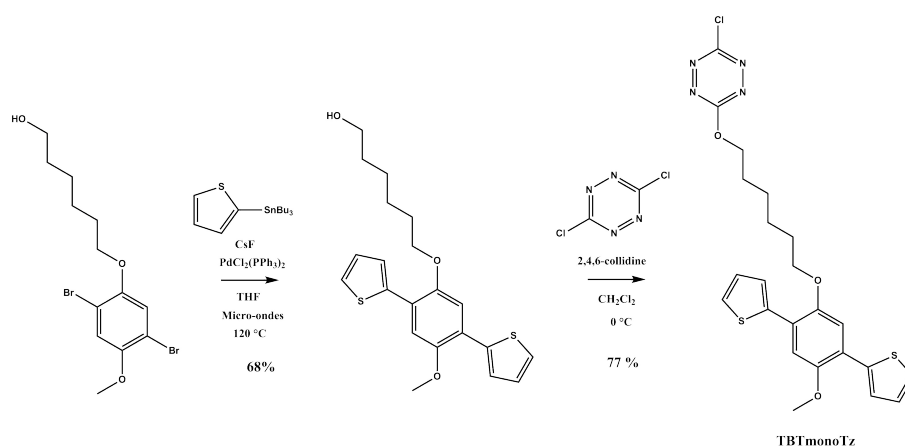


FIGURE 2.4 – Schéma de la synthèse du monomère TBTmonoTz

Les deux monomères de TBT fonctionnalisés par une et deux unités de tétrazine, notés respectivement TBTmonoTz et TBTbisTz, et utilisés par la suite pour l'électropolymérisation, sont représentés sur la Figure 2.3. Dans la partie suivante sont décrites leur synthèse et leurs caractérisations électrochimique et photophysique.

2.2 Les monomères : synthèse et caractérisation

2.2.1 Synthèse des monomères

La synthèse des deux monomères a été réalisée au laboratoire des Architectures Moléculaires et Matériaux Nanostructurés de l'Institut Charles-Gerhardt de Montpellier.

Les deux unités TBT fonctionnalisées respectivement par une et deux tétrazines sont formées par des voies de synthèse similaires en deux étapes résumées sur les schémas des Figures 2.4 et 2.5. La première étape est un couplage de Stille entre le benzène dibromé substitué par un ou deux groupes hydroxyles et le 2-tributylthiophène. Ce couplage est réalisé sous irradiation micro-ondes en présence de PdCl₂(PPh₃)₂. La deuxième étape permet de fonctionnaliser le TBT formé lors de la première étape par la tétrazine. Pour cela, il est mis en solution dans le dichlorométhane avec la dichlorotétrazine en présence d'une base : la 2,4,6-collidine à 0 °C. La réaction de la dichlorotétrazine avec le TBT substitué par un ou deux alcools fournit respectivement les monomères TBTmonoTz et TBTbisTz avec des rendements de

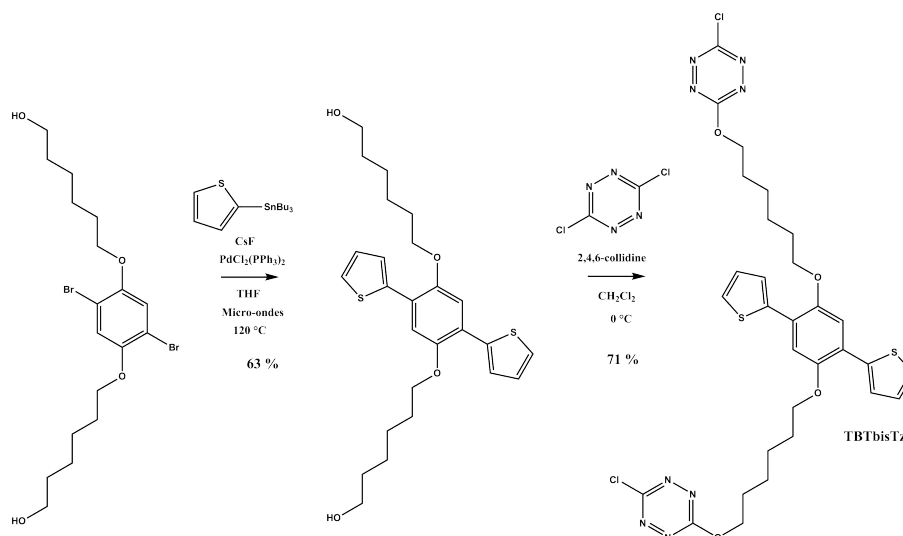


FIGURE 2.5 – Schéma de la synthèse du monomère TBTbisTz

77 et 71 %. Cette substitution nucléophile aromatique est probablement non quantitative du fait de la dégradation du TBT. En effet, ce dernier est potentiellement photooxydable par la tétrazine à l'état excité.

2.2.2 Les propriétés photophysiques

Les propriétés d'absorption

Les spectres d'absorption des deux monomères sont représentés sur la Figure 2.6. Dans la région UV (entre 300 et 400 nm) apparaît l'absorbance caractéristique du TBT. Cette large bande masque la bande UV de faible intensité de la tétrazine habituellement visible autour de 330 nm (voir paragraphe 1.4.3). La bande de la tétrazine dans la région entre 500 et 550 nm est par contre largement visible. Il est à noter l'intensité relative des bandes d'émissions des contributions du TBT et de la tétrazine respectivement vers 350 nm et 525 nm représentatives grossièrement du nombre d'unités tétrazines par unité de TBT.

Les propriétés d'émission

Les deux monomères présentent une fluorescence relativement faible.

Les spectres d'émission du monomère TBTmonoTz enregistrés lorsque sont excités le TBT (longueur d'onde d'excitation = 360 nm) ou la tétrazine (longueur d'onde d'excitation = 520 nm) sont représentés respectivement par · · · et · - · - · sur le graphe de la Figure 2.7. Ainsi, l'excitation du TBT fait apparaître une bande d'émission autour de 420 nm tandis que celle de la tétrazine donne une fluorescence dont le maximum se situe à 570 nm.

Les spectres d'émission obtenus pour le monomère TBTbisTz aux deux longueurs d'excitation représentés sur la Figure 2.8 sont relativement semblables à ceux enregistrés pour le monomère TBTmonoTz. On retrouve les fluorescences caractéristiques du TBT et de la tétrazine respectivement autour de 420 nm et de 570 nm.

Pour chacun des monomères, les rendements quantiques ont été évalués aux deux longueurs d'onde d'excitation. Les résultats sont reportés dans le Tableau 2.1.

2.2. Les monomères : synthèse et caractérisation

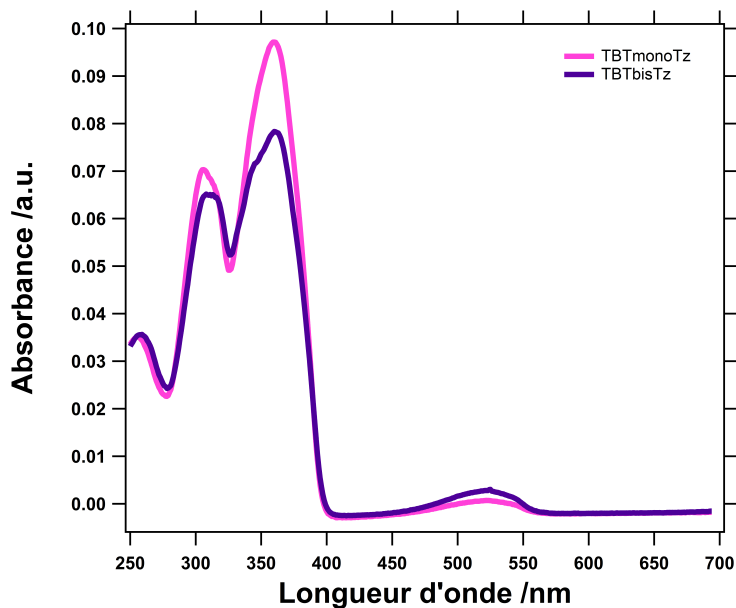


FIGURE 2.6 – Spectres d’absorption des deux monomères. En rose, celui du TBTmonoTz ($\lambda_{max1} = 360$ nm et $\lambda_{max2} = 522$ nm). En violet, celui du TBTbisTz ($\lambda_{max1} = 360$ nm et $\lambda_{max2} = 521$ nm). Les monomères sont en solution dans le dichlorométhane à une concentration de l’ordre du μM . Les valeurs des coefficients d’extinction molaires sont données en ordonnée.

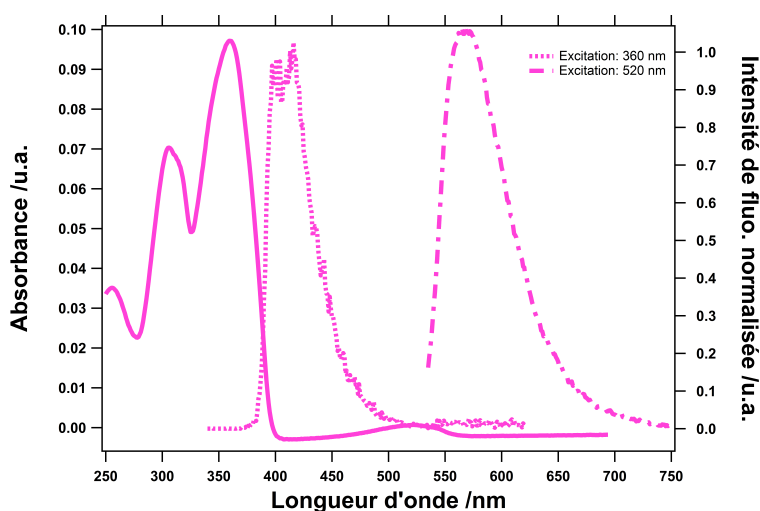


FIGURE 2.7 – Spectres d’absorption (trait plein) et d’émission (traits pointillés) du monomère TBTmonoTz. Pour l’enregistrement des spectres d’émission, les longueurs d’onde d’excitation ont été choisies respectivement égales à 360 nm et 530 nm.

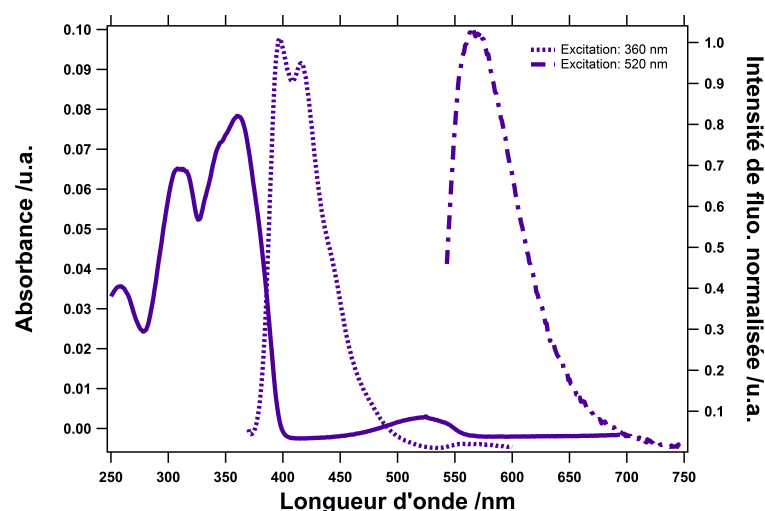


FIGURE 2.8 – Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (traits pointillés) du monomère TBTbisTz. Pour l'enregistrement des spectres d'émission, les longueurs d'onde d'excitation ont été choisies respectivement égales à 360 nm et 530 nm

Rendement quantique (en %)	TBTmonoTz	TBTbisTz
tétrazine	0,26	0,24
TBT	2,13	0,81

TABLEAU 2.1 – Rendements quantiques calculés pour les monomères TBTmonoTz et TBTbisTz lorsqu'ils sont excités à 360 nm (excitation du TBT) et à 520 nm (excitation de la tétrazine)

Les faibles rendements quantiques sont probablement dus à une inhibition mutuelle entre TBT et tétrazine. En effet, la tétrazine à l'état excité présente un fort caractère oxydant et oxyde probablement le noyau TBT. Au contraire, le TBT à l'état excité est réducteur et réduit donc sans doute le noyau tétrazine. Cette hypothèse est renforcée par le rendement quantique plus faible du TBT au sein du TBTbisTz : la présence de deux unités tétrazines inhibe plus fortement le noyau TBT.

2.2.3 Les propriétés électrochimiques

Les deux monomères sont électroactifs aussi bien dans l'acétonitrile que dans le dichlorométhane. Sur la Figure 2.9 sont représentées les voltamétries cycliques obtenues pour chacun des monomères en réduction puis en oxydation. Cet ordre est choisi afin d'éviter la modification de l'électrode du fait de la polymérisation du monomère. Sur les deux voltamogrammes apparaissent la réduction réversible de l'entité tétrazine ainsi que l'oxydation non réversible de l'entité TBT qui polymérise. Il semble qu'il y ait très peu d'influence mutuelle des deux systèmes l'un sur l'autre. Un tel comportement est comparable à celui observé pour des systèmes tétrazines-triphénylamine, les deux entités étant reliées par des liens non conjugués.

Dans la suite sont décrites les électropolymérisations des deux monomères précédemment décrits. Les polymères ainsi obtenus sont aussi caractérisés électrochimiquement et photophysiquement.

2.3. Les polymères : électropolymérisation et caractérisation

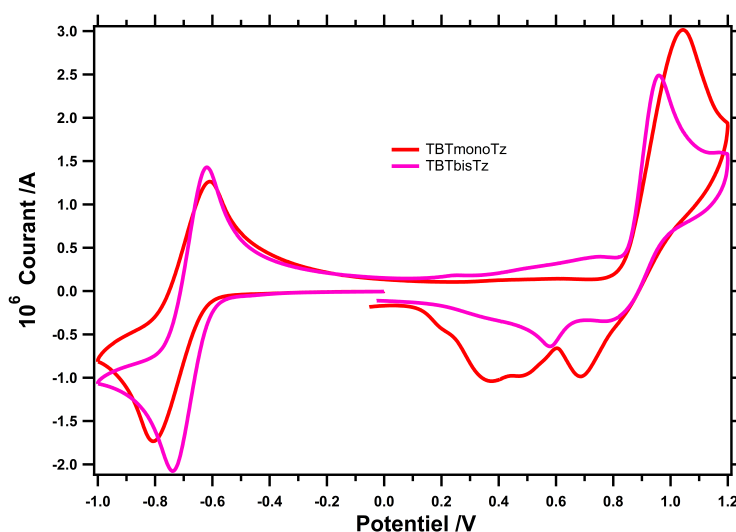


FIGURE 2.9 – Voltamétries cycliques successives enregistrées d’abord en réduction puis en oxydation pour les deux monomères TBTmonoTz et TBTbisTz à 50 mV/s en solution dans le dichlorométhane (respectivement à $3 \cdot 10^{-3}$ M et $2 \cdot 10^{-3}$ M) en présence de tétrabutylammonium hexafluorophosphate à 0,1 M. L’électrode de travail est un disque de carbone de 1 mm de diamètre, la référence un fil d’argent et la contre-électrode un fil de platine.

2.3 Les polymères : électropolymérisation et caractérisation

2.3.1 Électrosynthèse des polymères

Immergée dans une solution électrolytique de monomère, l’électrode de travail est polarisée de façon à oxyder le monomère qui commence à polymériser. Le polymère en formation précipite et forme un film directement sur cette électrode.

Pour les deux monomères, le dichlorométhane et le tétrabutylammonium hexafluorophosphate (0,1 M) sont utilisés respectivement en tant que solvant et sel de fond. La solution est dégazée à l’argon préalablement à l’électropolymérisation.

Sur la Figure 2.10 est représentée la synthèse accumulative du polymère formé à partir du monomère TBTmonoTz sur électrode de carbone (disque de 1 mm de diamètre). Dans la suite, ce polymère est noté poly(TBTmonoTz). L’allure des courbes est conforme à ce qui est attendu dans ce type d’expérience. La première voltamétrie présente un unique pic en oxydation correspondant à l’oxydation du monomère. Cette oxydation est irréversible. Le balayage retour permet la réduction du film nouvellement formé. Dès le deuxième cycle apparaissent successivement les pics correspondant à l’oxydation du film et du monomère. Cycle après cycle, la réponse du polymère est de plus en plus importante.

Sur la Figure 2.11 est représenté un exemple de synthèse accumulative du polymère formé à partir du TBTbisTz, noté quant à lui poly(TBTbisTz). Cette synthèse semble beaucoup moins efficace. Si un film conducteur se dépose sur l’électrode (ce film est bien visible lorsque l’électrode de carbone est remplacée par une lame transparente d’ITO), il est difficile de conclure s’il s’agit réellement d’un polymère ou simplement d’un mélange d’oligomères plus petits.

De la même façon, des films polymères peuvent être obtenus par chronoampérométrie. Un exemple de courbe de courant mesuré lors de la formation d’un film

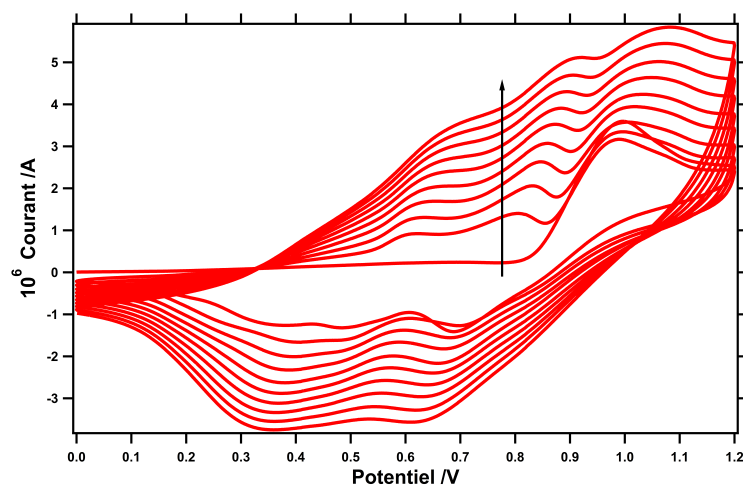


FIGURE 2.10 – Synthèse accumulative du poly(TBTmonoTz) par voltamétries cycliques successives dans une solution de TBTmonoTz ($3 \cdot 10^{-3}$ M) contenant du tétrabutylammonium hexafluorophosphate à 0,1 M. Départ en oxydation. Le polymère forme un film sur l'électrode de travail, un disque de carbone (diamètre 1 mm). Vitesse de balayage : 50 mV/s. Electrode de référence : fil Ag | AgCl. Contre électrode : fil de platine.

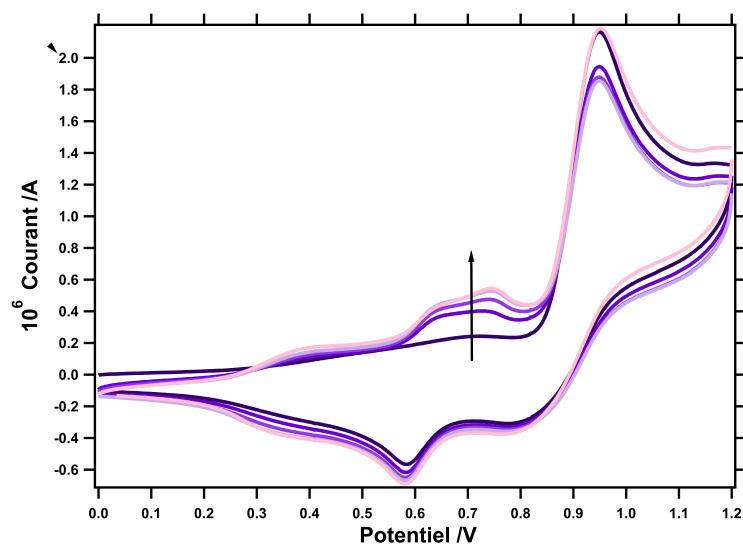


FIGURE 2.11 – Synthèse accumulative du poly(TBTbisTz) par voltamétries cycliques successives dans une solution de monomère TBTbisTz ($3 \cdot 10^{-3}$ M) contenant du tétrabutylammonium hexafluorophosphate à 0,1 M. Départ en oxydation. Le polymère forme un film sur l'électrode de travail, un disque de carbone (diamètre 1 mm). Vitesse de balayage : 50 mV/s. Electrode de référence : fil Ag | AgCl. Contre électrode : fil de platine.

2.3. Les polymères : électropolymérisation et caractérisation

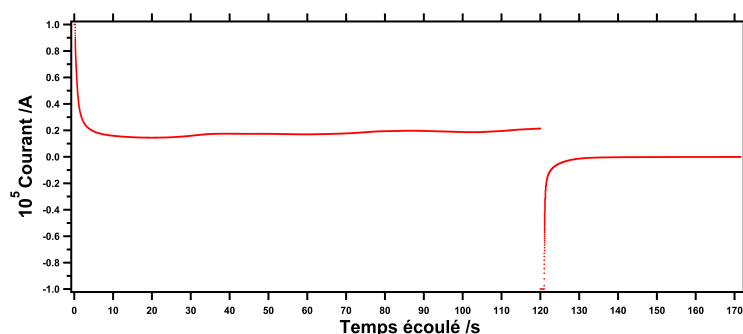


FIGURE 2.12 – Synthèse d'un film de poly(TBTmonoTz) par chronoampérométrie sur une électrode de carbone (disque de 1 mm de diamètre). L'électrode est immergée dans une solution de monomère TBTmonoTz et de tétrabutylammonium hexafluorophosphate dans le dichlorométhane préalablement désoxygénée à l'argon. Electrode de référence : fil Ag | AgCl. Contre électrode : fil de platine. Potentiel à l'oxydation pour l'électropolymérisation : 1,2 V. Potentiel lors de la réduction du film nouvellement formé : 0 V.

de poly(TBTmonoTz) par cette technique est reportée sur la Figure 2.12. La Figure 2.13 représente, quant à elle, un exemple identique de synthèse à partir de l'autre monomère TBTbisTz. La chute de courant initiale est attribuée à la consommation du monomère à l'électrode : la cinétique est limitée par sa diffusion. Finalement, le courant atteint un palier dans le cas du poly(TBTbisTz) voire remonte dans celui du poly(TBTmonoTz). Cette phase est associée à la croissance du film en trois dimensions. Si la croissance est efficace, la surface de l'électrode et donc le courant augmentent. Dans le cas où des réactions parasites "consomment" du radical cation, le rendement de polymérisation diminue et le courant stagne. Ainsi, ces courbes de courant confirment un comportement à la polymérisation différent des deux monomères.

2.3.2 Caractérisation électrochimique des polymères

L'électroactivité des polymères ainsi obtenus est caractérisée par voltamétrie cyclique en oxydation et en réduction. En pratique, l'électrode de travail est sortie de la solution contenant le monomère, rincée, puis immergée dans une solution électrolytique de tétrabutylammonium hexafluorophosphate à 0,1 M dans le dichlorométhane ou l'acétonitrile préalablement dégazée.

Ainsi, sur la Figure 2.14 sont représentées les voltamétries cycliques en oxydation (Figure 2.14 a) et en réduction (Figure 2.14 b) obtenues à partir d'un film de poly(TBTbisTz) formé préalablement par trois voltamétries cycliques successives (vitesse de balayage : 50 mV/s) sur une électrode de platine (disque de diamètre 1 mm) dans une solution de monomère à la concentration 10^{-3} M. La vitesse de balayage utilisée est de 200 mV/s. En oxydation, c'est la chaîne du polymère qui est oxydée puis réduite lors du balayage retour. Le film de poly(TBTbisTz) présente un comportement typique de polymère conducteur standard. En réduction, le pic observé semble pouvoir être associé à la réduction de la tétrazine en radical anion. Lors du balayage retour, le pic d'oxydation est le témoin de la régénération de la tétrazine neutre à partir du radical anion transitoirement formé. Les deux pics étant très resserrés, il semblerait qu'à cette vitesse de balayage, l'échange d'électrons se fasse

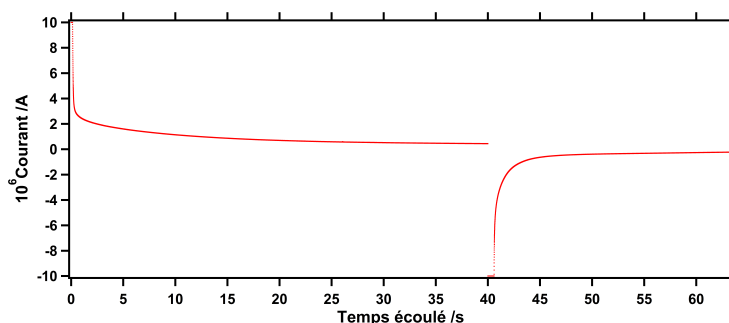


FIGURE 2.13 – Synthèse d'un film de poly(TBTbisTz) par chronoampérométrie sur une électrode de carbone (disque de 1 mm de diamètre). L'électrode est immergée dans une solution de monomère TBTbisTz et de tétrabutylammonium hexafluorophosphate dans le dichlorométhane préalablement désoxygéné à l'argon. Electrode de référence : fil Ag|AgCl. Contre électrode : fil de platine. Potentiel à l'oxydation pour l'électropolymérisation : 1,0 V. Potentiel lors de la réduction du film nouvellement formé : 0 V.

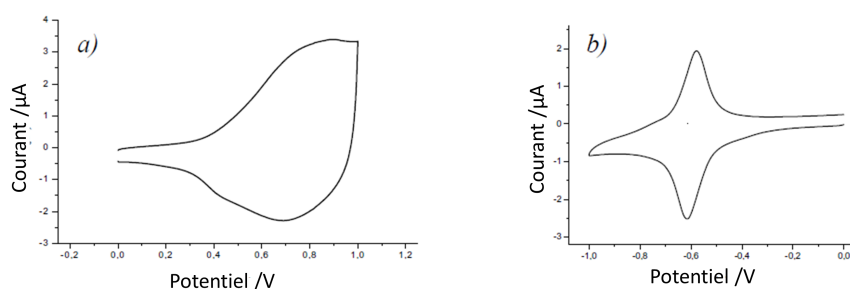


FIGURE 2.14 – Voltamétries cycliques d'un film de poly(TBTbisTz) préparé par trois cycles successifs à 50 mV/s, sur une électrode de platine (disque de diamètre 1 mm) dans une solution électrolytique de monomère à 10^{-3} M. a) Voltamétrie cyclique en oxydation; b) Voltamétrie cyclique en réduction. Vitesse de balayage : 200 mV/s.

rapidement au sein du film. Toutefois, il semblerait que cela soit moins vrai à des vitesses de balayage de l'ordre du V/s.

Cette hypothèse fait suite à des expériences mises en œuvre pour caractériser les cinétiques de transfert de charges par voltamétries cycliques successives à des vitesses de balayage différentes.

L'expérience est réalisée en oxydation, pour étudier la chaîne de polymère polyTBT, et en réduction, pour étudier la cinétique de transfert de charge avec les unités tétrazines. Les résultats obtenus en oxydation sont reportés sur le graphe de la Figure 2.15 dans le cas d'un film de poly(TBTmonoTz) préalablement préparé par deux balayages en oxydation à 50 mV/s dans une solution de monomère à 10^{-3} M. Il apparaît que les deux grandeurs, courant de pic et courant capacitif, sont effectivement proportionnelles à la vitesse de balayage : le transfert de charge est donc rapide.

Les résultats en réduction apparaissent sur le graphe de la Figure 2.16 dans le cas d'un film de poly(TBTbisTz) préparé par trois cycles successifs à 50 mV/s. Ainsi,

2.3. Les polymères : électropolymérisation et caractérisation

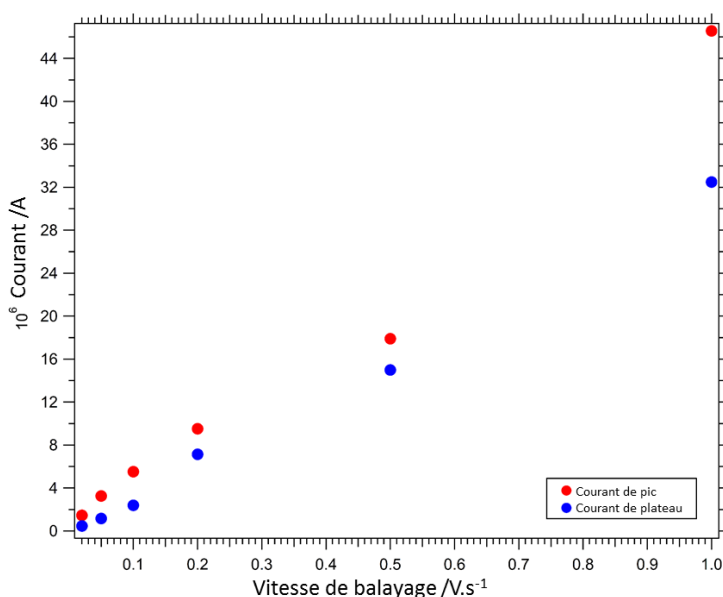


FIGURE 2.15 – Représentation graphique des courants de pics et de plateau en oxydation enregistrés lors de l'oxydation d'un film de poly(TBTmonoTz). Le film a été préparé préalablement par deux balayages en oxydation à 50 mV/s dans une solution de monomère à 10^{-3} M.

pour de faibles vitesses de balayage, la relation avec les courants de pics semble relativement linéaire : le transfert de charge se fait probablement via le polymère conducteur. Pour une vitesse de balayage de 1 V/s, le comportement deviendrait diffusif. La déviation par rapport à la linéarité peut également être causée par le manque de stabilité du film sous l'effet de cycles répétés dans la zone de réduction de la tétrazine.

A ce titre, des tests ont également été mis en œuvre pour tester la stabilité des films dans le dichlorométhane. Pour cela, des voltamétries cycliques successives à vitesse de balayage constante sont enregistrées. Le résultat obtenu dans le cas d'un film de poly(TBTmonoTz) est montré sur la Figure 2.17. Ce film a été formé préalablement dans le dichlorométhane en appliquant un potentiel de 1.2 V à l'électrode de travail pendant 30 secondes puis le film a été réduit à 0 V pendant 30 secondes. On retrouve sur le graphe de la Figure 2.17, lors du balayage en réduction, le pic caractéristique de la génération du radical anion à partir de la tétrazine neutre tandis que le pic lors du balayage retour est le signe de la réoxydation de ce radical anion en tétrazine neutre. Toutefois, il est à noter que les intensités des pics de réduction et d'oxydation décroissent rapidement au fur et à mesure des cycles : le film se passive complètement au bout de seulement 10 balayages en réduction.

Les tests de stabilité en réduction ont été reconduits dans plusieurs solvants, notamment dans l'acétonitrile et le DMSO. Ces tests n'ont toutefois pas permis de déterminer si ce manque de stabilité avait pour origine la redissolution du film, la dégradation des tétrazines ou une combinaison des deux phénomènes.

Des tests similaires ont permis de tester la stabilité du poly(TBTbisTz). Sur la Figure 2.18 sont représentées des voltamétries cycliques en réduction d'un film de poly(TBTbisTz) déposés sur une électrode de platine de diamètre 1 mm. Ce film a été obtenu par immersion de l'électrode dans une solution du monomère dissout

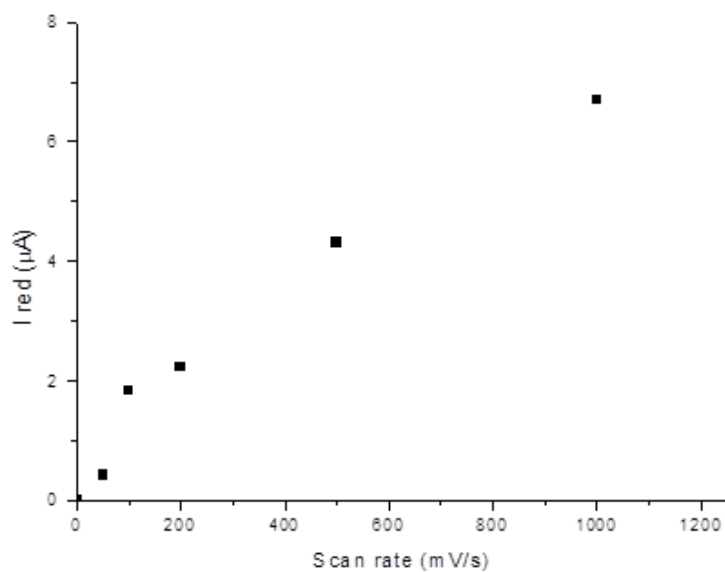


FIGURE 2.16 – Représentation graphique des courants de pics en réduction enregistrés lors de l'oxydation d'un film de poly(TBTbisTz). Le film a été préparé préalablement par trois cycles successifs à 50 mV/s.

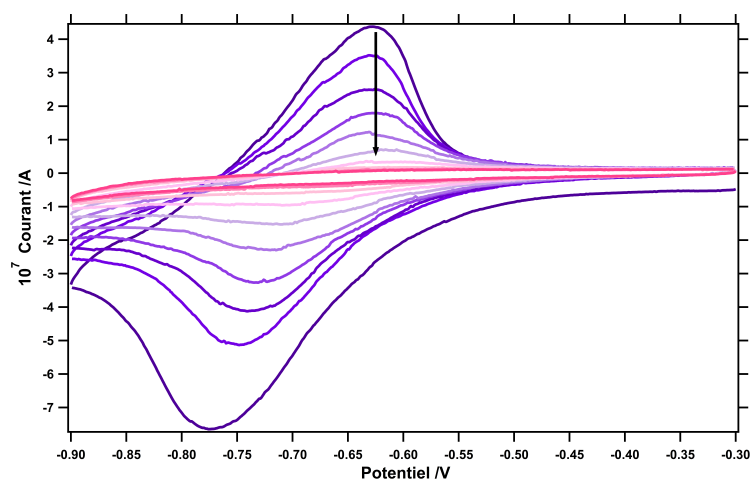


FIGURE 2.17 – Voltamétries cycliques successives en réduction d'un film de poly(TBTmonoTz) sur une électrode de carbone (disque de 1 mm de diamètre). Solution : dichlorométhane/TBAF. Electrode de référence : un fil Ag | AgCl. Contre électrode : un fil de platine. Vitesse de balayage : 50 mV/s.

2.3. Les polymères : électropolymérisation et caractérisation

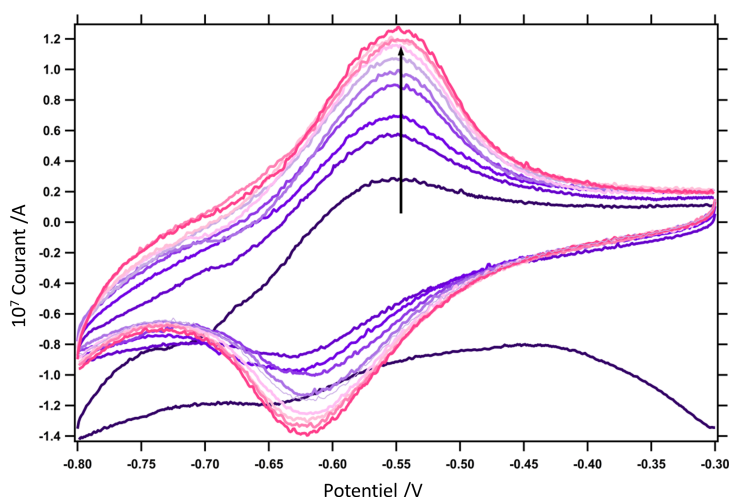


FIGURE 2.18 – Voltammétries cycliques successives en réduction d'un film de poly(TBTbisTz) sur une électrode de carbone (disque de 1 mm de diamètre). Solution : dichlorométhane/TBAF. Electrode de référence : un fil Ag | AgCl. Contre électrode : un fil de platine. Vitesse de balayage : 50 mV/s.

dans du dichlorométhane à environ 10^{-3} M en présence du sel tétrabutylammonium hexafluorophosphate et polarisation de celle-ci à 1 V pendant 40 s puis réduite à 0V pendant 30 s. Le pic de la réduction de la tétrazine en radical anion et celui de sa réoxydation en tétrazine neutre lors du balayage retour sont visibles sur le graphe de la Figure 2.18. Contrairement à l'autre polymère, l'intensité des pics augmente au fur et à mesure des cycles puis se stabilise, probablement du fait de réarrangements du film.

2.3.3 Caractérisation photophysique des polymères

Dans ce paragraphe, l'objectif est de détecter la fluorescence de la tétrazine au sein des deux polymères et de la relier à l'épaisseur des films. Pour cela, à partir des deux monomères TBTmonoTz et TBTbisTz, plusieurs films sont préparés en utilisant des lames d'ITO transparentes préalablement nettoyées à l'isopropanol comme électrode de travail. Leur polarisation, à une valeur permettant l'oxydation du TBT, pendant des temps variables, permet le dépôt de films d'épaisseurs variables. Puis les films nouvellement formés sont réduits à 0 V pendant 30 secondes environ. Les électrodes sont rincées et placées sous microscope de fluorescence. L'intensité de fluorescence dans la zone d'émission de la tétrazine est enregistrée à l'aide d'un spectrophotomètre, le plan focal du microscope se trouvant au niveau du film polymère étudié.

Les résultats sont présentés sur la Figure 2.19 pour le poly(TBTmonoTz) et sur la Figure 2.20 pour le poly(TBTbisTz). Bien que faible, la fluorescence des tétrazines peut être détectée pour les deux polymères. De plus, cette fluorescence croît avec l'épaisseur des films, considérée proportionnelle à la charge coulombienne mesurée par intégration de la courbe du courant en fonction du temps lors de cette électropolymérisation. Ce résultat est observé pour les deux monomères.

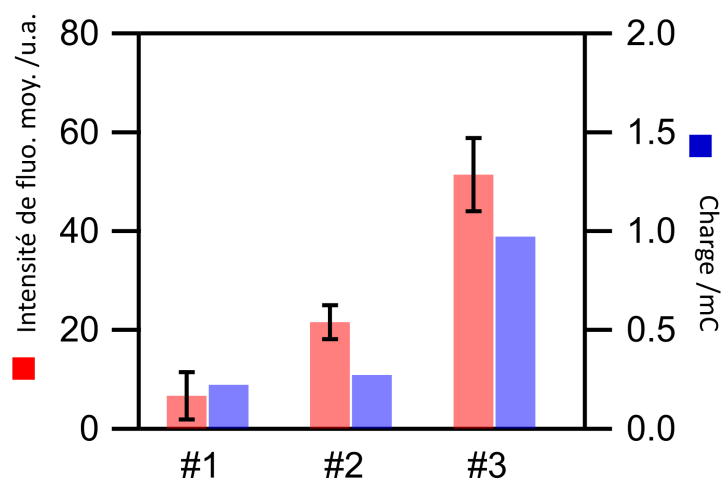


FIGURE 2.19 – Mise en évidence de la corrélation entre la charge ayant circulé lors de la formation du film de poly(TBTmonoTz) sur l'électrode d'ITO transparente et l'intensité de fluorescence moyenne du film mesurée à l'aide du microscope de fluorescence

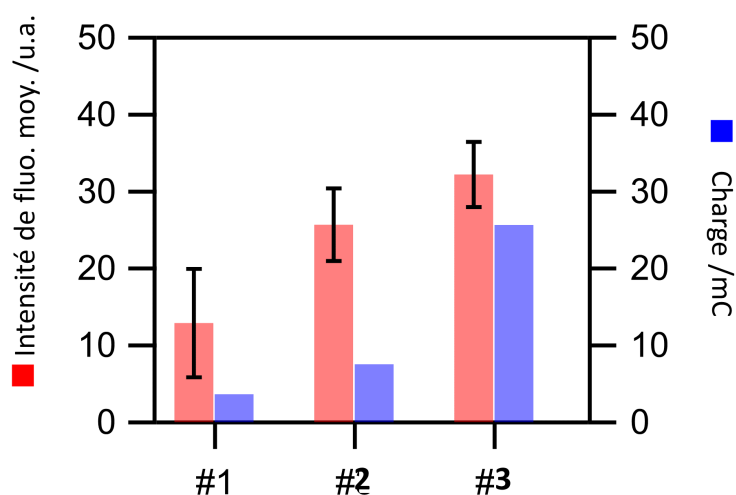


FIGURE 2.20 – Mise en évidence de la corrélation entre la charge ayant circulé lors de la formation du film de poly(TBTbisTz) sur l'électrode d'ITO transparente et l'intensité de fluorescence moyenne du film mesurée à l'aide du microscope de fluorescence

2.4 Étude des propriétés électrofluorochromes des polymères

Dans la suite, le comportement électrofluorochromique du poly(TBTbisTz) est étudié.

Dans le cas du monomère, une très faible fluorescence a été mise en évidence (voir le paragraphe 2.2.2). Ceci s'explique par une inhibition mutuelle des deux unités TBT et tétrazine par transfert d'électron photoinduit. En effet, la tétrazine à l'état excité est un très bon accepteur d'électron et est donc facilement réduite par le TBT neutre. Le TBT à l'état excité est, quant à lui, un très bon donneur d'électrons et peut donc facilement être oxydé par la tétrazine.

Si le TBT est oxydé, il ne peut plus transférer d'électrons à la tétrazine neutre. Il est donc attendu une restauration de la fluorescence de la tétrazine sous l'effet de l'oxydation du TBT. De même, si la tétrazine est réduite, elle ne peut plus oxyder le TBT neutre qui doit donc émettre de la fluorescence. De plus, contrairement à l'état monomère dans lequel le TBT cation-radical ne peut être stable, il est attendu au sein du polymère une stabilisation à la fois de l'état oxydé du (poly)TBT et de l'état réduit de la tétrazine. Il doit donc être possible au sein du polymère de passer réversiblement entre trois états :

- un état que nous pouvons noter "polyTBTfluo" correspondant à la tétrazine réduite et au polyTBT neutre fluorescent,
- un état sans fluorescence ou "inhibé" correspondant à la tétrazine neutre oxydante et au polyTBT neutre réducteur,
- un état que nous nommerons "Tzfluo" correspondant au polyTBT oxydé et à la tétrazine neutre fluorescente.

2.4.1 Mise en oeuvre expérimentale

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour cette étude est semblable à celui décrit sur la Figure 1.26. Une cellule électrochimique à trois électrodes est couplée à un microscope inversé de fluorescence, la cellule électrochimique étant posée directement sur la platine du microscope. Un fil de platine et un fil d'argent, recouvert de chlorure d'argent, sont utilisés respectivement en tant qu'électrode auxiliaire et électrode de pseudo-référence. Elles sont immergées dans la solution du monomère pour l'électropolymérisation puis dans la solution électrolytique pour l'étude de l'électrofluorochromisme du film nouvellement formé. L'électrode de travail est une lame d'ITO préalablement nettoyée à l'isopropanol. Elle occupe le fond de la cellule.

Les deux étapes de la procédure expérimentale sont les suivantes :

- premièrement, l'électropolymérisation. Dans cette étape, la polarisation de l'électrode de travail doit permettre la polymérisation par oxydation du TBT et entraîner ainsi la croissance d'un film de polymère directement sur l'ITO.
- deuxièmement, l'étude de l'électrofluorochromisme. Dans ce cas, l'électrode de travail est la lame d'ITO sur laquelle est déposée le film de polymère. L'intérêt de l'ITO est ici double. D'une part, comme il est transparent, il permet d'exciter le film de polymère à travers le substrat et de collecter de la même façon la fluorescence qui en résulte. D'autre part, comme il est conducteur, il doit permettre de contrôler les degrés d'oxydation du polyTBT ou de la tétrazine directement par la valeur du potentiel qui lui est appliqué à l'aide du potentiostat et ainsi de moduler l'intensité de fluorescence émise par le film.

Mise en œuvre de l'électropolymérisation

L'électropolymérisation est mise en œuvre, à l'abri de la lumière, avec, dans la cuve, du TBTbisTz en solution à la concentration $2 \cdot 10^{-4}$ M dans le dichlorométhane avec du tétrabutylammonium hexafluorophosphate à 0,1 M dont le rôle est celui d'électrolyte support. Il est à noter que la solution a été préalablement dégazée pendant 5 minutes pour déplacer l'oxygène dissout. Le flux est ensuite maintenu doucement en surface durant toute la réaction électrochimique. Pour la polymérisation en tant que telle, le potentiel de l'ITO est porté à +1,2 V pendant 15 s, ce qui conduit à la formation d'un film. Les courbes de courant présentent la forme classique attendue, à savoir celle d'un déclin suivi d'un plateau.

La solution contenant le monomère est finalement retirée de la cellule.

Procédure d'acquisition pour l'étude de l'électrofluorochromisme

Les mesures d'électrofluorochromisme sont faites immédiatement après l'électropolymérisation (sans démonter la cuve). Pour cela, la cuve et le film au fond de la cuve sont rincés plusieurs fois avec du dichlorométhane par remplissages successifs. Puis, une solution de tétrabutylammonium hexafluorophosphate à 0,1 M dans l'acétonitrile devant servir d'électrolyte est placée dans la cellule.

Le film d'ITO est excité avec une lampe blanche associée à un filtre d'excitation et un miroir dichroïque. Le faisceau d'excitation est focalisé à travers un objectif sur le film de polymère. L'émission de lumière par le poly(TBTbisTz) est collectée à travers le substrat puis l'objectif. Le faisceau d'émission traverse le miroir dichroïque et un filtre d'émission avant d'être analysé par le spectrophotomètre. Selon l'unité excitée (polyTBT ou tétrazines), le jeu de filtres utilisé diffère. Les caractéristiques en sont données en annexe.

Parallèlement à cela, deux types de signaux électrochimiques sont appliqués à la lame d'ITO selon qu'il s'agisse d'étudier la fluorescence du polyTBT, modulée par le contrôle électrochimique du degré d'oxydation de la tétrazine, ou celle de la tétrazine, modulée par le contrôle électrochimique du degré d'oxydation du polyTBT.

2.4.2 Modulation de la fluorescence des films de poly(TBTbisTz) par contrôle du potentiel appliqué au substrat

Modulation de la fluorescence du polyTBT par contrôle électrochimique du degré d'oxydation des unités tétrazines

Dans la suite, le passage entre les états "polyTBTfluo" et "inhibé" est étudié. Le potentiostat applique à la lame d'ITO, sur laquelle est déposée le film de polymère, la séquence en potentiel suivante : -0,2 V (50 s), -1,2 V (70 s), -0,2 V (80 s). Un jeu de filtres permet d'exciter le polyTBT et d'observer sa luminescence. Le passage de -0,2 V à -1,2 V doit permettre la réduction de la tétrazine et la restauration de la fluorescence du polyTBT (préalablement inhibé par la tétrazine oxydante). Le retour à -0,2 V doit conduire à la régénération de la tétrazine neutre et donc au retour à l'état éteint du polyTBT. L'enregistrement du courant traversant l'électrode de travail doit, quant à lui, permettre de mesurer un courant de réduction négatif (témoin de la réduction de l'unité tétrazine) lorsque le potentiel de l'électrode de travail est porté à -1,2 V puis un courant d'oxydation lors du retour à -0,2 V (témoin de sa réoxydation).

Sur la Figure 2.21 sont représentés les spectres du TBT effectivement enregistrés au cours du temps par le spectrophotomètre lorsque, parallèlement, le potentiostat

2.4. Étude des propriétés électrofluorochromes des polymères

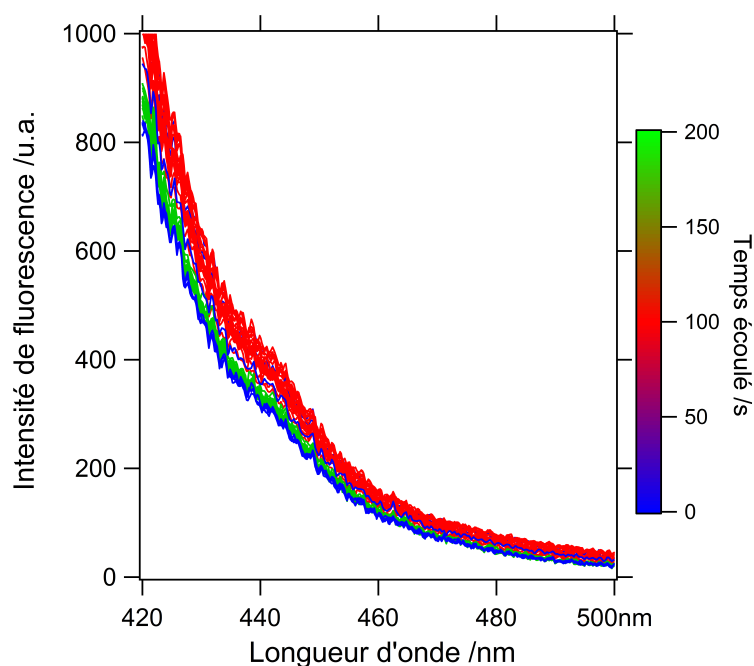


FIGURE 2.21 – Spectres d'émission du polyTBT enregistrés au cours du temps lorsqu'on applique à la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz) la séquence en potentiel suivante : -0,2 V (50 s), -1,2 V (70 s), -0,2 V (80 s).

appliquée à l'électrode de travail la séquence en potentiel décrite ci-dessus. L'intégration de ces spectres permet d'obtenir le chronofluorogramme de la Figure 2.22 qui est, par ailleurs, mis en relation avec le courant ayant traversé l'électrode de travail. Ainsi, le passage de -0,2 V à -1,2 V s'accompagne de l'augmentation attendue de la fluorescence du TBT tandis que le retour à -0,2 V s'accompagne d'une rediminution de l'émission. Si le passage de -0,2 V à -1,2 V permet effectivement d'enregistrer un courant de réduction, le courant d'oxydation attendu lors du retour à -0,2 V n'est pas observé. Il peut donc être supposé que l'augmentation de la fluorescence observé entre 50 s et 150 s est bien due à la réduction de la tétrazine. Toutefois, cette réaction n'est probablement pas ou peu réversible, probablement du fait d'une destruction des entités tétrazines lors du processus de réduction.

Modulation de la fluorescence des unités tétrazines par contrôle électrochimique du degré d'oxydation du polyTBT

À présent, c'est le passage entre l'état "inhibé" et l'état "TzFluo" qui est étudié. Pour cela, le potentiostat applique à une lame d'ITO, sur laquelle a été déposée un film de poly(TBTbisTz), la séquence en potentiel suivante : -0,2 V (10 s), 1,2 V (40 s), -0,2 V (70 s), 1,2 V (80 s). Le jeu de filtres permet, dans ce cas, d'observer la fluorescence de la tétrazine. Par le passage de -0,2 V à +1,2 V, il est attendu une oxydation du polyTBT et donc l'enregistrement d'un courant positif. Cette oxydation doit permettre de bloquer le transfert d'électron entre le polyTBT neutre et la tétrazine à l'état excité, avide d'électron, qui inhibe la fluorescence de cette dernière. Il est donc attendu une augmentation de l'émission de lumière. Par le retour du potentiel de l'électrode de travail à -0,2 V, il est attendu le retour à l'état réduit du polyTBT et

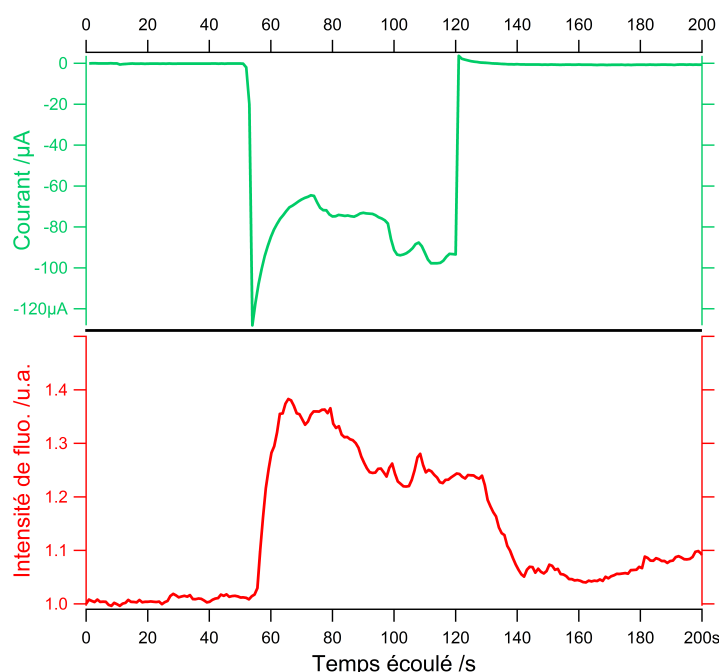


FIGURE 2.22 – Fluorescence du polyTBT obtenue par intégration des spectres de la Figure 2.21 (courbe rouge) et courants (courbe verte) enregistrés en fonction du temps lorsqu'on applique à la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz) la séquence en potentiel suivante : -0,2 V (50 s), -1,2 V (70 s), -0,2 V (80 s).

donc l'enregistrement d'un courant négatif. Cette réduction doit rétablir le transfert d'électron entre le polyTBT et la tétrazine et donc entraîner un retour à l'état inhibé (baisse de l'intensité de fluorescence).

Sur la Figure 2.23 sont reportés les spectres effectivement enregistrés sous l'effet de l'application de la séquence en potentiel préalablement décrite. Ces spectres présentent la forme attendue pour l'émission d'une tétrazine. De la même façon que pour le polyTBT, ils sont intégrés. Le chronofluorogramme qui en résulte est représenté sur la Figure 2.24 parallèlement au courant ayant traversé l'électrode de travail. Le passage de -0,2 V à +1,2 V entraîne l'apparition d'un courant positif : le polyTBT est donc probablement oxydé comme attendu. Parallèlement, le signal enregistré en fluorescence augmente brusquement (non représenté sur la Figure 2.23). À -0,2 V, le polyTBT réduit inhibe la fluorescence de la tétrazine excitée particulièrement oxydante. L'oxydation du polyTBT à +1,2 V semble donc, comme espéré, permettre de bloquer ce transfert d'électron photoinduit et donc de rétablir la fluorescence de la tétrazine. Le retour à -0,2 V s'accompagne quant à lui d'un courant négatif : l'oxydation du polyTBT est donc réversible, le polyTBT neutre peut être restauré. De plus, cette restauration est marquée par une diminution de la fluorescence. Cette diminution est cohérente avec le rétablissement du transfert d'électron photoinduit et le retour à l'état inhibé.

Il est à noter que lorsque le potentiel de l'électrode de travail est à nouveau porté à +1,2 V, un courant d'oxydation est encore enregistré et il s'accompagne une nouvelle fois d'une augmentation de la fluorescence. Ainsi, la réaction d'oxydation du polyTBT est réversible et cette réversibilité se traduit par le comportement attendu

2.5. Conclusions et perspectives

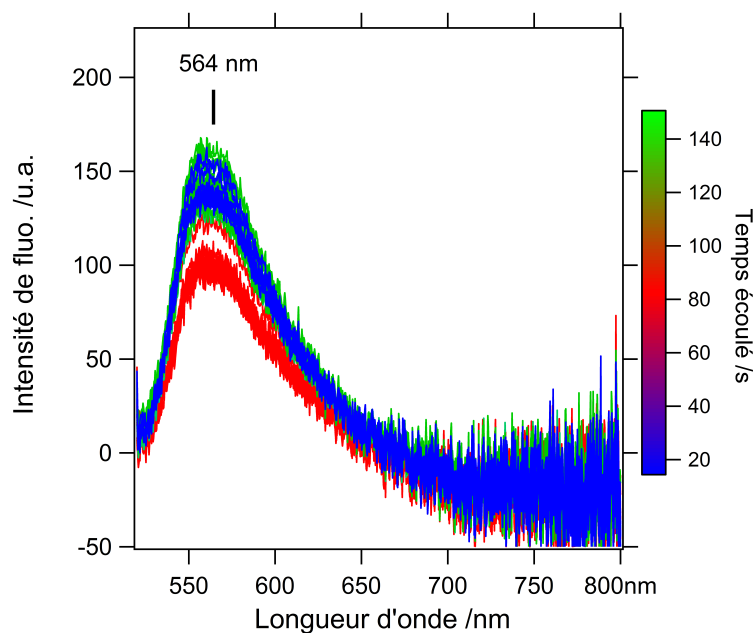


FIGURE 2.23 – Spectres d'émission de la tétrazine enregistrés au cours du temps parallèlement à l'application à la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz) de la séquence en potentiel suivante : -0,2 V (10 s), 1,2 V (40 s), -0,2 V (70 s), 1,2 V (80 s).

au niveau de la fluorescence.

Ainsi, le poly(TBTbisTz) présente bien la propriété d'électrofluorochromisme attendue. Néanmoins, il est à noter qu'un tel comportement n'a été observé que pour des films extrêmement minces (même s'il est difficile d'évaluer quantitativement l'épaisseur de ces films), issus d'électropolymérisations sur des temps très courts. Cette observation est cohérente avec l'évolution de la fluorescence enregistrée au cours de l'électropolymérisation et la formation du film qui en découle. En effet, sur la Figure 2.25 sont représentés une série de spectres typiquement enregistrés au cours de la croissance d'un film. L'intensité de la fluorescence collectée par le spectrophotomètre décroît lors de l'électropolymérisation. Ceci peut être dû à la réabsorption dans la bande bipolaronique du polymère.

2.5 Conclusions et perspectives

Dans cette partie ont été décrites les électropolymérisations de deux monomères dérivés de TBT contenant la tétrazine comme groupe pendent. Les films de polymères obtenus sont bien définis. De plus, le comportement électrofluochrome double a pu être observé : il a été possible de moduler l'émission de la tétrazine par l'oxydation puis la réduction du polymère et celle du polymère par réduction puis oxydation de la tétrazine. Toutefois, l'amplitude de la modulation reste faible, car, probablement, la fluorescence de la tétrazine reste inhibée lors de l'oxydation du polymère. Un tel effet est sans doute imputable à des phénomènes de suroxydation. Ils doivent pouvoir être limités par l'utilisation d'un polymère qui s'oxyderait encore à plus haut potentiel que le polyTBT, par exemple le polyfluorène.

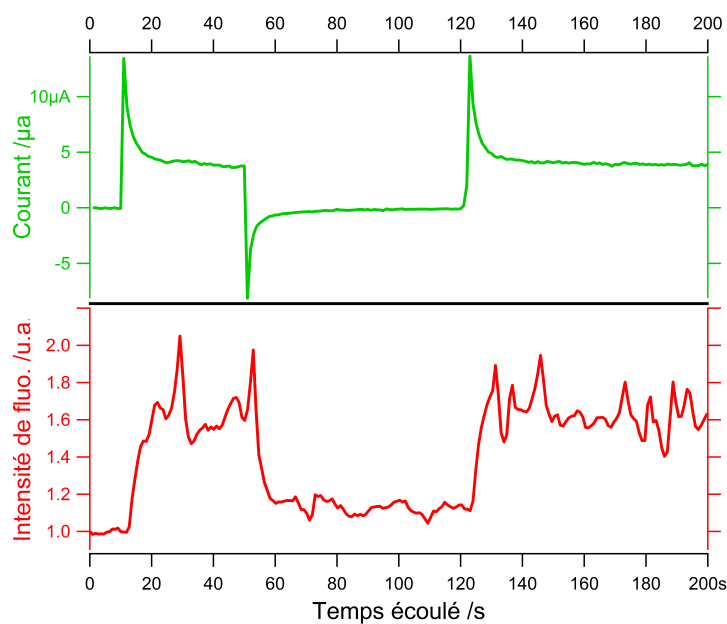


FIGURE 2.24 – Fluorescence de la tétrazine obtenue par intégration des spectres de la Figure 2.23 (courbe rouge) et courants (courbe verte) enregistrés en fonction du temps lorsqu'on applique à la lame d'ITO sur laquelle est déposé le film de poly(TBTbisTz) la séquence en potentiel suivante : -0,2 V (10 s), 1,2 V (40 s), -0,2 V (70 s), 1,2 V (80 s).

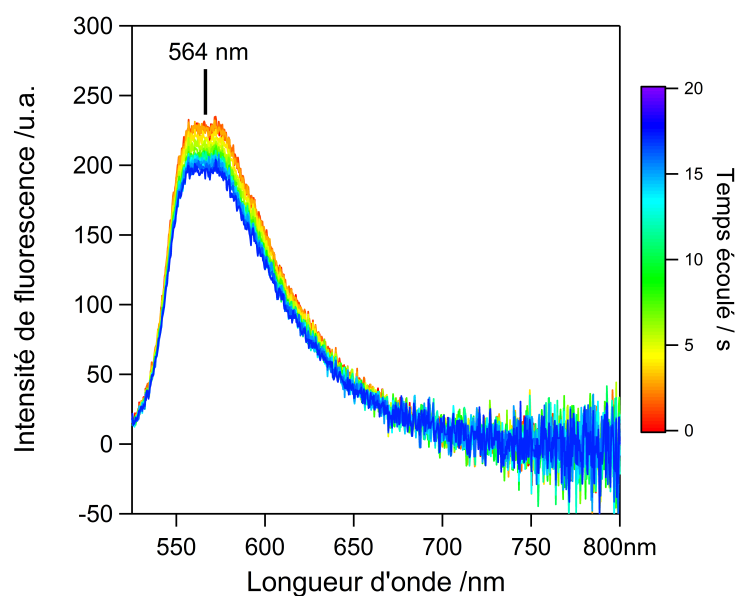


FIGURE 2.25 – Évolution du spectre d'émission d'un film de polymère au cours de l'électropolymérisation sur une lame d'ITO. (émission de la tétrazine)

2.5. Conclusions et perspectives

Nous venons de caractériser l'électrofluorochromisme de tétrazines incorporées en tant que groupe pendent dans des films de polymères déposés sur des électrodes transparentes d'ITO. Dans le prochain chapitre, l'électrofluorochromisme d'électrodes modifiées par des tétrazines sera encore étudié, mais cette fois-ci, celui-ci sera direct (par contrôle de leur degré d'oxydation), en l'absence de polymère. Pour cela, l'électrode sera fonctionnalisée par une monocouche de tétrazine siloxane.

Chapitre 3

L'électrofluorochromisme de monocouches de tétrazines greffées sur une électrode d'ITO

3.1 Introduction

En phase condensée, le comportement des molécules peut s'avérer différent de celui observé en solution. Le groupe de Levillain, par exemple, a étudié des monocouches de thiénylène vinylène auto-assemblées sur or, par spectroélectrochimie d'absorption. De cette façon, cette équipe a pu démontrer que la molécule se comporte différemment vis-à-vis de la réaction de dimérisation selon qu'elle soit en solution ou immobilisée sur un substrat.[10]

Cette différence de comportement entre système en solution et système condensé à l'échelle de la monocouche soulève la question de celui qu'aurait un système électrofluorochrome également greffé sous la forme d'une monocouche. En effet, dans une telle configuration, la diffusion, qui joue un rôle prépondérant lorsque la sonde électroactive et fluorescente est en solution, n'intervient plus. Les cinétiques de conversion ne sont vraisemblablement plus régies par les mêmes lois. À l'inverse, l'interaction entre les molécules immobilisées ou celle des molécules avec le substrat prennent vraisemblablement une grande importance. Au niveau instrumental, se posent les problèmes de détection de la monocouche et du blanchiment. Ce dernier a évidemment lieu en solution mais la diffusion libre des fluorophores "blanchis" (en anglais "bleached") compense le phénomène, ce qui n'est pas le cas lorsque le fluorophore électroactif est greffé.

Concernant le questionnement sur la sensibilité du détecteur à la fluorescence émise par la monocouche, il existe plusieurs articles dans la littérature qui montrent que l'étude de monocouches par couplage entre microscopie de fluorescence et électrochimie est non seulement possible mais également peut se révéler très pertinent pour étudier certaines propriétés de ces monocouches, comme vu dans le premier chapitre de ce manuscrit.[88] [14]

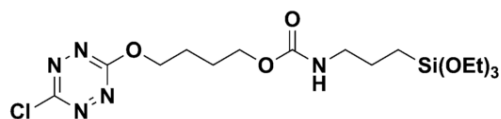


FIGURE 3.1 – La tétrazine siloxane, notée ESTZ

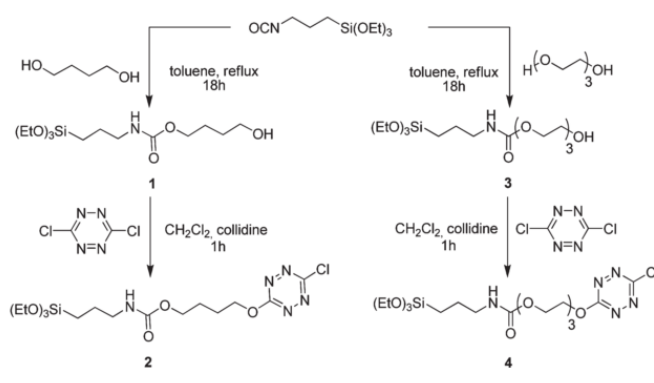


FIGURE 3.2 – Schéma réactionnel de la synthèse d'ESTZ (notée 2) et d'une seconde tétrazine siloxane (notée 4)[58]

Dans le cadre de ce chapitre, on cherche donc à réaliser des monocouches électrofluorochromes. Pour préparer de tels échantillons, il faut une molécule composée d'un fluorophore électrofluorochrome substitué par une ancre permettant le greffage sur le substrat souhaité. En ce qui concerne le fluorophore, le choix de l'équipe s'est porté sur une s-tétrazine car les propriétés électrochimiques, photophysiques et électrofluorochromiques de ces composés sont maintenant très bien documentées. De plus, les positions 3 et 6 des tétrazines peuvent être fonctionnalisées par un grand nombre de substituants pouvant faire office d'"ancres". De cette façon, des tétrazines ont déjà été immobilisées sur des substrats, l'ancre choisie dépendant évidemment du substrat souhaité. [41] Dans le cas décrit ici, l'objectif est de pouvoir étudier les échantillons sur le montage couplant un microscope de fluorescence inversé et une cellule électrochimique décrit sur la Figure 1.26 précédemment mis en place au laboratoire. Il s'agit donc d'utiliser un substrat transparent et conducteur, par exemple une lame recouverte d'ITO. La surface de ce dernier présentant des groupes hydroxyles réactifs, l'ancre utilisée est un groupe siloxane. La molécule composée de la tétrazine et du groupement siloxane finalement choisie est représentée sur la Figure 3.1. Elle sera notée ESTZ dans la suite.

3.1.1 La molécule tétrazine siloxane

La synthèse de la molécule ESTZ, représentée sur la Figure 3.1 et choisie pour la mise en oeuvre des travaux décrits dans ce chapitre, a été décrite pour la première fois en même temps que celle d'une autre tétrazine siloxane, à chaîne plus longue par l'équipe de Pierre Audebert [58]. Le schéma réactionnel d'ESTZ est décrit sur la Figure 3.2. Elle est notée 2, l'autre est notée 4.

Les propriétés photophysiques, électrochimiques et électrofluorochromiques de la ESTZ ont été décrites dans la littérature. Elles sont résumées dans la suite de ce chapitre.

Caractérisation photophysique

Les spectres d'absorption et d'émission de la molécule ESTZ sont reportés sur la Figure 3.3. Dans l'acétonitrile, l'équipe de Seo a enregistré deux bandes d'absorption à 330 nm (forte) et 515 nm (faible) qui sont respectivement dues aux transitions

3.1. Introduction

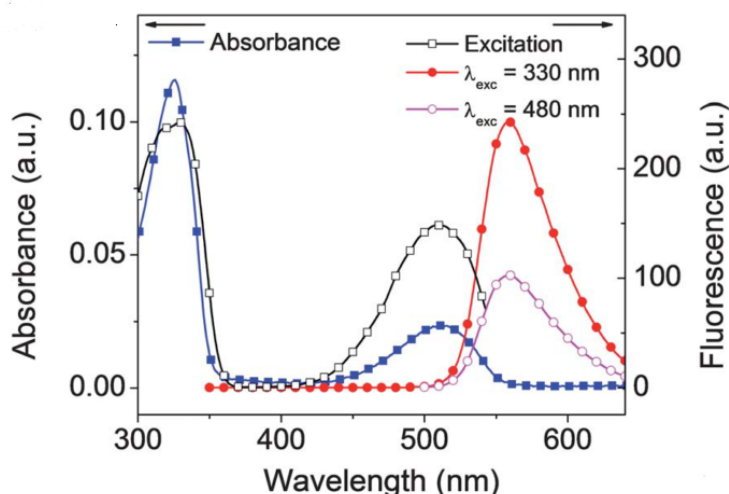


FIGURE 3.3 – Spectres d’absorption, d’excitation et d’émission de la tétrazine siloxane ESTZ dans l’acétonitrile à la concentration 10^{-4} M. [87]

$\pi - \pi^*$ et $n - \pi^*$ de la tétrazine (voir paragraphe 1.4.3). Cette absorption a pour conséquence l’émission d’une fluorescence brillante dont le maximum se situe vers 564 nm. Le spectre d’excitation (enregistré à λ_{em} à 564 nm) montre que les deux bandes d’absorption sont capables de promouvoir la fluorescence de la tétrazine.

Du fait de la nature interdite de la transition $n - \pi^*$ responsable de la fluorescence, la tétrazine présente une durée de vie très longue (148 ns) en solution dans l’acétonitrile.

Les propriétés photophysiques de la molécule ont été mises à profit dans le cadre des travaux de Pierre Audebert. Avec son équipe, ils ont greffé les deux types de tétrazines siloxanes de la Figure 3.2 sur des nanoparticules de silice en conditions acide relativement douces.[58] Les nanoparticules greffées avec la molécule d’intérêt ESTZ sont notées NP1 et celles greffées avec le second fluorophore 4 sont notées NP2.

L’équipe a ensuite procédé à l’étude des propriétés photophysique de ces nanoparticules dont les résultats sont présentées sur la Figure 3.4. Les spectres d’émission des nanoparticules NP1 et NP2 sont identiques à celui de la tétrazine siloxane, ce qui indique que l’immobilisation des nanoparticules de silice ne conduit pas à la formation d’agrégats luminescents tels que des excimères. Par contre, les expériences de spectroscopie résolues en temps mettent en exergue un comportement différent du fluorophore seul et des nanoparticules. Des déclin multiexponentiels sont observés pour NP1 et NP2 avec une durée de vie de l’état excité de 4,83 ns et 12,24 ns respectivement. Ainsi, des interactions ont probablement lieu entre les fluorophores et la silice mais aussi entre les tétrazines greffées à la surface (inhibition ou *quenching* intermoléculaire).

Ces nanoparticules ont ensuite été utilisées pour la détection d’amines. Le principe de la détection s’appuie sur l’extinction de la fluorescence des nanoparticules du fait d’un transfert d’électron photoinduit entre l’amine et la tétrazine photooxydante avide d’électrons. Un tel mécanisme est mis en évidence par l’étude des cinétiques de Stern-Volmer.

Dans un second temps, la même équipe a encore greffé la ESTZ sur des nanoparticules de silice mais qui, cette fois-ci, avait été préalablement fonctionnalisées avec

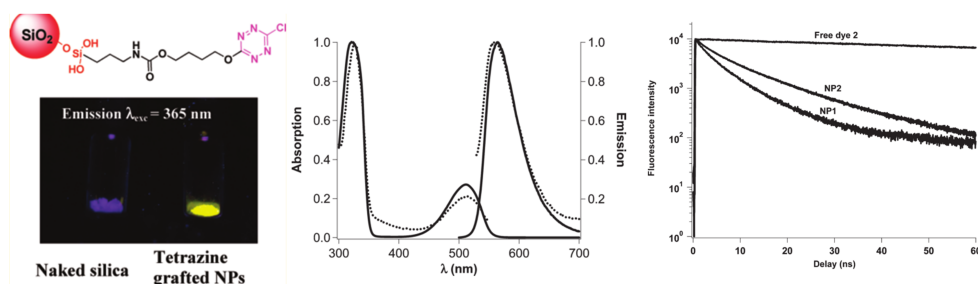


FIGURE 3.4 – A gauche : schéma de principe des nanoparticules fonctionnalisées par la tétrazine siloxane ESTZ et fluorescence des nanoparticules de silice et des nanoparticules de silices greffées avec la tétrazine. Au milieu : spectres d'absorption et d'émission de la tétrazine dans l'acétonitrile (lignes continues) superposés aux spectres des nanoparticules fonctionnalisées NP1 et NP2 (lignes pointillées). A droite : déclins de fluorescence de la tétrazine libre, des nanoparticules NP1 et NP2 dans l'acétonitrile. [58]

des naphthalimides. [59] L'objectif était ici de combiner les propriétés d'émission de la tétrazine et du naphthalimide pour obtenir des nanoparticules qui émettent une fluorescence blanche.

Les nanoparticules de silice avec du colorant naphthalimide incorporé dans la matrice notées NP0 sont en suspension dans de l'acétonitrile sec. Elles sont mises en présence de la molécule ESTZ et d'acide acétique. Les propriétés photophysiques de ces nouvelles nanoparticules sont ensuite étudiées et les principaux résultats sont reportés sur la Figure 3.5.

Le naphthalimide présente une faible fluorescence dans le bleu (390 nm). Lorsqu'il est incorporé dans les nanoparticules de silice, il y a formation d'excimères et apparition en conséquence d'une nouvelle bande dans le vert (472 nm). La fonctionnalisation de la nanoparticule par la tétrazine apporte le jaune. Plus les nanoparticules réagissent longtemps avec la tétrazine plus la bande verte diminue au profit de la bande jaune (de NPA à NPC). Il y a un recouvrement entre l'absorption de la tétrazine et l'émission de l'excimer, ce qui conduit à un transfert d'énergie : l'exaltation de la fluorescence de la tétrazine est permise par le naphthalimide. La somme des trois bandes donne une fluorescence blanche.

Caractérisation électrochimique

La molécule ESTZ possède des propriétés électrochimiques comparables à celles des autres tétrazines préalablement décrites.

Comme le montre la voltampérométrie cyclique de la Figure 3.6, la tétrazine de la molécule ESTZ peut être réduite réversiblement en son radical anion. Le potentiel observé dans l'acétonitrile pour réduire la molécule en radical anion a été mesuré à -0,5 V sur disque de platine par rapport à Ag/AgCl.

Au sein du laboratoire, la voltamétrie cyclique de la même molécule a été enregistrée sur électrode d'ITO. Elle est représentée sur la Figure 3.7. Comme attendu avec ce type de matériau, les pics de réduction et d'oxydation retour sont beaucoup plus écartés, car la cinétique de transfert d'électron est moins rapide.

3.1. Introduction

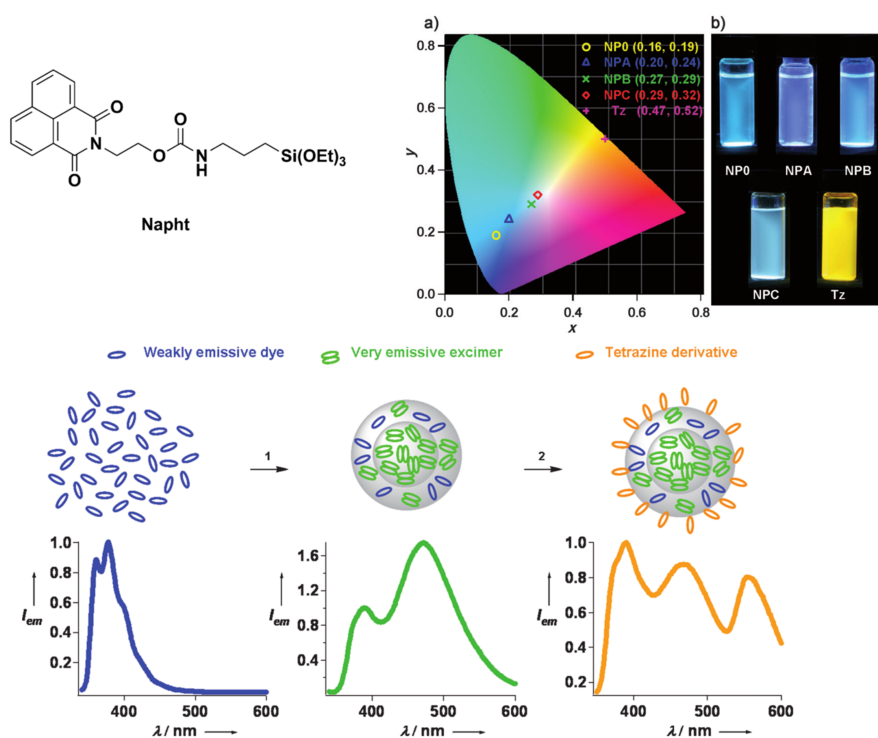


FIGURE 3.5 – En haut à gauche : La structure du dérivé de naphthalimide greffé sur les nanoparticules de silice. En haut à droite : Couleurs d'émission sur un diagramme chromatique (blanc idéal : $x = 0,33$ et $y = 0,33$) des différentes nanoparticules plus suspensions de nanoparticules excitées sous lampe UV ($\lambda_{exc} = 365$ nm) En bas : représentation du procédé de co-greffage. 1) formation de NP0, 2) réaction de greffage de la tétrazine, Spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 330$ nm) du naphthalimide (bleu), de NP0 (vert), de NPB (orange). [59]

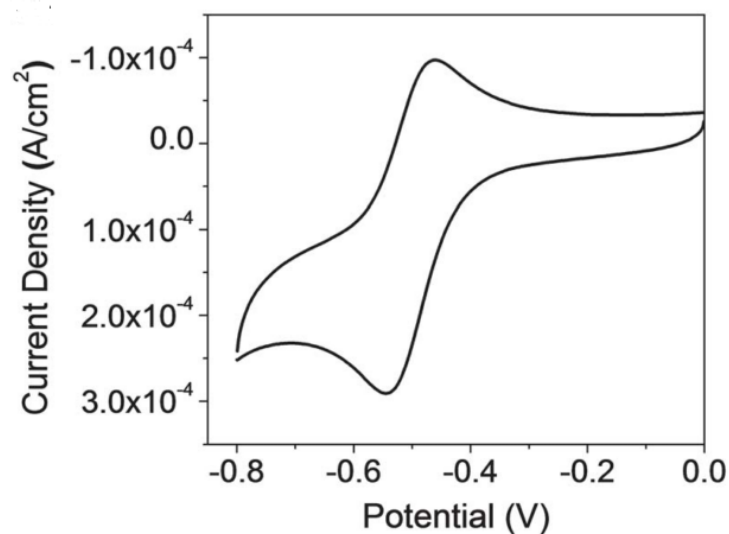


FIGURE 3.6 – Voltamétrie cyclique de la ESTZ enregistrée dans l'acétonitrile en présence de TBAF, à la concentration 0,1 M, à la vitesse de balayage de 50 mV/s avec un disque de platine de 1 mm de diamètre comme électrode de travail et Ag/AgCl comme électrode de référence.[87]

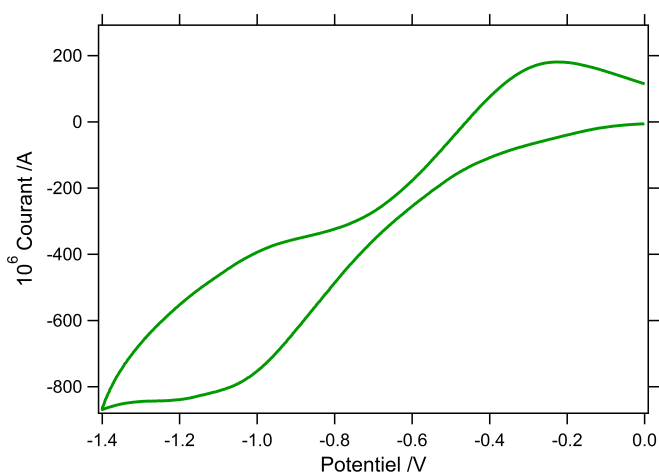


FIGURE 3.7 – Voltamétrie cyclique de la ESTZ enregistrée dans le dichlorométhane en présence de TBAF à la concentration 0,1 M à la vitesse de balayage de 50 mV/s avec une lame de verre recouverte d'ITO comme électrode de travail et un fil Ag/AgCl comme électrode de référence (concentration de 5 mM).

3.1. Introduction

ϵ_1 ($\lambda_{max} = 330$ nm) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϵ_2 ($\lambda_{max} = 515$ nm) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ_F	τ_F (ns)	E (V)
3350	708	0,26	148	-0,88

TABLEAU 3.1 – Résumé des caractéristiques photophysiques et électrochimiques d'ESTZ [60]

Application : propriété d'électrofluorochromisme

Cette molécule est donc à la fois électroactive et fluorescente. Ces caractéristiques sont résumées dans le tableau 3.1. Elle est également électrofluorochrome puisque le radical anion associé est stable et non fluorescent.

Cette propriété d'électrofluorochromisme a déjà été utilisée par l'équipe de Seo [87]. Ils ont greffé la molécule sur des lames d'ITO préalablement fonctionnalisées avec des nanoparticules de dioxyde de titane. Le greffage est réalisé par immersion des électrodes de TiO₂ dans une solution d'acétonitrile contenant la tétrazine, à la concentration 5 mM, mais également de l'acide acétique glacial, à la concentration de 15 mM, pendant 30 minutes. Puis, les lames sont rincées abondamment avec de l'acétonitrile et séchées avec un flux d'azote.

Finalement, l'électrofluorochromisme des électrodes de TiO₂ fonctionnalisées est étudié en utilisant une autre électrode d'ITO en tant que contre électrode et un polymère comme électrolyte, le tout scellé dans une matrice en résine. La fluorescence du dispositif est mesurée parallèlement à l'application du signal électrochimique en utilisant un spectromètre de luminescence (voir la Figure 3.8).

Quand le potentiostat cycle plusieurs fois entre 1,2 V et -1,2 V, le spectromètre enregistre la chute de la fluorescence prévue par la réduction de la tétrazine en radical anion et réciproquement. Le ratio on/off est maximum pour des créneaux de 20 secondes. Les sauts de fluorescence sont stables et réversibles avec un ratio on/off de 1,5 sur 100 cycles lorsque les créneaux de potentiel ont une durée de 5 secondes (voir la Figure 3.9).

Les électrodes d'ITO fonctionnalisées par des nanoparticules de dioxyde de titane présentent l'avantage d'avoir un bon ratio surface sur volume favorable à un greffage relativement dense de la molécule de tétrazine et donc à une détection de la fluorescence qui s'en trouve facilitée.

Dans la suite, l'objectif du travail décrit est de greffer le fluorophore électrofluorochrome directement sur l'ITO.

3.1.2 Description de la stratégie adoptée

Dans ce chapitre, le travail effectué est décrit en deux grandes parties :

- Dans une première partie, le protocole de greffage de la monocouche sur les substrats est décrit ainsi que les techniques mises en oeuvre pour caractériser les échantillons ainsi obtenus.
- La seconde partie est consacrée à l'étude de la propriété d'électrofluorochromisme des échantillons, à savoir la possibilité de moduler réversiblement la fluorescence émise par la monocouche en contrôlant le degré d'oxydation des noyaux de tétrazine. Plusieurs paramètres sont successivement étudiés.

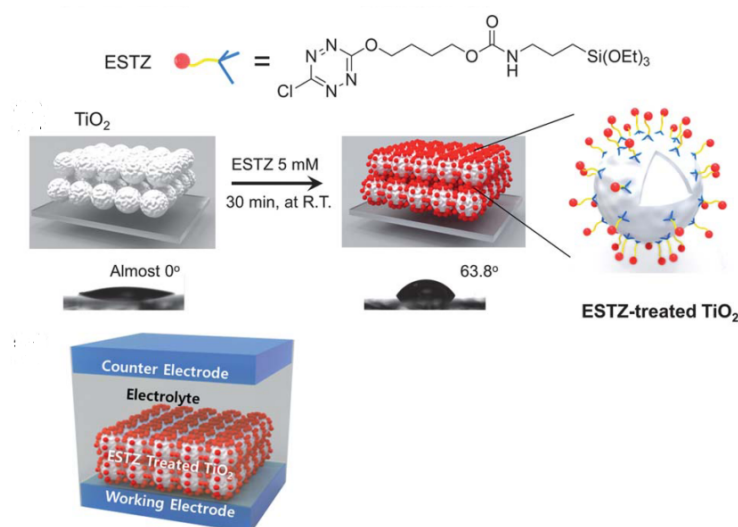


FIGURE 3.8 – En haut : schéma représentant les différentes étapes de la procédure pour le dépôt de la tétrazine siloxane sur les électrodes fonctionnalisées par les nanoparticules de dioxyde de titane. En bas : La structure du dispositif d'électrofluorochromisme avec la couche de nanoparticules de TiO_2 traitées avec ESTZ et une couche d'électrolyte [87]

Greffage des monocouches et caractérisation des substrats fonctionnalisés

Le greffage de la molécule doit se faire grâce au groupement siloxane en présence d'un catalyseur acide. En effet, dans ces conditions, il est attendu que le groupement siloxane s'hydrolyse puis se condense à la surface de la lame d'ITO immergée dans la solution. Pour permettre une bonne condensation, les groupements hydroxyles auront été préalablement rendus disponibles par une activation de la surface (voir schéma de principe sur la Figure 3.10).

À partir de ces substrats potentiellement fonctionnalisés, il s'agit de vérifier plusieurs choses :

- d'une part que la monocouche est bien présente et que la densité de greffage est cohérente avec celle d'une monocouche,
- s'il s'avère que c'est effectivement une monocouche, de vérifier qu'elle est électroactive,
- et qu'on est capable de détecter la fluorescence qu'elle émet.

Ces aspects sont traités dans le paragraphe 3.2.

Si les problématiques de diffusion sont omniprésentes pour l'étude de l'électrofluorochromisme en solution, le cas de l'électrofluorochromisme solide n'est pas sans soulever d'autres difficultés et ces dernières sont d'autant plus présentes à l'échelle de la monocouche. En effet, l'intensité de l'émission de fluorescence d'une monocouche est non seulement intrinsèquement faible, mais elle est surtout très faible en comparaison avec l'intensité lumineuse qui provient du substrat verre/ITO sur lequel elle est greffée. Ce dernier est fluorescent mais également diffuse la lumière si bien que le signal "à détecter" représente une partie infime du signal effectivement détecté. Ainsi, la question du blanc à soustraire devient prépondérante dans cette configuration et sera donc discutée par la suite.

3.1. Introduction

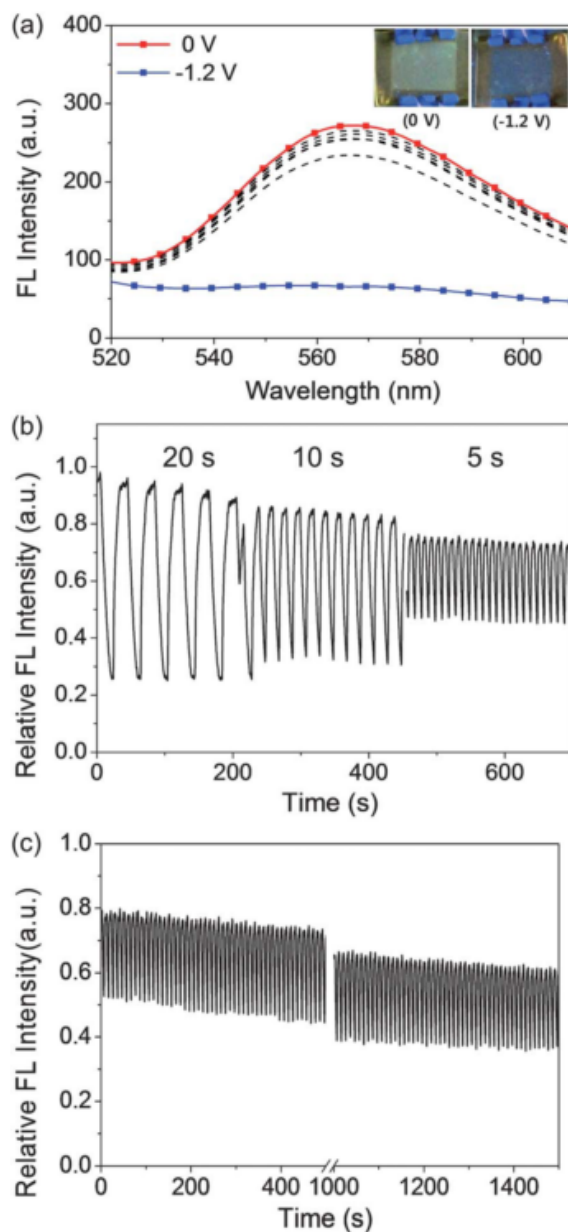


FIGURE 3.9 – En haut : Fluorescence émise par le dispositif soumis à un potentiel dont la valeur varie de 0 V (spectre du haut) à -1,2 V (spectre du bas), avec une décroissance de 0,2 V entre l'enregistrement de chaque spectre. Le potentiel est appliqué systématiquement pendant 20 secondes pour enregistrer l'équilibre. Au milieu : La réponse en fluorescence du dispositif lorsqu'à l'électrode est appliquée une succession de créneaux en potentiel entre 1,2 V et -1,2 V, les durées des créneaux étant successivement de 20 s, 10 s puis 5 s ($\lambda_{exc} = 480$ nm et $\lambda_{em} = 566$ nm) En bas : Etude de la cyclabilité du dispositif sous l'effet de créneaux de potentiel dont la valeur alterne entre 1,2 V et -1,2 V, en restant 5 s au même potentiel. ($\lambda_{exc} = 480$ nm et $\lambda_{em} = 566$ nm)[87]

Chapitre 3. L'électrofluorochromisme de monocouches de tétrazines greffées sur une électrode d'ITO

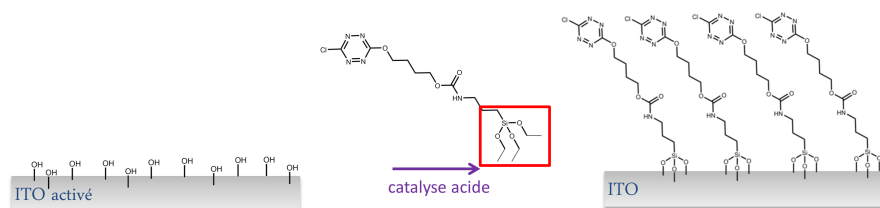


FIGURE 3.10 – Greffage de la molécule ESTZ sur des lames d'ITO activé en présence d'un catalyseur acide

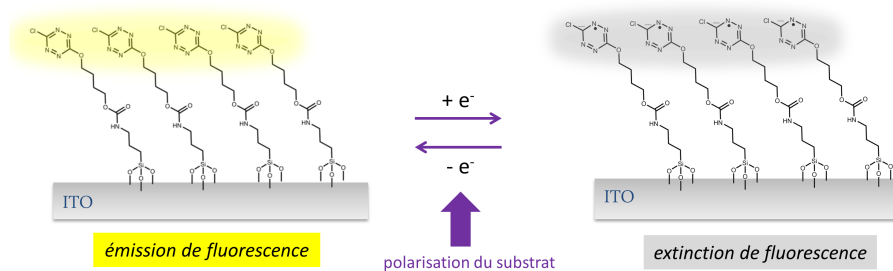


FIGURE 3.11 – Modulation de l'émission de fluorescence de la monocouche de tétrazine par polarisation du substrat

Finalement, s'il s'avère que la monocouche des tétrazines greffées est effectivement à la fois électroactive et émettrice de fluorescence, il serait intéressant d'étudier, comme précédemment en solution, le couplage entre ces deux propriétés et de moduler l'intensité de l'émission de fluorescence de la monocouche par le contrôle électrochimique du degré d'oxydation des tétrazines immobilisées à la surface de la lame d'ITO.

Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

Dans la suite, deux propriétés de l'ITO sont utilisées pour, d'une part moduler électrochimiquement la fluorescence de la monocouche, d'autre part détecter cette modulation, à savoir :

- sa transparence qui doit permettre à la fois, d'exciter la monocouche à travers le substrat et, de collecter la lumière émise ;
- sa conductivité qui doit permettre, par le contrôle de la valeur du potentiel qui lui est appliqué, de réduire puis de réoxyder les centres tétrazines, de façon à éteindre puis rallumer la fluorescence de la monocouche.

On peut s'en rendre compte sur le schéma de principe de l'expérience décrit sur la Figure 3.11.

Contrairement à l'étude de l'électrofluorochromisme en solution dans laquelle un renouvellement des fluorophores est perpétuellement assuré par diffusion ou convection naturelle, celui de l'électrofluorochromisme solide présente encore une difficulté supplémentaire, d'autant plus vraie à l'échelle de la monocouche. En effet, une mauvaise réversibilité électrochimique (même faiblement) ou le photoblanchiment des fluorophores prennent alors une importance considérable sur l'intensité

3.2. Préparation et caractérisation des monocouches

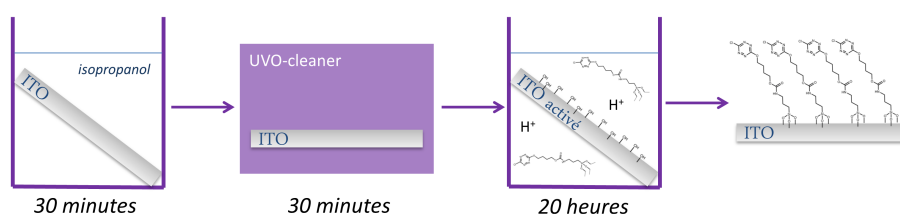


FIGURE 3.12 – Protocole de greffage de la monocouche de tétrazines sur les lames d'ITO

du signal mesuré et limitent largement le temps de mesure par échantillon. Une tentative de correction de la cinétique de blanchiment sera proposée dans la suite.

Ces aspects sont traités dans le paragraphe 3.3.

3.2 Préparation et caractérisation des monocouches

3.2.1 Protocole de greffage

Une solution de greffage est préparée en respectant les proportions suivantes : dans un volume de 30 mL de dichlorométhane sont introduits successivement 30 mg de ESTZ et 25,0 μL d'acide acétique glacial. La solution est agitée vigoureusement entre chaque ajout. L'acide, quant à lui, est introduit juste avant l'immersion des lames d'ITO préalablement activées selon le protocole décrit ci-dessous. Les lames d'ITO sont immergées dans de l'isopropanol pendant 30 minutes, pour enlever les graisses, et séchées à l'air comprimé. Elles sont ensuite traitées durant 30 minutes à l'UVO-cleaner afin d'activer la surface. Puis elles sont immédiatement immergées dans la solution d'alkoxytétrazine siloxane dont le protocole de préparation a été décrit ci-dessus. Après 20 heures d'immersion dans l'obscurité, les lames d'ITO sont retirées de la solution puis rincées abondamment avec du dichlorométhane (dans trois béchers successifs) et séchées à l'air libre. Les échantillons ainsi obtenus sont maintenus à l'abri de la lumière et systématiquement étudiés dans la journée. les différentes étapes de ce protocole sont résumées sur le schéma de la Figure 3.12.

3.2.2 Caractérisation des surfaces fonctionnalisées

Pour preuve du dépôt, plusieurs caractérisations sont mises en œuvre.

Spectroscopie infra-rouge

Le greffage de la molécule est étudiée par IR-ATR dans le cadre d'une collaboration avec P. Lang de l'ITODYS. La Figure 3.13 montre la superposition de trois spectres :

- en violet, le spectre (a) de la molécule liquide pure
- en vert, le spectre (b) de la molécule hydrolysée en présence d'acide acétique dans le dichlorométhane pendant 15 heures.
- la lame d'ITO ayant subi le protocole de dépôt.

Le spectre de la molécule pure présente les caractéristiques du groupement carbamate [34] avec $\nu_{\text{C=O}}$ (I, 1716 cm^{-1} , forte (F)), $\delta_{\text{N-H}}$ (II, 1515 cm^{-1} , F), $\delta_{\text{C-N}} + \nu_{\text{CN-H}}$

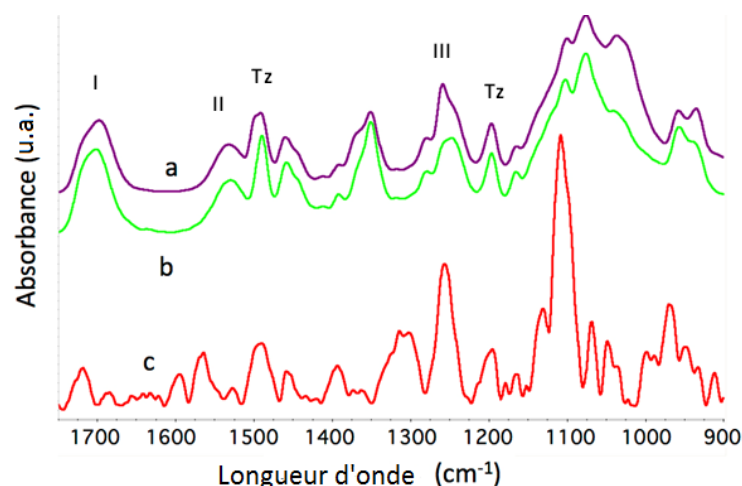


FIGURE 3.13 – Spectres IR-ATR de (a) la molécule liquide ESTZ pure, (b) la molécule liquide ESTZ après hydrolyse en présence d'acide acétique, (c) la lame d'ITO après protocole de greffage

(III, 1280cm^{-1} , moyennement faible (m-f)), $\nu_{as,C-O-C}$ (1246cm^{-1} , asym., s) $\nu_{C-N} + \nu_{C-O} + \delta_{OCN} + \delta_{C-C}$ (957cm^{-1} , s), et également celles de la chaîne alkyle avec la déformation δ_{CH_2} (1460cm^{-1} , m). Le groupement tétrazine Tz [55] est mis en évidence par les bandes d'élongation du cycle à ($1498-92\text{cm}^{-1}$, s; 1458cm^{-1} , m), par la vibration ν_{Tz-O-C} (1197cm^{-1} , asym., m) et aussi par celle à 780cm^{-1} (m). Ces bandes ne sont pas significativement modifiées lors du processus d'hydrolyse.

L'hydrolyse du groupement éthoxysilane est visible grâce à la décroissance de δ_{OCH_2} (1498cm^{-1} , épaulement), δ_{CH_3} (1370cm^{-1} , sym., m), le doublet $\nu_{as,Si-O-Et}$ (1103 , 1077cm^{-1} , asym., s), $\nu_{s,Si-O-Et}$ (935cm^{-1} , sym, s-m) et $\nu_{Si-O-Et}$ (1037cm^{-1} , m).

La monocouche adsorbée est probablement hydrolysée et condensée comme le laisse supposer l'absence de bande à 1077cm^{-1} et l'apparition d'une bande forte et large localisée à 1108cm^{-1} et attribuée à l'élongation de Si-O-Si. A côté de la bande C=O déjà vue sur le spectre de la molécule pure à 1716cm^{-1} , une autre bande apparaît à 1680cm^{-1} attribuée au groupement C=O qui a formé des liaisons hydrogènes. De la même façon, la bande δ_{NH} est décalée de 1532cm^{-1} (dans la molécule pure) à 1568cm^{-1} (dans la monocouche). Ceci peut s'expliquer par la présence de fortes liaisons hydrogènes entre le groupement NH et les groupements C-O ou C=O. Les bandes de la tétrazine restent globalement inchangées après greffage. Ainsi, par les mesures ATR-IR, il est possible de conclure à l'hydrolyse de la monocouche et à sa bonne condensation via la formation de groupements Si-O-Si. La présence de liaisons hydrogènes fortes principalement par l'entité NH est très probablement le signe d'une organisation des chaînes de molécules dans la monocouche.

Voltamétrie cyclique

Les lames d'ITO modifiées sont ensuite caractérisées par voltamétrie cyclique. Les résultats sont montrés sur la Figure 3.14. La courbe représentant le courant mesuré lors du balayage en potentiel présente deux pics en réduction et en oxydation qui sont symétriques comme attendu pour une molécule électroactive greffée à la surface d'une électrode. Le signal électrochimique est réversible, montrant que le

3.2. Préparation et caractérisation des monocouches

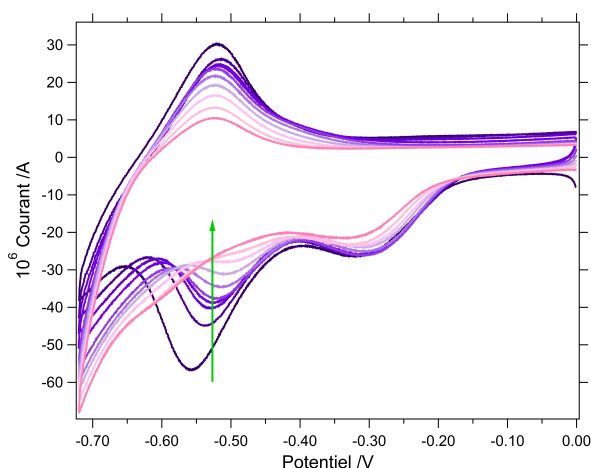


FIGURE 3.14 – Voltamétrie cyclique. Electrode de travail : lame d'ITO greffée. Electrode de référence : fil d'argent. Contre-électrode : fil de platine. Electrolyte : TBAF/dichlorométhane 0,1 M. Vitesse de balayage : 100 mV/s. Dix cycles successifs.

noyau tétrazine peut être réduit en un radical anion stable qui est réoxydé en tétrazine neutre lors du balayage retour, de façon similaire à ce qui est observé lorsque la molécule est en solution. De plus, la quantité de charges liée à la conversion redox peut être déduite de l'intégration du pic observé en réduction et ainsi permettre l'estimation de la densité de greffage [30]. Une valeur de Q égale à $100 \mu\text{C}$ est ainsi obtenue, donnant un taux de couverture :

$$n = \frac{Q}{F * S} = 2,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2} \quad (3.1)$$

Avec F la constante de Faraday et S l'aire de l'électrode immergée.

Un tel taux de couverture est cohérent avec la formation d'une monocouche probablement non densément greffée si on se réfère à la valeur correspondante pour le ferrocène [39]. La largeur à mi-hauteur des pics de courant est proche de la valeur théorique de 90 mV attendue pour un transfert de charge monoélectronique, ce qui tend à prouver que les interactions électrostatiques sont négligeables entre les espèces chargées. Une telle constatation va également dans le sens de l'hypothèse d'une monocouche régulière et non sous la forme de "paquets".

Il est à noter que le pic de réduction de la tétrazine siloxane est accompagné d'un second pic visible pour des potentiels moins négatifs. Ce pré-pic implique vraisemblablement le noyau tétrazine car il évolue de la même façon que le pic de réduction principal sous l'effet de balayages en potentiel cycliques successifs. Ce pic a été attribué à une réduction assistée par un proton qui est visiblement non réversible. L'explication d'une telle attribution sera développée dans le paragraphe 3.3.5.

Ainsi, l'étude par voltamétrie cyclique des échantillons greffés confirme l'électroactivité de la monocouche et sa réversibilité.

Microscopie de fluorescence

La fluorescence des échantillons ayant suivi le protocole de greffage décrit dans le paragraphe 3.2.1 est enregistrée sur le microscope de fluorescence avec le spectrophotomètre.

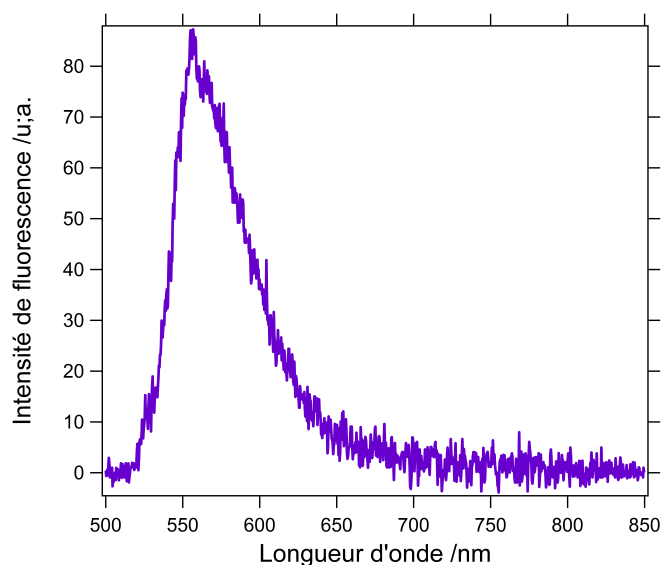


FIGURE 3.15 – Spectre d'émission d'un échantillon ITO-monocoucheTz enregistré avec le microscope de fluorescence

Le spectre ainsi obtenu est représenté sur la Figure 3.15. Il présente une large bande avec un maximum vers 562 nm caractéristique des tétrazines alcoxysilanes [80].

Ainsi, il semble donc que la monocouche fluoresce et que la sensibilité du dispositif expérimental est suffisante pour la détecter.

3.3 Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

Les techniques de caractérisation précédemment mises en œuvre tendent à démontrer que le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.1 permet de greffer la tétrazine siloxane sur les substrats d'ITO comme attendu. De plus, il semblerait que la tétrazine se comporte encore comme un fluorophore électroactif une fois immobilisée sur l'ITO. Comme le signal électrochimique est réversible, toutes les conditions sont remplies pour tester les propriétés électrofluorochromiques de la monocouche.

3.3.1 Dispositif expérimental pour l'étude de la modulation

Pour mener à bien cette étude, le dispositif expérimental utilisé couple une cellule électrochimique à trois électrodes à un microscope inversé de fluorescence similaire à celui présenté sur la Figure 1.26. La cellule électrochimique est positionnée sur la platine du microscope. La lame d'ITO fonctionnalisée par la monocouche de tétrazine est utilisée en tant qu'électrode de travail de la cellule électrochimique et en tant que substrat transparent permettant le passage des faisceaux d'excitation et d'émission (voir schéma du dispositif expérimental de la Figure 3.16). Un fil d'argent et un fil de platine font office respectivement d'électrode de référence et de contre-électrode. L'électrolyte utilisé est une solution de tétrabutylammonium hexafluorophosphate dans le dichlorométhane à 0,1 M préalablement dégazée pendant 10 minutes à l'argon. Le flux d'argon est ensuite maintenu pendant toute la durée de

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

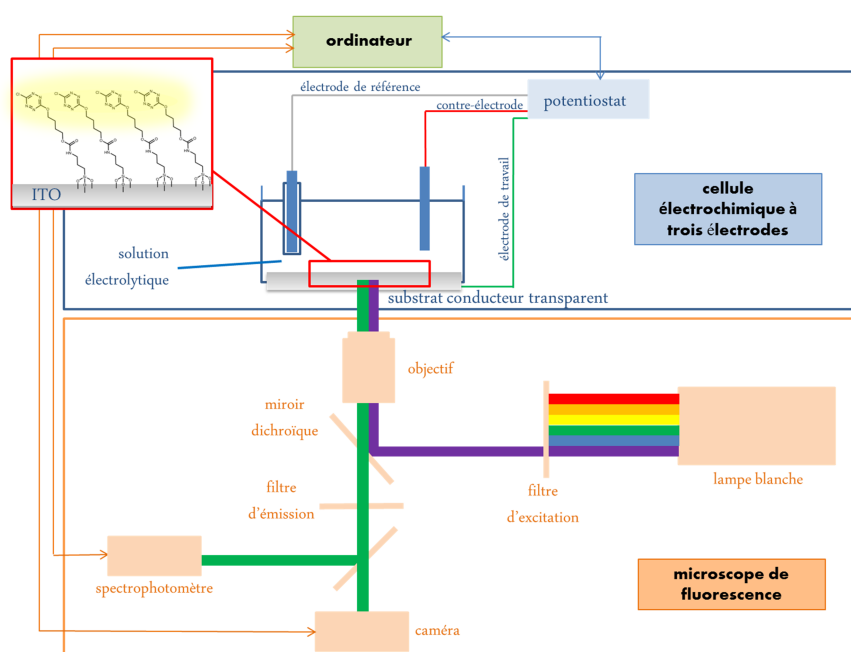


FIGURE 3.16 – Schéma du dispositif expérimental. L'échantillon d'ITO fonctionnalisé sert d'électrode de travail et de substrat transparent permettant l'excitation et la collecte de la fluorescence.

la manipulation en surface de la solution. Le solvant utilisé est soit distillé, soit issu d'une bouteille "grade spectro" neuve. L'objectif est de limiter autant que possible la présence d'eau qui pourrait nuire à la réversibilité de la réaction électrochimique.

Le potentiostat est utilisé pour contrôler le potentiel de la lame d'ITO fonctionnalisée, l'objectif étant de réduire réversiblement le noyau tétrazine de la molécule immobilisée à la surface du substrat et d'observer la modulation de la fluorescence qui en résulte. Pour cela, la monocouche est excitée en continu par l'association d'une lampe blanche, d'un filtre d'excitation et d'un miroir dichroïque. Le faisceau d'excitation est focalisé par l'intermédiaire de l'objectif à l'interface substrat-électrolyte.

La lumière émise est collectée à travers le substrat, l'objectif, le miroir dichroïque et un filtre d'émission soit par la caméra CCD, soit par le spectrophotomètre.

3.3.2 Modulation de la fluorescence : mise en évidence à l'aide de la caméra CCD

Dans cette configuration, une première expérience est réalisée en appliquant à l'électrode de travail la séquence en potentiel suivante : PCO (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (10 s). Le potentiel est porté à trois reprises à -0,65 V, valeur se situant largement au-delà du deuxième pic de réduction observé sur la voltamétrie cyclique de la Figure 3.14, ce qui doit permettre de réduire les noyaux tétrazines en radicaux anions. Le retour systématique du potentiel à 0 V doit quant à lui permettre de régénérer l'état oxydé des molécules. Parallèlement à ce signal en potentiel, l'intensité de fluorescence est enregistrée au cours du temps à l'aide de la caméra CCD. Une chute de cette intensité devrait être observée à chaque saut du potentiel entre 0 V et -0,65 V. Au contraire, les passages de -0,65 V à 0 V devraient s'accompagner d'une réaugmentation du signal mesuré.

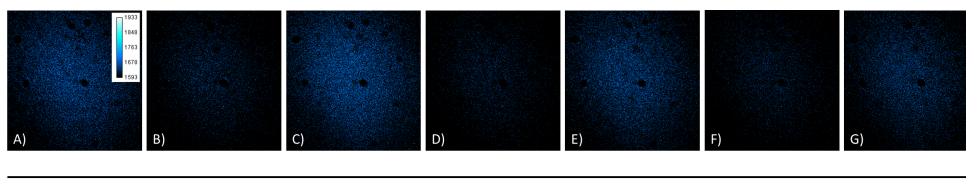


FIGURE 3.17 – Sélection d'images enregistrées avec la caméra CCD lorsqu'est appliqué au substrat fonctionnalisé par la monocouche la séquence en potentiel suivante : PCO (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (10 s). La mise au point est faite sur l'interface substrat/solution. (PCO : Potentiel de Circuit Ouvert)

Suite à l'application de ce potentiel, il est donc attendu trois cycles successifs d'extinction puis rallumage de la fluorescence.

Sur la Figure 3.17 sont reportées quelques unes des images de fluorescence enregistrées tout au long de la manipulation décrite ci-dessus. Elles ont été sélectionnées de façon à rendre compte de l'effet de chaque changement de la valeur du potentiel sur celle de l'intensité de fluorescence détectée par la caméra. Ainsi, les images A), C), E) et G) ont été prises aux différents moments de la manipulation où le potentiel appliqué était de 0 V, les images B), D) et F) à ceux où il était de -0,65 V. La comparaison des images A) et B) rend compte de la variation de l'intensité lumineuse causée par le premier passage de 0 V (en A) à -0,65 V (en B), celle de B) et C) de celle causée par le premier retour à 0 V (en C) et ainsi de suite. Au vue de ces images, il apparaît nettement que l'intensité de fluorescence est modulée sous l'effet du potentiel. En effet, le premier passage de 0 V (image A) à -0,65V (image B) s'accompagne visiblement d'une chute de l'intensité de fluorescence qui réaugmente avec le retour à 0 V (image C). De la même façon, le deuxième passage de 0 V (image C) à -0,65 V (image D) corrèle avec une baisse de l'intensité et à sa restauration avec le retour à 0 V (image E). Globalement, les images A), C), E) et G) semblent correspondre à un état « allumé » tandis que les images B), D) et F) paraissent correspondre à un état « éteint » : trois phases successives d'extinction-rallumage sont bien observées comme espérées.

La comparaison des images A), C), E) et G), cette fois-ci entre elles, met en évidence un autre effet : on constate une baisse de l'intensité lumineuse de l'état allumé au cours de la manipulation (de A à G). Cette baisse peut sans doute être attribuée aux phénomènes de blanchiment et de non réversibilité électrochimique précédemment évoqués.

En conclusion, la caméra a permis de mettre en évidence une corrélation entre le signal en potentiel et l'intensité de fluorescence émise par l'échantillon. Elle a montré que cette corrélation allait dans le sens attendu à savoir que l'application d'un potentiel négatif conduit à une chute de l'intensité de fluorescence tandis que le retour à un potentiel nul s'accompagne d'une réaugmentation de la fluorescence. Cependant, pour que cette modulation de la fluorescence puisse être attribuée au couple tétrazine/radical anion, il peut être intéressant de reproduire la même expérience en enregistrant la fluorescence non pas avec la caméra mais avec le spectromètre.

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

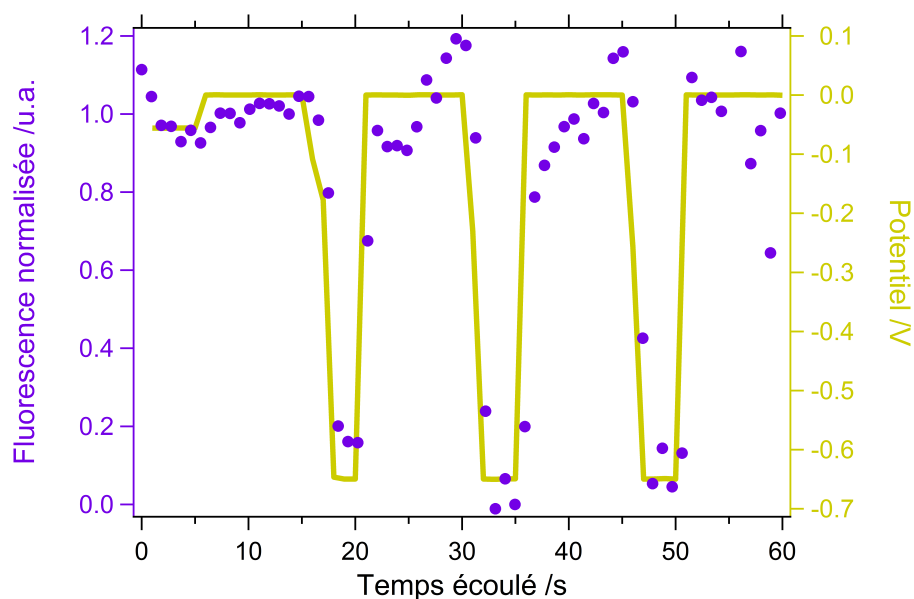


FIGURE 3.18 – Ligne jaune : séquence de potentiel appliquée à l'échantillon d'ITO traité avec la tétrazine siloxane. Points violets : chronofluorogramme enregistré parallèlement à l'aide du spectrophotomètre, la mise au point du microscope étant faite à l'interface substrat/solution. Il s'agit du chronofluorogramme corrigé du "blanc", du blanchiment et normalisé.

3.3.3 Modulation de la fluorescence observée à l'aide du spectrophotomètre : mise en évidence du spectre de la tétrazine

Une expérience similaire est donc mise en œuvre. Le dispositif expérimental est le même que celui décrit dans la section 3.3.1. La séquence en potentiel appliquée au nouvel échantillon (ayant subi le même protocole de dépôt, décrit paragraphe 3.2.1) servant d'électrode de travail est la suivante : PCO (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s). Il correspond à trois périodes d'extinction-rallumage. Parallèlement à ce signal, l'intensité de fluorescence est enregistrée à l'aide du spectromètre.

L'évolution de l'intensité de fluorescence enregistrée au cours du temps est superposée au signal en potentiel appliqué à l'échantillon au cours du temps sur la Figure 3.18. Comme dans le cas de la caméra CCD, le signal détecté par le spectrophotomètre est fortement corrélé au signal électrochimique.

Afin de s'assurer que la modulation observée n'est pas due au substrat ou à l'électrolyte, la même expérience est reproduite avec une lame de verre recouverte d'ITO non fonctionnalisée. Dans cet objectif, les lames d'ITO nues utilisées sont des lames d'ITO ayant subi le même protocole de préparation que les échantillons monocouches, toutefois, sans contact avec la ESTZ. Ainsi, de la même façon, elles ont été immergées dans l'isopropanol puis mis à l'UVO-cleaner et enfin immergées dans une solution acide ou non de dichlorométhane pendant 20 heures. Finalement, le potentiostat applique aux blancs, préalablement traités comme décrit ci-dessus, la séquence en potentiel suivante (Figure 3.19 A) : PCO (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s), -0,65 V (5 s), à V (15 s), -0,65 V (5 s) 0 V (15 s). L'amplitude de la modulation observée est très faible devant celle d'un échantillon greffé. Ceci tend à démontrer que

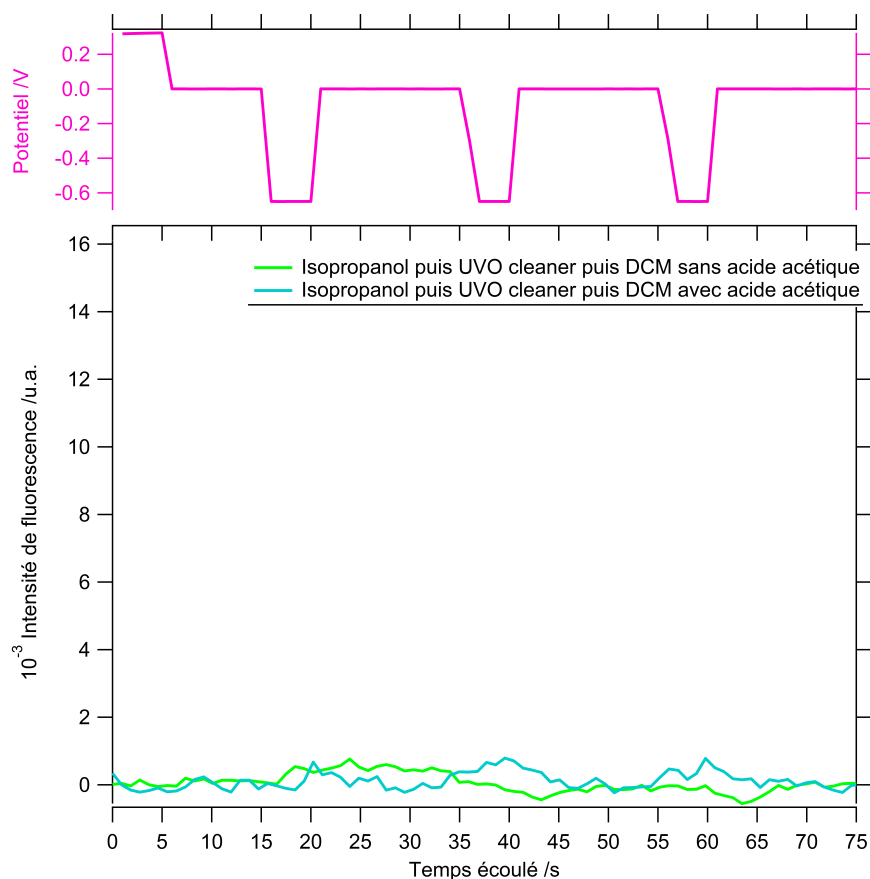


FIGURE 3.19 – En haut : séquence en potentiel appliquée à des lames d'ITO ayant subi le traitement isopropanol - UVO cleaner - dichlorométhane en présence ou en l'absence d'acide acétique. En bas : évolution de l'intensité de fluorescence mesurée parallèlement à l'application de la séquence en potentiel sur des échantillons "blancs" préparés en présence (bleu) ou en l'absence (vert) d'acide acétique.

la modulation observée dans le paragraphe précédent est bien due à la monocouche et non au substrat.

Dans la suite est décrit le traitement ayant permis, à partir du spectre brut, d'obtenir le profil cinétique de l'intensité fluorescente normalisée de la monocouche de la Figure 3.18 ainsi que celui du blanc de la Figure 3.19.

Le traitement des spectres : le choix du "blanc" à soustraire

Sur la Figure 3.20 sont représentés les spectres bruts enregistrés par le spectrophotomètre avec le jeu de filtres décrit en annexe avec l'échantillon monocouche. Les spectres bruts obtenus dans le cas de l'échantillon blanc sont représentés sur la Figure 3.21.

Sur les spectres bruts enregistrés avec l'échantillon monocouche, l'essentiel de la fluorescence détectée est en réalité la somme de plusieurs contributions : bien sûr celle de la monocouche mais aussi celle du substrat (verre-ITO) et celle de la solution électrolytique. En effet, le montage utilisé utilise une excitation plein champ et la profondeur de champ est grande.

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

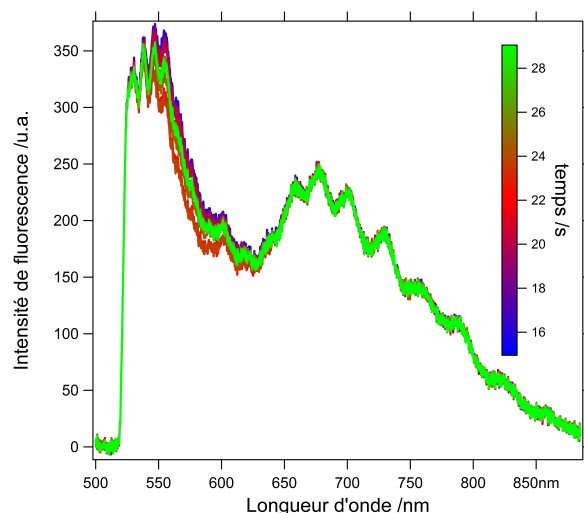


FIGURE 3.20 – Spectres bruts enregistrés avec le spectrophotomètre lors de l'application, à une lame de verre recouverte d'ITO traité avec la tétrazine ESTZ, de la séquence de potentiel suivante : PCO (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s). Les spectres représentés sont ceux enregistrés entre 12 et 23 secondes (premier cycle d'extinction-rallumage).

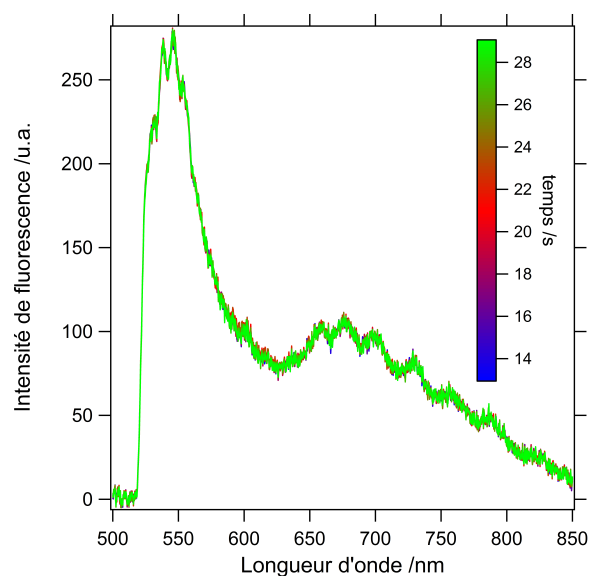


FIGURE 3.21 – Spectres bruts enregistrés avec le spectrophotomètre lors de l'application de la séquence de potentiel suivante à une lame de verre recouverte d'ITO "blanc" : PCO (5 s), 0 V (10 s), -0,65 V (5 s), 0 V (15 s), -0,65 V (5 s), à V (15 s), -0,65 V (5 s) 0 V (15 s). Les spectres représentés sont ceux enregistrés entre 12 et 30 secondes.

De plus, il apparait nettement que les spectres sont constants sur un grand nombre de longueurs d'onde, sauf dans une zone comprise entre 530 et 620 nm environ. Cette zone correspond justement à celle dans laquelle la tétrazine émet.

Afin d' "éliminer" la fluorescence du substrat et de l'électrolyte et de mettre en évidence le spectre de la tétrazine et sa modulation, un spectre "blanc" peut être soustrait à l'ensemble des spectres bruts de la cinétique. Se pose donc la question du choix du spectre à soustraire. Puisque le spectre de l'ITO nu ne module pas sous l'effet du potentiel, le même spectre peut être soustrait à l'ensemble des spectres de la cinétique.

Le meilleur spectre "blanc" à soustraire à chacun des spectres de la cinétique d'un échantillon est sans doute celui enregistré à partir d'une lame de verre recouverte d'ITO nu ayant subi le même traitement que l'échantillon (isopropanol, UVo-cleaner et dichlorométhane) mais sans avoir été mis en contact avec la tétrazine d'intérêt. Dans la pratique, un problème majeur se pose à l'utilisation d'un tel blanc. En effet, l'enregistrement du spectre d'une lame de verre recouverte d'ITO autre que celle de l'échantillon suppose qu'il a été nécessaire de démonter puis remonter la cuve avec un autre substrat et de régler à nouveau la mise au point du microscope. Cette dernière est en réalité très difficile à reproduire exactement. Un "blanc" tel que décrit ci-dessus parvient très rarement à supprimer exactement la contribution du substrat à la fluorescence globale. Il aurait sans doute fallu appliquer un facteur correctif au spectre de l'ITO nu pour qu'il coïncide avec celui de l'échantillon.

Un autre spectre "blanc" envisageable est un spectre de la cinétique elle-même enregistré lorsque la tétrazine est sous sa forme réduite (celui pour lequel l'intensité intégrée est minimale). Cependant, un tel blanc revient à supposer que la modulation est forcément totale (de 100 %) à un moment donné de la cinétique.

Dans la pratique, les meilleurs blancs ont été les spectres enregistrés à partir des échantillons eux-mêmes lorsque, à la suite de la cinétique, ils avaient été irradiés et polarisés négativement suffisamment longtemps pour blanchir l'ensemble de la monocouche.

Sur la Figure 3.22 sont reportés les spectres de la Figure 3.18 auxquels a été soustrait un spectre de la même cinétique lorsque le potentiel appliqué à l'ITO est de -0,65 V, donc lorsque la tétrazine est supposée sous sa forme réduite.

Une large bande d'émission avec un maximum vers 565 nm cohérente avec les propriétés d'émission de la tétrazine est clairement visible. Pour rappel, les spectres représentés sont ceux enregistrés lors du premier cycle d'extinction rallumage. Grossièrement, les spectres en bleu sont ceux avant réduction (lorsque le potentiel appliqué est égal à 0 V), en rouge ceux enregistrés lorsque le potentiel a été porté à -0,65 V et en vert ceux après le retour du potentiel à 0 V. Lorsque le potentiel passe de 0 V à -0,65 V (du bleu au rouge), le maximum d'émission baisse en intensité, ce qui est cohérent avec la réduction supposée de la tétrazine neutre émettrice en radical anion non émetteur. Lors du retour du potentiel à 0 V (du rouge au vert), le maximum réaugmente comme espéré pour la réoxydation des radicaux anions en tétrazine neutre. Il est à noter cependant que les maxima des spectres verts sont inférieurs aux maxima des spectres bleus : le retour à 0 V ne permet donc pas de régénérer totalement la tétrazine neutre. Il y a donc vraisemblablement une limitation par blanchiment ou manque de réversibilité électrochimique.

Ainsi, la soustraction du blanc laisse clairement voir une bande d'émission dont l'intensité module sous l'effet du potentiel appliqué au substrat et le sens de la modulation observé est cohérent avec celui attendu pour la réduction de la tétrazine en radical anion suivi de la réoxydation de ce dernier en molécule neutre.

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

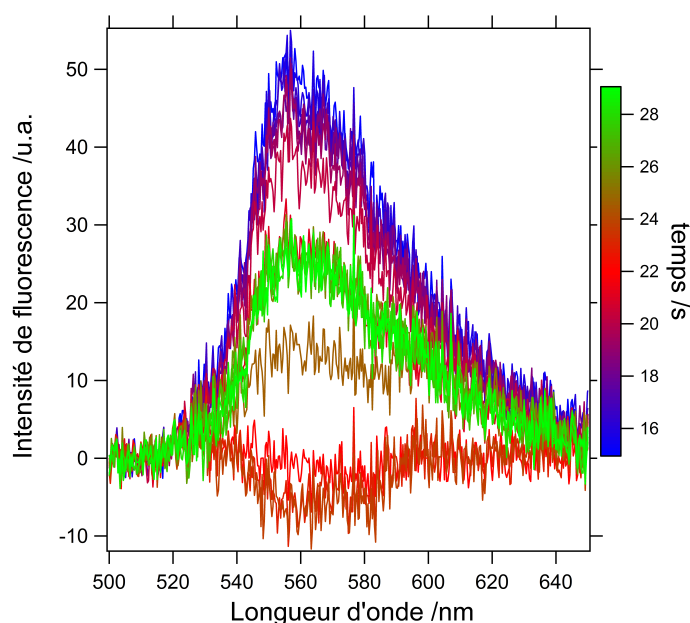


FIGURE 3.22 – Spectres bruts de la Figure 3.20 auxquels a été soustrait un spectre "blanc" correspondant à un spectre de la même cinétique enregistré lorsque l'échantillon est polarisé pour la troisième et dernière fois à $-0,65$ V

La correction des profils d'émission

Afin de visualiser les cinétiques d'extinction et de rallumage, l'ensemble des spectres enregistrés parallèlement aux trois cycles d'extinction-rallumage, auxquels on a préalablement soustrait le blanc, sont intégrés entre 530 et 615 nm. L'aire sous les spectres est ensuite représentée en fonction du temps d'acquisition sur la Figure 3.23.

Sur le profil ainsi obtenu, une cinétique de blanchiment de la monocouche est clairement visible. Pour obtenir le profil de la Figure 3.18, il reste encore à corriger le profil de cette cinétique de blanchiment. La correction étant aussi une normalisation, elle doit permettre de faciliter la comparaison entre les cinétiques enregistrées pour différents échantillons car l'intensité de fluorescence mesurée initialement et la cinétique de blanchiment sont peu reproductibles.

Pour la correction, seuls les points de la cinétique enregistrés lorsque le potentiel est tel que la molécule soit sous sa forme qui émet de la fluorescence (périodes à 0 V) sont utilisés. L'ajustement numérique d'une fonction monoexponentielle sur ces seuls points de la cinétique permet d'obtenir la courbe rouge. Finalement, la division de la cinétique correspondant à l'intégration des spectres d'émission au cours des trois cycles d'extinction-rallumage par la modélisation du blanchiment préalablement interpolée sur le nombre de spectres de la cinétique donne la courbe corrigée et normalisée de la Figure 3.18.

Les études de l'électrofluorochromisme de substrats d'ITO fonctionnalisés par des monocouches de tétrazine rapportées jusqu'ici ont permis :

- de visualiser, avec la caméra, l'interface substrat-solution et de voir sa fluorescence moduler sous l'effet du signal électrochimique ;

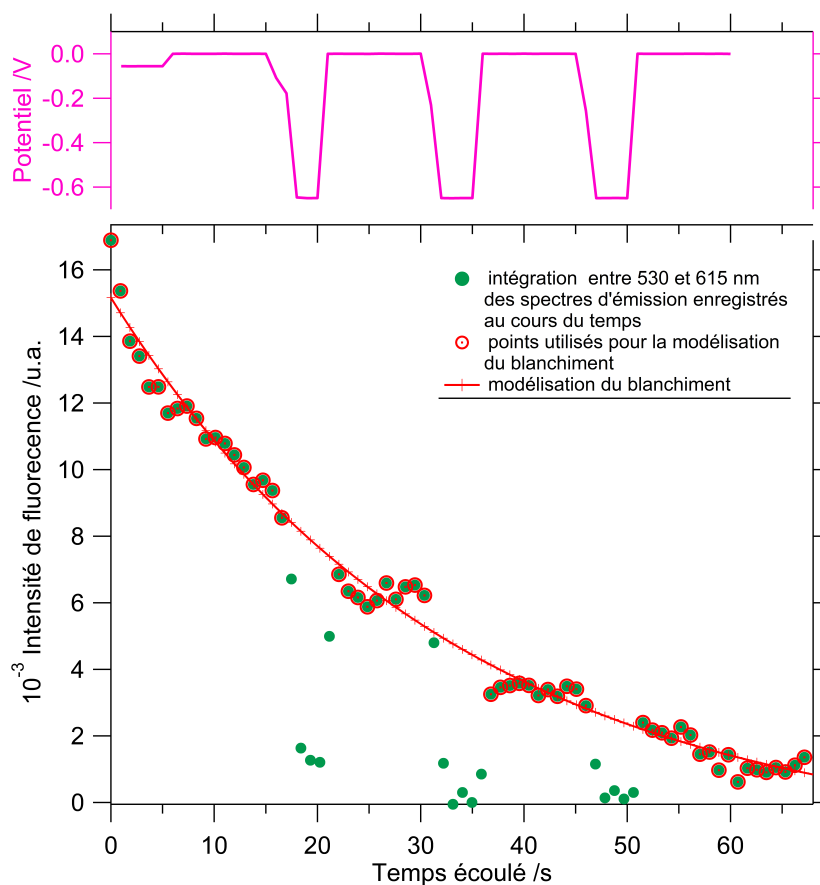


FIGURE 3.23 – En haut : rappel de la séquence en potentiel appliquée à une lame de verre recouverte d'ITO traité avec la tétrazine. En bas : chronofluorogramme obtenu par intégration entre 530 et 615 nm des spectres (préalablement soustraits du blanc) enregistrés parallèlement à la séquence en potentiel ci-dessus (points verts). Les points de ce chronofluorogramme utilisés pour la modélisation de la cinétique de blanchiment sont entourés en rouge. L'ajustement numérique d'une fonction exponentielle sur les cercles rouges pour la modélisation du blanchiment est reporté en rouge.

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

- de visualiser, avec le spectrophotomètre, le spectre d'émission de la molécule de la tétrazine et sa modulation sous l'effet de l'application du signal électrochimique ;
- d'extraire de la série de spectres un chronofluorogramme qui confirme que signal électrochimique et signal de fluorescence sont bien corrélés et que les cinétiques du signal de fluorescence sont rapides.

Dans la suite, la correction-normalisation des chronofluorogrammes proposée ci-dessus va permettre de faire varier différents paramètres du signal électrochimique afin d'étudier les limites et possibilités du dispositif. Les différents paramètres sont :

- le nombre de cycles de réduction (paramètre déjà étudié),
- la durée de la réduction,
- la valeur du potentiel à la réduction,
- la concentration en acide de la solution de greffage.

3.3.4 Influence de la valeur et de la durée d'application du potentiel de réduction

Sur la Figure 3.24 est reportée la cinétique obtenue par intégration des spectres puis correction et normalisation du profil lorsque le potentiostat applique 3 sauts de potentiel entre 0 V et -0,65 V et réciproquement non plus d'une durée de 5 secondes mais de 15 secondes. Il semble que le signal de fluorescence soit toujours correctement corrélé au signal en potentiel. Toutefois, la dernière modulation apparaît plus bruitée, sans doute à cause du blanchiment important de la tétrazine greffée.

L'objectif suivant est de démontrer que le signal d'émission de la monocouche peut être contrôlé par le potentiel de l'électrode. Pour cela, une séquence composée de trois sauts successifs est encore appliquée à l'ITO. Toutefois, le potentiel de 0 V n'est plus systématiquement porté à une valeur fixe de -0,65 V mais à une valeur de plus en plus négative au fur et à mesure des sauts. Sur la Figure 3.25, le chronofluorogramme corrigé et normalisé résultant de cette expérience est superposé à la séquence en potentiel imposée à l'électrode.

Une variation claire de l'intensité de fluorescence est observée lors du premier saut de potentiel à -0,2 V, confirmant que le pré-pic de réduction observé à ce potentiel sur la voltamétrie cyclique de la Figure 3.14 implique l'entité tétrazine, probablement dans une réaction de réduction assisté par un proton de façon similaire à ce qui peut être observé pour les quinones. Comme la quantité de protons est limitée, une réduction aprotique menant à la formation du radical anion peut aussi avoir lieu à des valeurs de potentiel plus négatives. Cette réaction est responsable de la plus grande chute de l'intensité de fluorescence observée lors du deuxième saut de potentiel à -0,45 V. Le dernier saut à -0,65 V, qui doit vraisemblablement permettre la réduction totale de tous les fluorophores, conduit à une plus faible chute de l'intensité de fluorescence. Ceci s'explique par le fait que le retour du potentiel à 0 V qui précède ce troisième saut ne parvient pas à restaurer l'intensité de fluorescence au même niveau qu'avant le deuxième saut. Toutefois, ce dernier saut conduit à une extinction totale de la fluorescence.

3.3.5 Influence de la concentration en acide de la solution de greffage

Afin de confirmer le rôle de l'acide acétique, une nouvelle série d'expériences est mise en œuvre. Les nouveaux échantillons sont préparés selon un protocole de dépôt

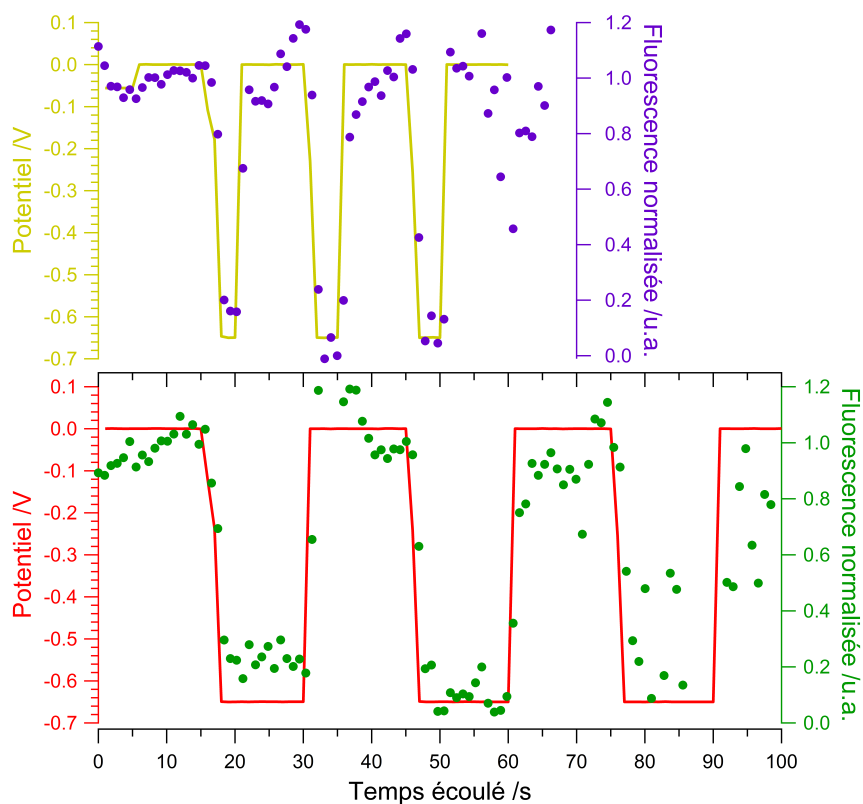


FIGURE 3.24 – En haut : rappel du chronofluorogramme corrigé du "blanc" et du blanchiment et normalisé obtenu avec le spectrophotomètre de la Figure 3.18 pour comparaison (correspond à trois cycles d'extinction de 5 secondes puis rallumage de 10 secondes) En bas : séquence en potentiel appliquée à une autre lame d'ITO traitée avec la molécule ESTZ (correspond à trois cycles d'extinction de 15 secondes puis rallumage de 15 secondes (ligne rouge), chronofluorogramme enregistré parallèlement à cette séquence avec le spectrophotomètre. De la même façon, il est corrigé du "blanc" et du blanchiment et normalisé.

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

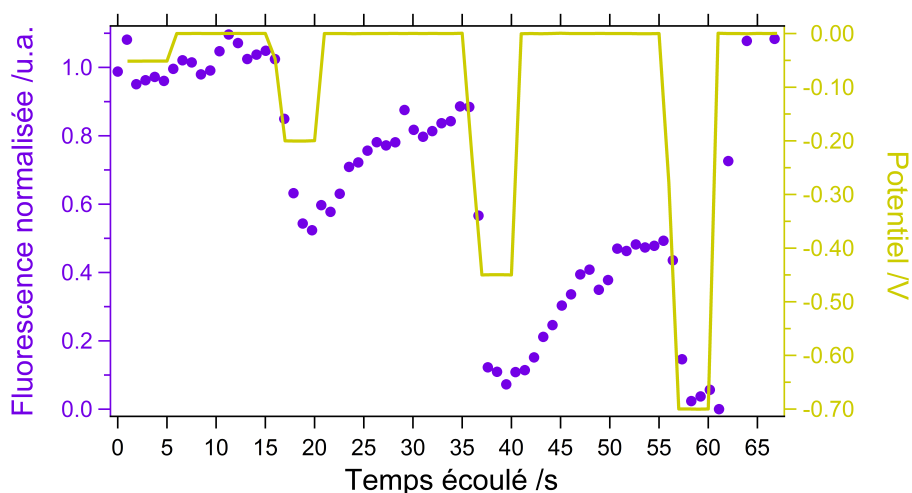


FIGURE 3.25 – Chronofluorogramme obtenu par intégration des spectres d'émission entre 530 et 615 nm préalablement corrigés du blanc (points violets) lorsque le potentiostat applique à l'ITO la séquence en potentiel suivante : PCO (5 s), 0 V (10 s), -0,2 V (5 s), 0 V (15 s), -0,45 V (5s), 0 V (15 s), -0,7 (5 s), 0 V (10 s). Pour comparaison, cette séquence est superposée au chronofluorogramme (courbe jaune)

de la monocouche identique à celui décrit précédemment hormis la concentration en acide acétique de la solution de greffage qui est divisée par 100.

Vérification de l'électroactivité et de la stabilité des nouveaux échantillons

De la même façon, l'électroactivité des nouveaux échantillons est testée par voltamétrie cyclique. La courbe correspondante est représentée sur la Figure 3.26. Elle présente les mêmes pics symétriques en réduction et en oxydation caractéristiques d'un système greffé. La dilution par 100 semble permettre le bon dépôt de la monocouche, ce qui n'a pu être observé avec une dilution par 1000 même après 48 heures d'immersion dans la solution de greffage. La monocouche est électroactive. De plus, le premier pic en réduction est beaucoup moins prononcé apparaissant comme un simple épaulement du second pic. Une telle observation semble confirmer l'hypothèse selon laquelle ce premier pic est dû à la présence d'acide acétique.

La réalisation de cycles successifs semble par contre montrer une moindre stabilité de celle-ci (voir la Figure 3.27). Au bout de seulement quatre cycles, le signal de la monocouche n'est plus visible.

De la même façon que pour les échantillons précédents, la fluorescence de la monocouche peut être détectée, ce qui permet d'envisager des expériences d'électrofluorochromisme.

Modulation de la fluorescence : visualisation à l'aide de la caméra CCD et du spectrophotomètre

Sur la Figure 3.28 est représentée, au milieu, une sélection d'images de fluorescence lorsque le potentiostat applique en parallèle le signal en potentiel rappelé en haut de la même Figure (courbe verte). À ces images a été soustrait un blanc (qui correspond à une image enregistrée à partir du même échantillon après une longue irradiation et l'application d'un potentiel de -0,7 V pendant 30 secondes). Le signal

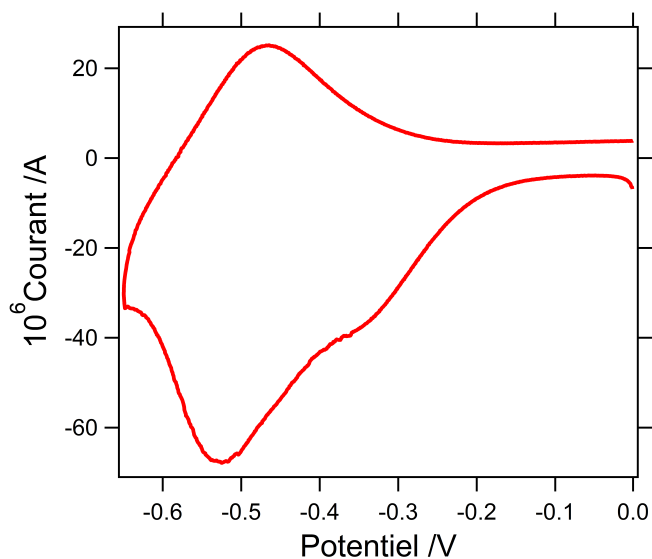


FIGURE 3.26 – Voltamétrie cyclique d'un échantillon d'ITO traité avec la tétrazine en présence d'une concentration en acide acétique 100 fois plus faible. Électrolyte : tétrabutylammonium hexafluorophosphate dans dichlorométhane (0,1 M). Électrode de référence : fil Ag|AgCl. Contre électrode : fil de platine. Vitesse de balayage : 100 mV/s. 1 cycle

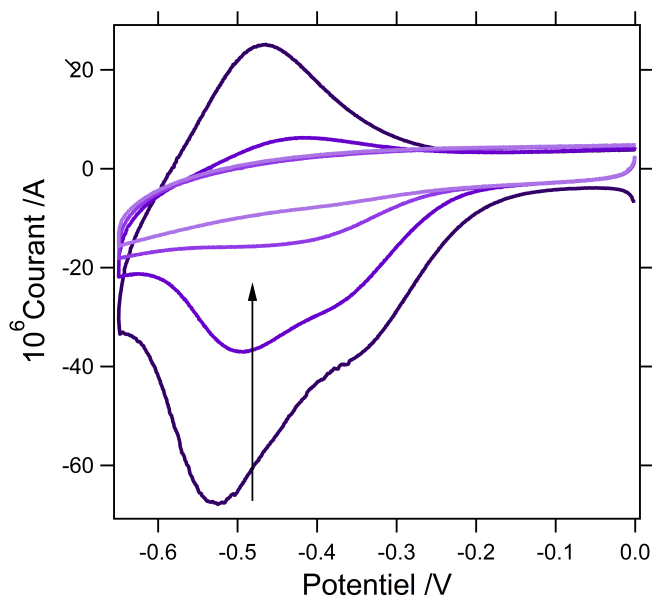


FIGURE 3.27 – Voltamétrie cyclique d'un échantillon d'ITO traité avec la tétrazine en présence d'une concentration en acide acétique 100 fois plus faible. Électrolyte : tétrabutylammonium hexafluorophosphate dans dichlorométhane (0,1 M). Électrode de référence : fil Ag|AgCl. Contre électrode : fil de platine. Vitesse de balayage : 100 mV/s. 4 cycles

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

appliqué parallèlement à l'enregistrement des images correspond à trois cycles d'extinction/rallumage. L'intensité de fluorescence moyenne mesurée au sein de la région d'intérêt considérée (de la même taille que les images) est représentée au cours du temps (courbe verte, bas). Une cinétique de blanchiment est visible, observation similaire à celle faite pour les échantillons greffés en présence d'acide concentré. Ainsi, le chronofluorogramme est corrigé de la même façon que précédemment ce qui permet d'obtenir la courbe en haut superposée au signal en potentiel (points rouges).

Tant sur les images que sur le chronofluorogramme, les trois cycles d'extinction/rallumage sont visibles. L'amplitude de la modulation observée sur le chronofluorogramme normalisée est comparable sur les trois cycles d'extinction comme attendu puisque le potentiel de réduction appliqué est systématiquement de $-0,65$ V. Toutefois, le "blanc" sélectionné ne permet pas d'atteindre la fluorescence nulle espérée à cette valeur du potentiel de réduction (largement plus bas que la valeur du potentiel au pic du courant de réduction sur la voltamétrie cyclique).

La même expérience peut être reproduite en collectant la fluorescence non pas avec la caméra mais avec le spectrophotomètre. Sur la Figure 3.29 sont représentées en haut les spectres enregistrés lors du premier cycle d'extinction/rallumage. Ces spectres correspondent à ceux, bruts, auxquels a été soustrait un spectre "blanc" enregistré à partir du même échantillon après une longue irradiation et une polarisation à $-0,7$ V pendant 30 secondes. Ces spectres présentent bien le maximum à 560 nm caractéristique de la tétrazine et modulent sans changement de forme. Sur la Figure 3.29 en bas, le chronofluorogramme obtenu par intégration des spectres entre 530 et 615 nm sur l'ensemble des trois cycles d'extinction/rallumage puis corrigé par la cinétique de blanchiment est superposé au signal en potentiel appliqué à l'électrode-échantillon. Les trois cycles d'extinction/rallumage sont également bien visibles. De plus, le choix du blanc permet d'atteindre une intensité de fluorescence nulle, comme espérée avec l'application d'un potentiel de réduction bien plus faible que celui auquel est observé le pic de réduction sur la voltamétrie cyclique de la Figure 3.26.

Il est donc possible de moduler électrochimiquement la fluorescence des échantillons greffés en présence d'une quantité moindre d'acide acétique. Cette modulation peut être enregistrée aussi bien avec la caméra qu'avec le spectrophotomètre.

Modulation de la fluorescence : influence de la valeur du potentiel de réduction

L'objectif du nouveau protocole était d'obtenir des échantillons présentant un comportement électrochimique purement Nernstien, à savoir pour lequel la proportion d'espèces réduites et d'espèces oxydées est contrôlée uniquement par le potentiel appliqué à l'électrode. Au niveau de la fluorescence, cela doit se traduire par une chute de fluorescence d'autant plus importante que le potentiel appliqué à la réduction est négatif.

Ainsi, l'expérience des trois cycles de réduction-rallumage avec un potentiel de réduction croissant en valeur absolue d'un cycle au suivant est reconduite sur les nouveaux échantillons. Les spectres de fluorescence sont enregistrés parallèlement à l'application du signal électrochimique. Le chronofluorogramme de la Figure 3.30 est obtenu successivement par intégration des spectres entre 530 et 615 nm, par soustraction d'un blanc (correspondant au même échantillon après une longue irradiation et l'application d'un potentiel de réduction pendant 30 s) et par correction du

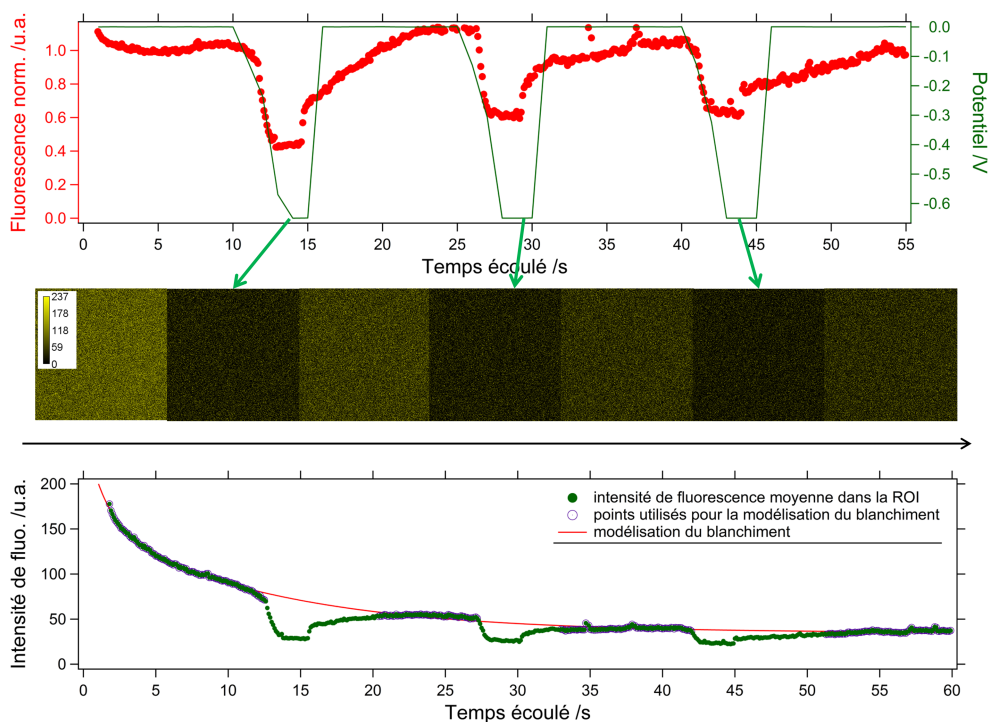


FIGURE 3.28 – En haut : séquence en potentiel appliquée à une lame de verre recouverte d'ITO traitée avec la tétrazine en présence d'une concentration en acide 100 fois plus faible par rapport à celle du protocole initial (ligne verte), chronofluorogramme enregistré avec la caméra parallèlement à la séquence en potentiel soustrait du blanc, corrigé du blanchiment et normalisé. Au milieu : sélections d'images enregistrées avec la caméra CCD auxquelles une image "blanc" a été soustraite (image de l'échantillon après application du potentiel de réduction pendant 30 secondes et irradiation longue). La ROI servant à l'établissement du chronofluorogramme correspond au carré complet. En bas : chronofluorogramme correspondant à l'intensité de fluorescence moyenne mesurée au sein de la ROI (soustraction de l'image "blanc" préalablement faite) au cours du temps (points verts), points utilisés pour la modélisation de la cinétique de blanchiment (cercles verts), ajustement numérique d'une fonction monoexponentielle pour la modélisation du blanchiment (ligne rouge)

3.3. Modulation de la fluorescence des monocouches par contrôle électrochimique

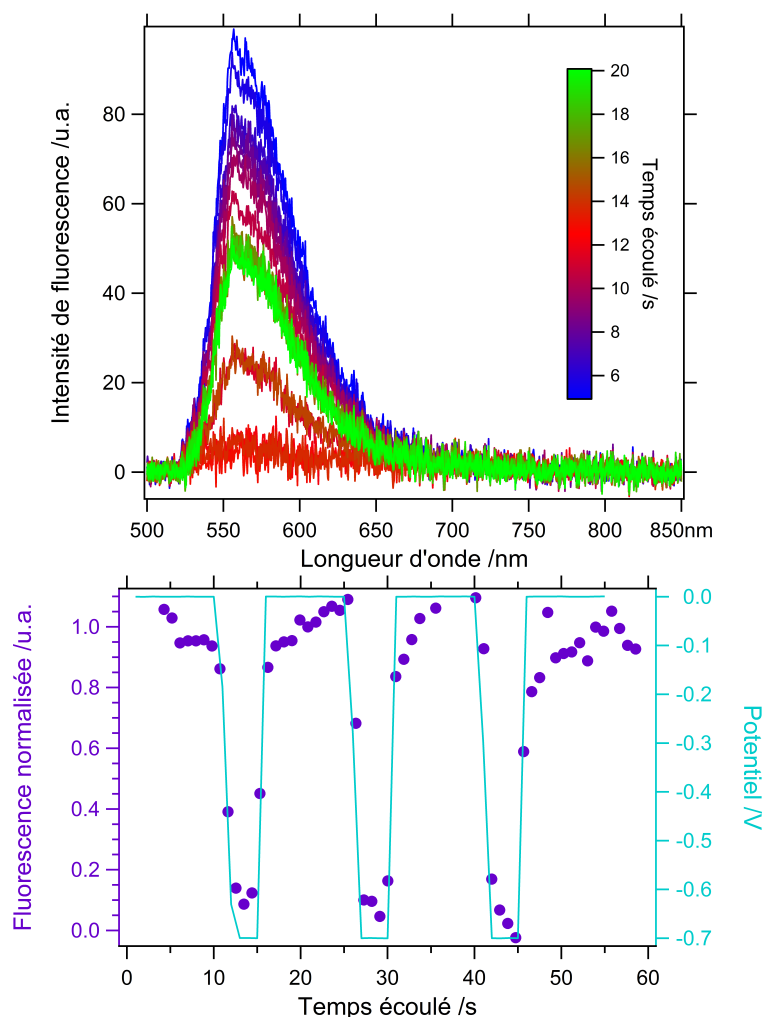


FIGURE 3.29 – Echantillon d'ITO traité avec la tétrazine en présence d'une concentration en acide acétique 100 fois plus faible. En haut : spectres bruts soustraits d'un spectre "blanc" (spectre enregistré à partir du même échantillon après une polarisation à -0,7 V pendant 30 secondes et une longue irradiation) enregistrés lorsque la séquence en potentiel ci-dessous est appliquée à l'échantillon. Les spectres affichés correspondent au premier cycle d'extinction-rallumage. En bas : séquence en potentiel appliqué à l'échantillon (ligne bleue), chrono-fluorogramme obtenu par intégration entre 530 et 615 nm des spectres ci-dessus, corrigé du blanchiment et normalisé (points violets)

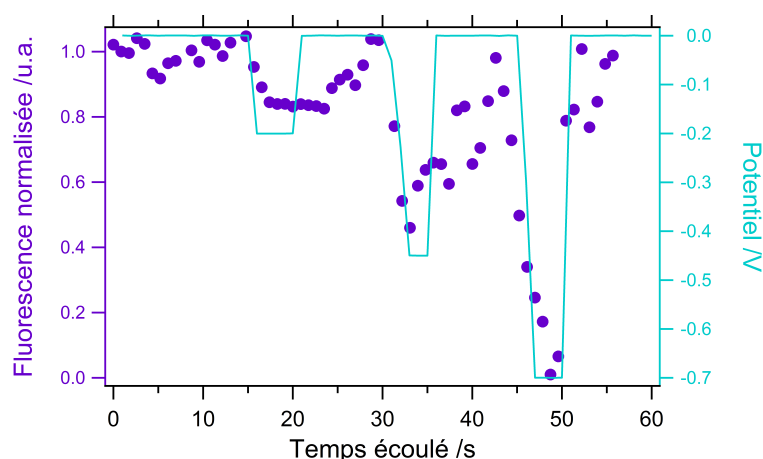


FIGURE 3.30 – Même expérience que celle reportée sur la Figure 3.25 pour un échantillon fonctionnalisé en présence d'acide à une concentration 100 fois plus faible

blanchiment (comme décrit précédemment). Contrairement à ce qui a pu être observé pour les échantillons greffés en présence d'acide acétique concentré, les deux premiers sauts de potentiel (respectivement à -0,2 V et -0,45 V) ne causent qu'une chute partielle de la fluorescence, tandis que le troisième saut (à -0,7 V) permet d'atteindre une intensité nulle. Ainsi, l'amplitude de la chute du potentiel croît lorsque la valeur du potentiel appliqué à la réduction décroît.

De plus, après chaque extinction, le retour du potentiel à 0 V permet de restaurer la fluorescence. Ainsi, l'émission de fluorescence de la monocouche est bien complètement contrôlée par le potentiel appliqué à l'électrode. Toutefois, un tel système reste limité par les problèmes de blanchiment.

3.4 Conclusions et perspectives

Dans cette partie, il a été mis en évidence qu'il était possible de greffer des monocouches de tétrazines sur des lames d'ITO. Les substrats ainsi obtenus ont été caractérisés par spectroscopie infra-rouge, par voltamétrie cyclique et par microscopie de fluorescence. Ils sont électroactifs et il est possible de détecter leur fluorescence. L'utilisation de l'échantillon comme électrode de travail dans le dispositif expérimental couplant cellule électrochimique à trois électrodes et microscope de fluorescence a ensuite permis de moduler la fluorescence de la monocouche par le contrôle électrochimique du degré d'oxydation des centres tétrazines. Cette modulation est très bien corrélée au signal en potentiel appliqué à l'électrode, corrélation vérifiée en faisant varier la durée des créneaux de potentiel ou leur valeur.

Une suite possible à ces travaux serait de déposer la monocouche sur substrat isolant pour ensuite en moduler électrochimiquement la fluorescence. Comme le substrat est non conducteur, l'idée serait d'utiliser une ultramicroélectrode pour adresser localement le degré d'oxydation de la monocouche dans le cadre d'un couplage entre microscopie électrochimique à balayage et microscopie de fluorescence. La description d'un tel couplage fait par ailleurs l'objet de la deuxième partie de ce manuscrit.

Chapitre 4

Couplage de la microscopie électrochimique à balayage à la microscopie de fluorescence : utilisation d'une unique sonde à la fois électroactive et fluorescente

4.1 Présentation des objectifs du couplage SECM - microscopie de fluorescence par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome

4.1.1 Rappel des enjeux

Dans le premier chapitre sont rapportés les quelques exemples présents dans la littérature couplant la microscopie électrochimique à balayage et la microscopie de fluorescence. Ces différents exemples sont finalement assez représentatifs des différents cas dans lesquels l'association entre électrochimie et fluorescence peut se révéler intéressante. Ainsi, le SECM peut, par exemple, être utilisé pour déclencher un phénomène localement en solution (par exemple un gradient de pH) que la fluorescence va rapporter (par l'utilisation d'un fluorophore dont l'émission est sensible au pH)[11]. Dans un cas légèrement différent, le microscope peut permettre une modification locale de l'interface solution substrat qui est imagée par le microscope de fluorescence (par exemple en contrôlant une réaction électrochimique permettant l'immobilisation locale de fluorophores à la surface du substrat)[47]. À l'inverse, le microscope électrochimique peut également être utilisé en complément du microscope de fluorescence comme sonde du phénomène étudié (par exemple pour l'étude de ROS)[85].

Il est à noter que, dans tous ces exemples, le fluorophore responsable de la détection par microscopie de fluorescence est distinct du composé électroactif par le SECM, que ce soit pour déclencher le phénomène (ce phénomène provoque une modification locale du milieu à laquelle est sensible l'émission du fluorophore) ou pour le détecter (deux sondes différentes en solution, une fluorescente et une électroactive). Or, il a été montré que dans l'étude de certains phénomènes biologiques comme l'exocytose, la détection était facilitée par l'utilisation d'une unique sonde à la fois électroactive et fluorescente.[56] De même, le caractère réversible de la réaction électrochimique peut permettre d'améliorer les résolutions spatiales et temporelles.[77]

Dans ce contexte, il paraissait intéressant de mettre à profit les connaissances préalablement acquises par le laboratoire dans le domaine des composés électrofluorochromes et son savoir-faire dans le couplage entre électrochimie et microscopie de fluorescence respectivement décrits dans les sections 1.4 et 1.6. Ainsi, le montage utilisé pour l'étude de composés électrofluorochromes à l'échelle de la couche de diffusion d'une électrode transparente macroscopique a été modifié par l'introduction d'un microscope électrochimique à balayage permettant un contrôle local (à l'échelle de la pointe SECM) de la fluorescence de la sonde redox.[19]

4.1.2 Adressage de la sonde électrofluorochrome avec la pointe SECM pour un contrôle local de la fluorescence dans trois configurations du SECM

Considérons un fluorophore dans son état oxydé, qu'il est possible de réduire réversiblement par électrochimie et dont la forme réduite n'émet pas de fluorescence. Considérons de plus une ultramicroélectrode plongeant dans une cuve contenant une solution de ce fluorophore, sous illumination continue. La fluorescence de la solution est collectée, comme précédemment, à travers un substrat transparent au fond de la cuve. L'utilisation d'une caméra, dont le champ est centré sur la pointe, permet d'imager des éventuelles inhomogénéités spatiales de la lumière émise. Dans une telle configuration et en l'absence de réaction électrochimique à la pointe, il est attendu une fluorescence homogène sur l'ensemble du champ de la caméra.

Il est ensuite possible d'appliquer à la pointe un potentiel suffisamment négatif pour réduire localement la sonde électrofluorochrome. La forme réduite n'émettant pas de fluorescence, une telle polarisation de la microélectrode doit se traduire par une extinction ou au moins une baisse de la fluorescence localisée sous la pointe. L'image attendue sur la caméra est représentée sur la Figure 4.1, à gauche dans le cas où le substrat transparent est isolant, à droite dans le cas où il est conducteur (ou semi-conducteur).

Sur substrat isolant : la configuration feedback négatif

L'utilisation d'un substrat isolant revient à la configuration "feedback" négatif précédemment décrite dans laquelle la sonde redox est non seulement électroactive mais également fluorescente et électrofluorochrome. Dans une telle configuration, l'objectif est double :

1. Il s'agit de prouver qu'il est effectivement possible de contrôler la fluorescence de la sonde par l'adressage électrochimique de son degré d'oxydation, et cela grâce à la pointe. Ceci permettrait de se passer de substrat conducteur, dans le cas où l'utilisation d'un substrat isolant serait nécessaire pour certaines applications.
2. Dans la configuration "feedback" négatif classique, le courant électrochimique mesuré à la pointe dépend de sa position : la proximité du substrat se traduit par une baisse du courant de pointe. Ce signal de sortie est donc un bon indicateur de la distance pointe-substrat. L'objectif est de vérifier si la modulation de la fluorescence est, elle aussi, dépendante de la position de la pointe. Si tel est le cas, il s'agit d'étudier l'évolution de l'amplitude de cette modulation avec la distance pointe-substrat pour comparer la sensibilité de ce signal optique à celle du courant électrochimique (distance à partir de laquelle le substrat est détecté).

Sur substrat conducteur : la configuration feedback positif

L'utilisation d'un substrat conducteur permet, quant à elle, d'étudier la configuration "feedback" positif.

En mode "feedback" positif "classique", il a été vu que le substrat régénèrait la sonde préalablement convertie par la pointe. Cette rétroaction du substrat se traduit par une forte augmentation du courant électrochimique à très courte distance pointe-substrat, car l'action de la pointe n'est pas limitée par la diffusion.

Si le médiateur redox utilisé est fluorescent et électrofluorochrome, le substrat régénère en fait l'espèce émissive à partir de celle non fluorescente formée à la pointe (lorsqu'il lui est appliqué un potentiel suffisamment négatif). La rétroaction du substrat semble donc s'opposer à l'action de la pointe.

L'objectif est donc :

- premièrement de vérifier qu'il est effectivement possible de moduler localement la fluorescence de la sonde électrofluorochrome par le contrôle du potentiel appliqué à la microélectrode si cette dernière se trouve à proximité du substrat conducteur
- d'autre part, si tel est le cas, de mesurer l'impact de la rétroaction du substrat sur l'amplitude de la modulation de fluorescence. Cet impact pourra dépendre de plusieurs paramètres, tels que la nature du conducteur ou le potentiel du substrat, qui seront par ailleurs étudiés.

Sur substrat conducteur : la configuration génération par le substrat - collecte à la pointe

Dans les configurations envisagées ci-dessus, lorsque la pointe est polarisée, il est attendu sur l'image enregistrée par la caméra une tâche sombre (état éteint) sur un fond lumineux (état allumé). Il est possible d'envisager la configuration inverse : à savoir, créer un point lumineux sur un fond sombre.

Puisque c'est la forme fluorescente de la sonde électrofluorochrome qui est présente en solution, une telle configuration implique l'utilisation d'un substrat conducteur polarisé suffisamment négativement pour former globalement la forme réduite non émissive. Cette polarisation doit permettre une extinction globale de la fluorescence (fond sombre). La pointe doit, quant à elle, être placée dans la couche de diffusion du substrat et polarisée de telle manière à régénérer l'espèce émissive (point lumineux).

Un tel mode de fonctionnement est représenté sur la Figure 4.2. Il mime en réalité la configuration génération au substrat - collecte à la pointe décrite dans le paragraphe 1.2.3, configuration dans laquelle le courant de pointe est classiquement utilisé comme un signal de détection d'une espèce formée au substrat. Dans le cas où la sonde est électrofluorochrome, la fluorescence peut être envisagée comme une deuxième forme de détection de l'espèce générée au substrat.

4.1.3 Le choix de la sonde électrofluorochrome

Les tétrazines ont déjà fait l'objet de nombreuses études au laboratoire, dont une partie des résultats ont été décrits dans la section 1.4.3. Elles présentent notamment des propriétés électrofluorochromes : il est possible de passer réversiblement d'un

4.1. Présentation des objectifs du couplage SECM - microscopie de fluorescence par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome

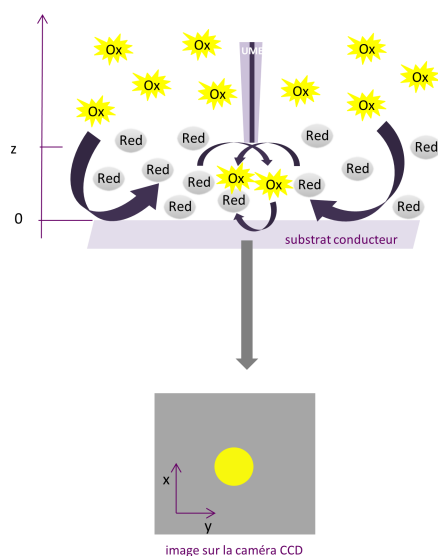


FIGURE 4.2 – Haut : schéma du couplage de la microscopie de fluorescence avec la microscopie électrochimique à balayage par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome en mode génération au substrat - collecte à la pointe. La forme oxydée de la sonde, notée "Ox", émet de la fluorescence. La forme réduite, notée "Red", n'en émet pas. bas : image "vue" par la caméra CCD lorsque celle-ci est centrée sur la pointe SECM et focalisée sur le substrat transparent conducteur.

état émettant de la fluorescence à un état éteint. En effet, la tétrazine émet de la fluorescence tandis que son radical anion n'en émet pas et la réaction électrochimique pour passer d'une espèce à l'autre est réversible.

Puisque la chlorométhoxytétrazine était connue au laboratoire, c'est cette molécule qui a été choisie pour tester le couplage entre microscopie électrochimique à balayage et microscopie de fluorescence et en établir la preuve de concept. Le schéma de la Figure 4.3 résume le principe du système tétrazine/radical anion choisi.

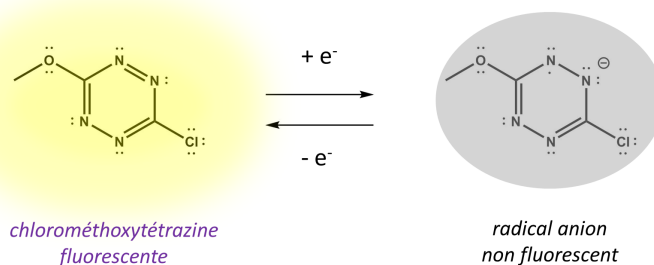


FIGURE 4.3 – Schéma de principe lors de l'utilisation de la chlorométhoxytétrazine en tant que sonde électrofluorochrome



FIGURE 4.4 – Photo du dispositif couplant microscope électrochimique à balayage avec microscope de fluorescence. Le bras mécanique permet de positionner l'UME au-dessus de la platine du microscope optique. Il est relié au dispositif piezoélectrique.

4.2 Mise en œuvre expérimentale

4.2.1 Description du montage

La Figure 4.4 montre une photographie du dispositif expérimental mis au point au laboratoire. À gauche, se trouve le microscope électrochimique et à droite, le microscope de fluorescence. La cellule électrochimique est directement posée sur la platine du microscope de fluorescence. Un bras mécanique relié au dispositif piezoélectrique du microscope électrochimique permet de positionner la pointe au-dessus de la cellule tout en gardant la possibilité de contrôler la position de la pointe dans les trois directions de l'espace.

La Figure 4.5 permet, quant à elle, de visualiser plus précisément la cellule électrochimique utilisée. Il s'agit d'une cellule entièrement démontable qui offre donc la possibilité de changer de substrat selon l'expérience réalisée. Ce dernier, toujours transparent, est posé sur un disque métallique percé en son centre (pour le passage de la lumière). La taille du disque lui permet de s'emboîter sur la plateforme du microscope de fluorescence. La cuve en tant que telle est constituée d'un cylindre de téflon creux positionné sur le substrat choisi. Par ailleurs, l'étanchéité est assurée d'une part, par un joint en téflon (en forme d'anneau) intercalé entre ces deux éléments et d'autre part, par la pression exercée par un second disque en plastique posé sur le cylindre en téflon et fixé au disque métallique par quatre vis.

La nature du substrat dépend de la configuration étudiée du SECM. Dans ce chapitre sont utilisées :

- en mode feedback négatif, une lame de verre de microscope ;
- en mode feedback positif, une lame de verre recouverte d'TTO ou une lame de verre recouverte d'TTO sur lequel a été déposé un film d'or ;
- en mode génération-collecte, une lame de verre recouverte d'TTO.

4.2. Mise en œuvre expérimentale

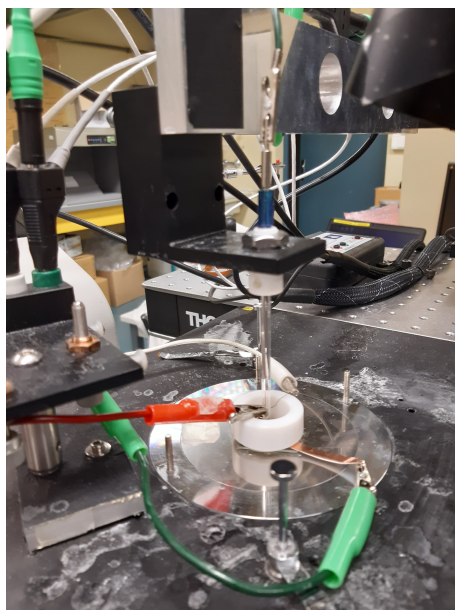


FIGURE 4.5 – Photo de la cuve. Pour plus de visibilité, les deux disques de plastique et les vis permettant d’assurer l’étanchéité ont été enlevés. On voit le disque de téflon posé sur le substrat transparent. Ensemble, ils constituent la cuve. Le substrat, dans le cas où il est conducteur, est relié au circuit par du scotch conducteur.

Au sein de la cuve, se trouve la solution électrolytique de tétrazine décrite et caractérisée plus précisément dans le paragraphe ci-dessous. Dans cette solution trempe un fil de platine (la contre-électrode), un fil d’argent recouvert de chlorure d’argent (la pseudo électrode de référence) et la pointe du microscope électrochimique (une électrode de travail). Le substrat, s’il est conducteur, est connecté en tant que seconde électrode de travail via un scotch conducteur (en cuivre) qui est d’un côté collé sur le substrat et de l’autre relié au circuit par une pince crocodile.

Le schéma complet du dispositif est représenté sur la Figure 4.6.

Le fonctionnement en mode bipotentiostat du microscope électrochimique à balayage est basé sur l’utilisation de deux potentiostats : l’un contrôle le potentiel du substrat, l’autre en mode flottant celui de la pointe. La synchronisation des signaux envoyés de part et d’autre est assurée par un ordinateur qui gère également le fonctionnement du piézopositionneur.

Quant au microscope de fluorescence, son fonctionnement est similaire à celui décrit dans le paragraphe 1.3.3. L’excitation est assurée par l’association d’une lampe blanche à mercure, d’un filtre d’excitation et d’un dichroïque. La lumière émise, après avoir traversé le substrat, l’objectif, le miroir dichroïque et le filtre d’émission est analysée soit à l’aide d’une caméra CCD, soit par un spectromètre pour une analyse en longueur d’onde. Les données collectées par ces deux appareils sont enregistrées sur un second ordinateur.

La synchronisation entre les deux ordinateurs est quant à elle manuelle. L’annexe donne plus de détails sur le matériel utilisé.

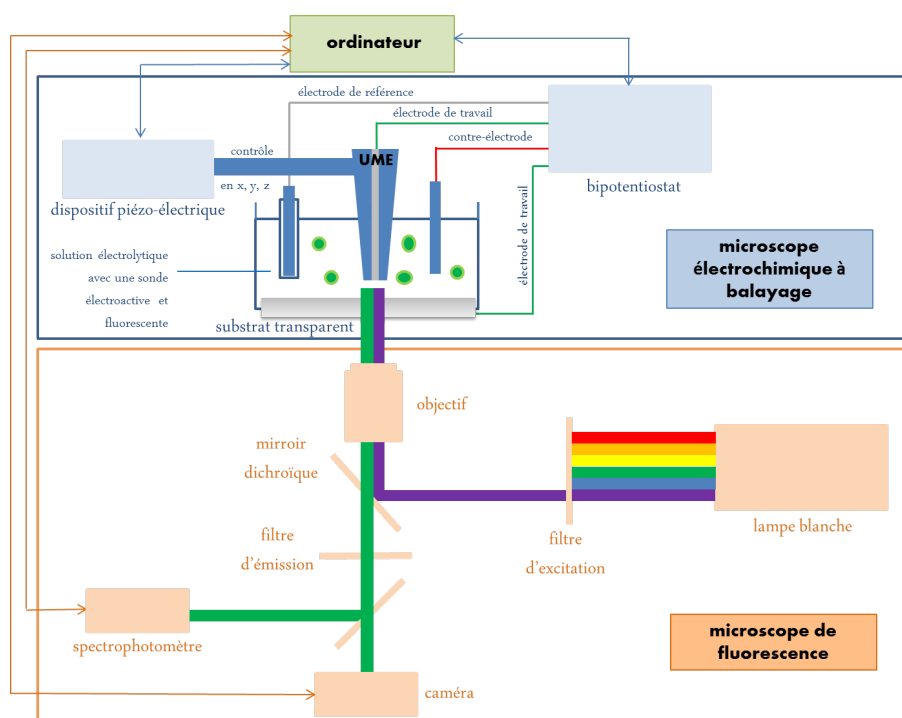


FIGURE 4.6 – Schéma du dispositif couplant un microscope électrochimique à balayage (partie du haut) et un microscope de fluorescence (partie du bas) par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome.

4.2.2 Description et caractérisation de la solution

Dans toutes les expériences décrites dans ce chapitre, la solution étudiée sous microscope est une solution de chlorométhoxytétrazine (2 mM) et de tétrabutylammonium hexafluorophosphate (0,1 M) dans l'acétonitrile. Systématiquement, elle est initialement dégazée à l'aide d'un flux d'argon pendant environ 10 minutes. Puis le flux d'argon est maintenue en surface au cours des mesures. L'objectif est de limiter la présence d'oxygène et d'eau dans la solution.

Dans la suite, la sonde est caractérisée par voltamétrie cyclique dans les conditions décrites ci-dessus.

Caractérisation électrochimique dans les conditions expérimentales

Afin de connaître les potentiels de réduction de la tétrazine dans les conditions de l'expérience, les voltamétries cycliques sont enregistrées sur trois électrodes de travail :

- la pointe SECM (une microélectrode à disque de platine de 25 μm de diamètre),
- les lames d'ITO transparentes,
- les lames d'ITO recouvertes par une couche d'or.

Les courbes ainsi obtenues sont représentées sur le graphe de la Figure 4.7.

Le couple tétrazine/radical anion se révèle être peu réversible sur l'électrode d'ITO (courbe orange de la Figure 4.7 puisque les potentiels de pic cathodique et anodique sont respectivement de - 846 mV et - 135 mV par rapport au fil Ag/AgCl.

4.2. Mise en œuvre expérimentale

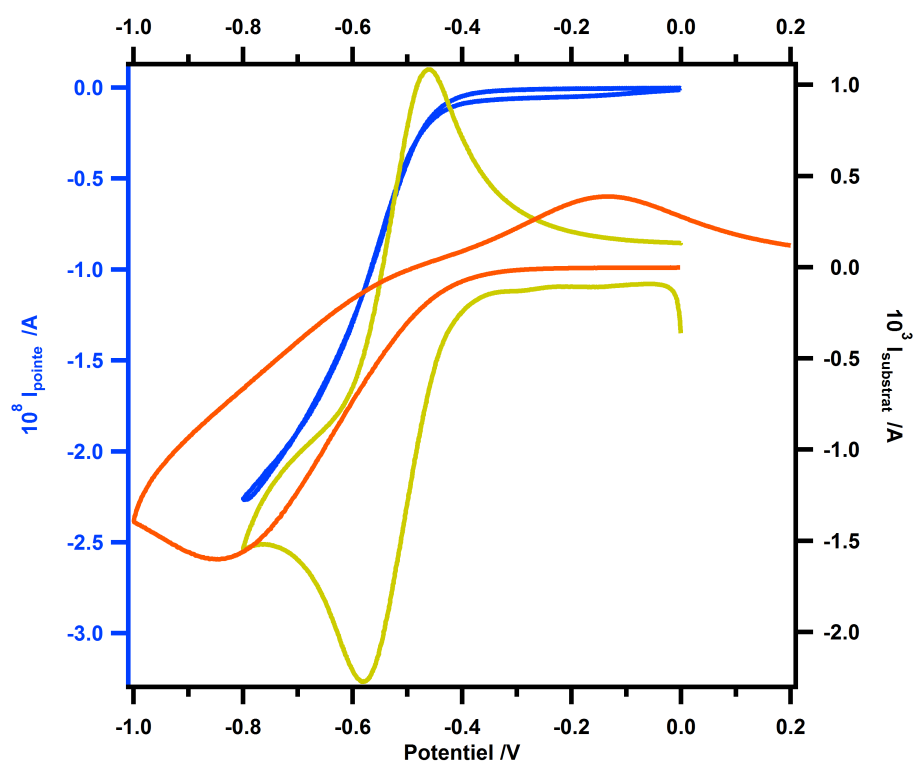


FIGURE 4.7 – Voltamétries cycliques enregistrées avec la chlorométhoxytétrazine sur la pointe (bleu), sur le substrat ITO (orange) et sur le substrat ITO recouvert avec une couche d'or de 10 nm (jaune). Vitesse de balayage : 100 mV/s.

La cinétique de transfert d'électron est par ailleurs beaucoup plus rapide lorsque l'ITO est recouvert d'une fine couche d'or puisque les deux pics d'oxydation et de réduction sont beaucoup plus rapprochés (courbe jaune de la Figure 4.7).

Caractéristiques photophysiques

Les provenances et les caractéristiques précises des produits chimiques et solvants utilisés sont données en annexe. Les caractéristiques photophysiques de la chlorométhoxytétrazine ont été décrites dans le premier chapitre.

4.2.3 Procédure d'acquisition

Dans la suite de ce chapitre, nous décrivons les trois configurations SECM (feedback négatif, feedback positif et génération au substrat - collecte à la pointe), décrites dans la section 1.2.3, dans le cadre du couplage avec la microscopie de fluorescence, avec la chlorométhoxytétrazine en guise de sonde électrofluorochrome.

Les mesures sont faites de manière systématique.

Préparation du montage

Dans un premier temps, la mise au point du microscope optique est faite sur le substrat. Puis, la pointe est placée au centre du champ de la caméra (réglage de sa position dans le plan x,y) et au contact du substrat (réglage en z). La mise au point du microscope optique est alors légèrement ajustée. On remonte ensuite la pointe de $500\ \mu\text{m}$ à l'aide du piezo-contrôleur et on enregistre une courbe d'approche. A l'issue de l'enregistrement de la courbe d'approche, la pointe revient automatiquement à sa position initiale (donc à environ $500\ \mu\text{m}$ au-dessus du substrat).

Acquisition des données

On replace la pointe presque au contact du substrat, à une position z repérée sur la courbe d'approche. Puis, on la remonte pas à pas. Dans toutes nos expériences, le pas adopté initialement était de $5\ \mu\text{m}$. Pour des distances pointe-substrat supérieures à environ $100\ \mu\text{m}$, il était augmenté à 10 puis $20\ \mu\text{m}$. A chaque distance pointe-substrat, par ailleurs repérée sur la courbe d'approche, le même signal en potentiel en fonction du temps est imposé à la pointe (de même au substrat s'il est conducteur). La caméra enregistre en parallèle l'évolution de l'intensité de fluorescence.

Traitement des données

L'ensemble des enregistrements de la caméra permettent de tracer un chrono-fluorogramme pour chacune des positions de la pointe étudiées. Pour cela, une ROI (région d'intérêt) a été définie autour de la pointe (carré rouge de la Figure 4.8). Un chrono-fluorogramme correspond à l'évolution au cours du temps de l'intensité moyenne de fluorescence enregistrée dans cette zone sous l'effet du signal en potentiel appliqué à la microélectrode (éventuellement au substrat).

4.3. Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback négatif

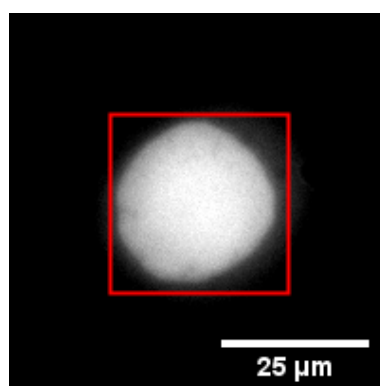


FIGURE 4.8 – Image en réflexion de la pointe. Le carré rouge délimite la région d'intérêt (ROI) au sein de laquelle est collectée l'intensité de fluorescence moyenne pour l'établissement des chronofluorogrammes

4.3 Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback négatif

4.3.1 Influence du potentiel de la pointe SECM

En mode "feedback" négatif, le substrat est isolant. Seule la polarisation de la pointe peut permettre d'envisager une modulation de l'intensité de fluorescence de la sonde électrofluorochrome. Ainsi, si la pointe est polarisée suffisamment négativement pour réduire la tétrazine en radical anion (environ $-0,7$ V par rapport à $\text{Ag} | \text{AgCl}$ selon la voltamétrie cyclique de la Figure 4.7), il est attendu une chute locale de l'intensité de fluorescence dans la demi-sphère de diffusion de la microélectrode. Un retour à un potentiel de 0 V (potentiel suffisamment haut selon la voltamétrie cyclique pour oxyder le radical anion en tétrazine) doit, quant à lui, permettre de restaurer la fluorescence initiale.

La procédure d'acquisition décrite dans le paragraphe 4.2.3 est mise en œuvre (réglage optique, positionnement de la pointe, courbe d'approche, etc.). Puis la pointe est placée dans un premier temps à $10 \mu\text{m}$ du substrat. Enfin, une séquence en potentiel est appliquée à la pointe par le potentiostat. Ainsi, la pointe est laissée à son potentiel de circuit ouvert pendant 10 secondes. Puis, elle est portée successivement à un potentiel de 0 V pendant 10 s, à un potentiel de $-0,7$ V pendant 20 secondes et retourne enfin à un potentiel de 0 V pendant 20 secondes. Cette séquence en potentiel correspond donc théoriquement à un cycle d'extinction-rallumage.

Sur la Figure 4.9 est reportée une sélection d'images de fluorescence enregistrées par la caméra CCD parallèlement à l'action du potentiostat. L'ensemble de ces images sont représentées pour un même réglage du contraste et de la luminosité. Lors de la prise de la première image, la pointe est polarisée à 0 V, il n'y a donc pas de réaction électrochimique possible. La caméra enregistre la fluorescence de la tétrazine. Le disque de platine de la microélectrode est bien visible au centre de l'image car il apparaît plus brillant. Cette brillance particulière peut probablement être attribuée à la réflexion de la lumière émise plus importante sur le métal que sur le plastique de la gaine.

Lors de la chute de potentiel imposée à la pointe (de 0 V à $-0,7$ V par rapport à

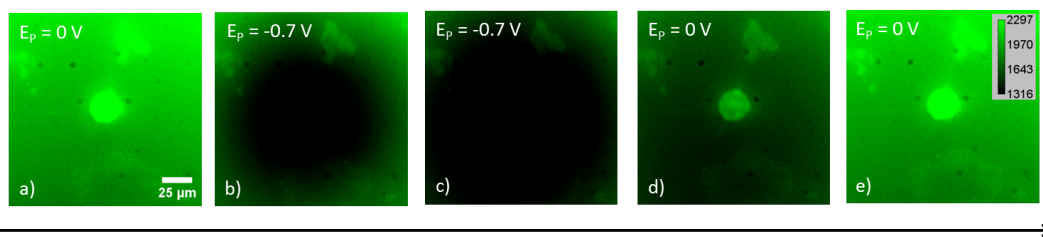


FIGURE 4.9 – Sélection d'une série d'images de la pointe enregistrées avec la caméra CCD aux temps (a) $t = 18$ s, (b) 25 s, (c) 35 s, (d) 45 s et (e) 58 s lorsque son potentiel varie selon la séquence en potentiel suivante : PCO (10 s), 0 V (10 s), -0,7 V (20 s), 0 V (20 s). Position de la pointe : 10 μm .

Ag | AgCl) pour réduire la tétrazine en radical anion, la caméra enregistre comme attendu une chute de l'intensité de fluorescence au niveau de la microélectrode (comparaison des images a et c). Cette chute est progressive (comparaison des images b et c). Le retour à un potentiel de 0 V afin de réoxyder le radical anion s'accompagne effectivement d'une réaugmentation de la fluorescence à partir du microdisque de platine (images d et e).

Il apparaît donc possible d'utiliser le potentiel de la microélectrode pour moduler l'intensité de fluorescence localement et de façon réversible. Dans la suite, on s'intéresse à l'amplitude de cette modulation et à la dépendance de celle-ci avec la distance pointe-substrat, autre paramètre contrôlable dans la configuration feedback négatif. Pour cela, la même expérience est reproduite pour plusieurs positions de la pointe (voir le paragraphe 4.2.3 sur la procédure d'acquisition).

4.3.2 Influence de la distance pointe-substrat

La même expérience est répétée pour plusieurs positions de la pointe. Pour chaque distance pointe-substrat étudiée, nous avons extrait un chronofluorogramme correspondant à l'évolution au cours du temps de l'intensité de fluorescence moyenne au sein de la région d'intérêt délimitée par le carré rouge (Figure 4.8).

À titre d'exemples, quelques uns de ces chronofluorogrammes ont été sélectionnés et reportés sur la partie centrale de la Figure 4.10 (en B). Leur couleur est indicatrice de la position à laquelle se trouvait la microélectrode lors de leur enregistrement. Cette position est par ailleurs représentée par un point de la même couleur sur la courbe d'approche (en haut A, courbe bleue de la Figure 4.10). Il apparaît qu'à une distance pointe-substrat donnée, l'intensité de fluorescence reste constante lors des vingt premières secondes de l'enregistrement : elle n'est pas impactée par la polarisation à 0 V par rapport à Ag | AgCl de la pointe auparavant à son potentiel de circuit ouvert (PCO). Toutefois, la valeur de cette intensité augmente avec la distance pointe-substrat. Ceci peut s'expliquer par le fait que, même si la mise au point est faite à l'interface substrat/solution, le microscope étant en configuration champ large, la profondeur de champ est grande et, aux distances de travail considérées, le corps de la pointe se trouve dans cette profondeur de champ. Plus la pointe est proche du substrat, plus le volume sondé est petit. Afin d'étudier plus précisément l'impact de la profondeur de champ sur la relation entre l'intensité de fluorescence moyenne au sein de la ROI et la distance pointe-substrat, une courbe de calibration

4.3. Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback négatif

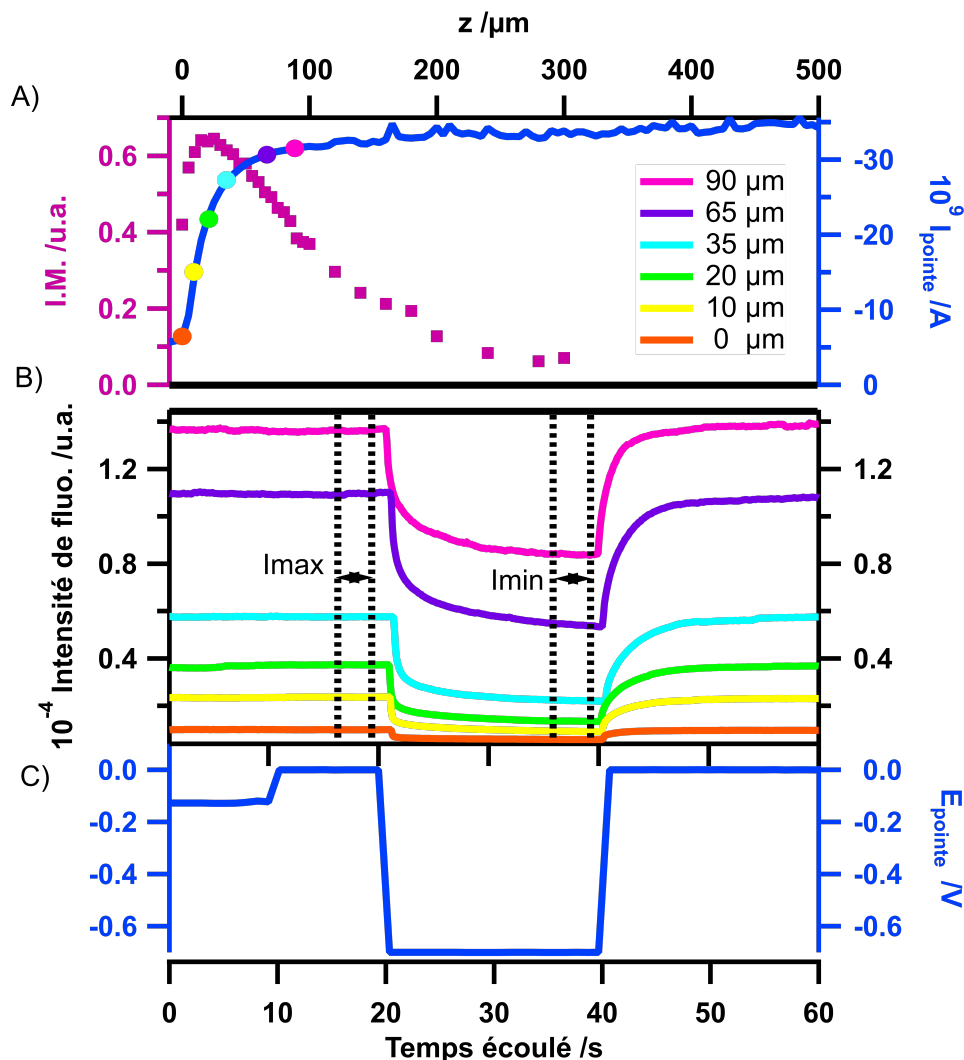


FIGURE 4.10 – Modulation de l'intensité de fluorescence par variation du potentiel de la pointe et de la distance pointe-substrat en mode feedback négatif (substrat : lame de verre). A) Courant enregistré à la pointe (bleu, échelle de droite) et taux de modulation normalisé de l'intensité de fluorescence $(I_{\text{max}} - I_{\text{min}}) / I_{\text{max}}$ (rose, échelle de gauche) en fonction de la position de la pointe. B) Intensité de fluorescence en fonction du temps (chronofluorogrammes) pour différentes positions de la pointe par rapport au substrat : les couleurs font référence aux positions de la pointe indiquées en A). C) Potentiel appliqué à la pointe en fonction du temps pour chaque distance pointe-substrat : circuit ouvert (10 s) - 0 V (10 s) - -0,7 V (20 s) - 0 V (20 s).

a par ailleurs été reportée sur la Figure 4.11. Ainsi, la relation entre ces deux grandeurs apparaît comme linéaire sur l'ensemble de la gamme des distances de travail étudiées.

L'étude des chronofluorogrammes sur le milieu de la Figure 4.10 montre que, lorsque le potentiel de la pointe est porté à - 0,7 V, l'intensité de fluorescence chute brusquement au sein de la ROI pour atteindre rapidement un palier. Cette chute, visiblement corrélée au signal électrochimique, est cohérente avec la conversion de la tétrazine fluorescente en son radical anion non fluorescent sous l'effet de la polarisation de la microélectrode. Finalement, l'intensité de fluorescence initiale est totalement retrouvée lorsque le potentiel de la pointe est ramené à 0 V et cela, pour toutes les positions de la pointe : le phénomène étudié semble réversible, comme espéré avec la voltamétrie cyclique.

De plus, si une baisse de l'intensité de fluorescence est effectivement mesurée quelle que soit la distance pointe-substrat, il apparaît clairement que son amplitude n'est pas constante. A partir des chronofluorogrammes, on cherche donc à évaluer la capacité de la pointe à "éteindre" localement la fluorescence de la tétrazine, et cela en fonction de sa hauteur par rapport au substrat. Pour toutes les positions de la pointe étudiées z , un taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisé est calculé de la façon suivante :

$$\gamma_{modulation}(z) = \frac{I_{max}(z) - I_{min}(z)}{I_{max}(z)} \quad (4.1)$$

avec $I_{max}(z)$ et $I_{min}(z)$ les intensités moyennes de fluorescence calculées respectivement sur les plages de 17 à 19 secondes (en l'absence de réaction électrochimique), et de 37 à 39 secondes (lors de la réduction de la tétrazine en radical anion) du chronofluorogramme correspondant à la position z sur la courbe d'approche. La normalisation du taux de modulation par I_{max} permet de s'affranchir de la variation du volume sondé avec la distance pointe-substrat. Le résultat des amplitudes de modulation de l'intensité de fluorescence normalisée ainsi calculées en fonction de la distance pointe-substrat est superposé à la courbe d'approche pour comparaison en haut de la Figure 4.10.

L'analyse de cette courbe montre qu'à grande distance du substrat, le taux de modulation décroît pour tendre vers zéro. Or, sur la courbe de calibration (voir Figure 4.11), la linéarité de l'intensité de fluorescence avec la position de la pointe est visible sur l'ensemble des distances de travail considérées ici. Donc la pointe est toujours dans la profondeur de champ du microscope et cette dernière ne peut donc pas expliquer la décroissance à grande distance. En revanche, la différence $I_{max}-I_{min}$ tend nécessairement rapidement vers une constante (fixée par le rayon d'action de la pointe qui n'est plus en interaction avec le substrat pour z grand) tandis qu' I_{max} augmente toujours. C'est donc la normalisation seule par I_{max} qui explique cette décroissance.

Quand la pointe s'approche du substrat, le taux de modulation augmente. Le signal optique, de la même façon que le courant électrochimique, est donc sensible à la présence du substrat : la courbe de modulation ainsi représentée peut s'apparenter à une courbe d'approche basée sur un signal optique. Il est à noter que le signal optique est de ce point de vu plus sensible que la courbe d'approche électrochimique (courant de pointe) puisque le taux de modulation commence à varier environ 200 μm au-dessus du substrat alors que l'incursion de la courbe de courant n'a lieu qu'à environ 60 μm . L'analyse des courants de pointe de la Figure 4.12, enregistrés parallèlement aux chronofluorogrammes, confirme cette moindre sensibilité puisque

4.3. Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback négatif

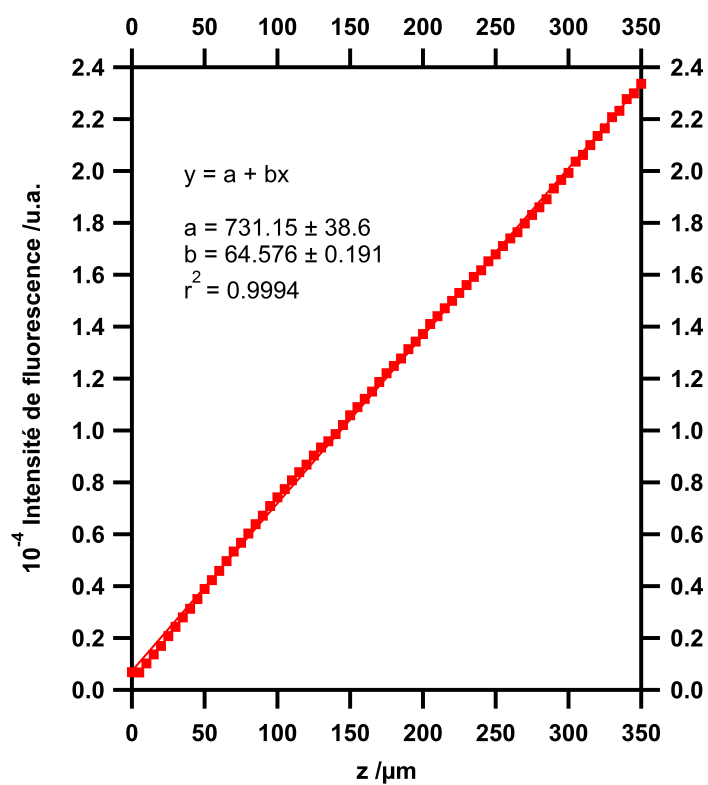


FIGURE 4.11 – Représentation graphique de l'intensité de fluorescence, émise par la solution de tétrazine et collectée dans la région d'intérêt, en fonction de la position de la pointe, superposée à sa régression linéaire.

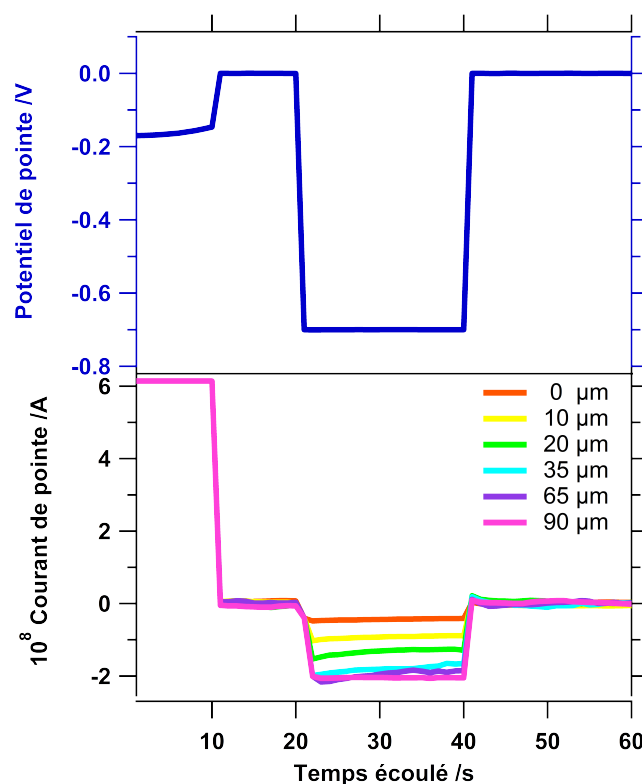


FIGURE 4.12 – A) Séquence de potentiel appliquée à la pointe B) Courant de pointe mesurés pour plusieurs distances pointe-substrat.

l'amplitude du créneau du courant en réduction est constante pour des distances pointe-substrat supérieures à 60 μm . À ce stade, il est difficile de savoir si la différence de sensibilité entre le courant électrochimique et l'intensité de fluorescence est simplement due à la façon de calculer le taux de modulation et s'il s'agit d'un artefact de la normalisation. Pour essayer de comprendre les phénomènes mis en jeu, une modélisation de l'expérience réalisée avec le logiciel Comsol Multiphysics est proposée dans le paragraphe 4.6.

L'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence normalisée augmente lorsque la distance pointe-substrat diminue. Elle finit par atteindre un maximum puis décroît à très courte distance de la même façon que le courant électrochimique. A priori, cette décroissance peut être le signe d'une réaction électrochimique moins efficace, en accord avec le mode "feedback" négatif. Elle devrait donc également pouvoir être modélisée.

Il est à noter que l'acquisition des chronofluorogrammes est faite, pour cette étude, sur de grandes échelles de temps (60 s). Toutefois, étant donné les cinétiques rapides du phénomène observé, il serait envisageable de raccourcir les temps d'enregistrement pour acquérir ces courbes d'approche optiques sur une échelle de temps raisonnable (de l'ordre de 4 ou 5 secondes par point) en vu d'éventuelles applications pratiques.

Dans la suite, on cherche à s'assurer que la modulation observée est bien celle due à la fluorescence de la tétrazine.

4.3. Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback négatif

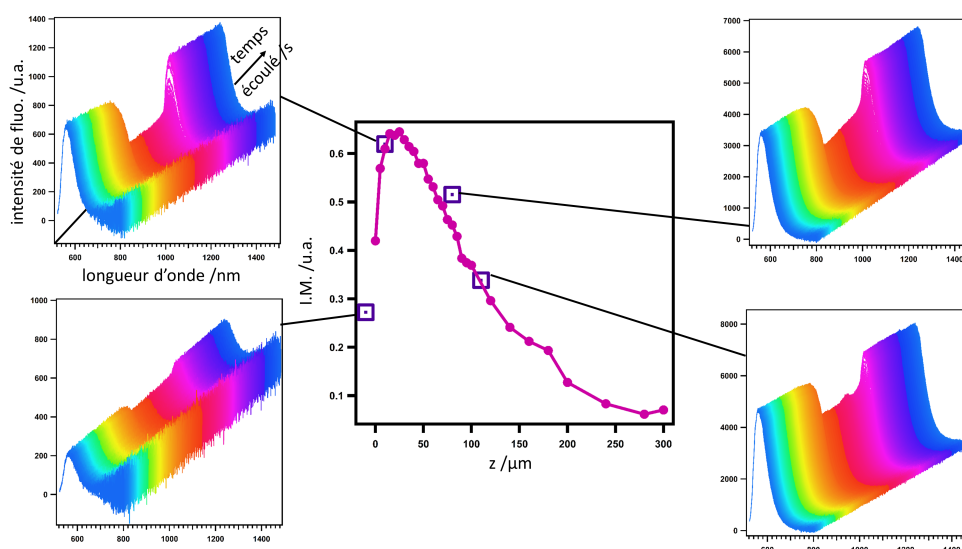


FIGURE 4.13 – Evolution du spectre d'émission au cours du temps pour différentes hauteurs de la pointe par rapport au substrat de verre. Le potentiel de la pointe varie selon la séquence suivante : circuit ouvert (10 s); 0 V (10 s); -0,7 V (20 s); 0 V (20 s). Les points roses sont le taux de modulation normalisé de l'intensité de fluorescence en fonction de la position de la pointe de la Figure 4.10.

4.3.3 Caractérisation spectrale de la modulation : effet du potentiel de pointe et de la distance pointe-substrat

L'utilisation de la caméra CCD a permis de montrer qu'il était possible d'enregistrer une modulation, localisée au niveau de la pointe SECM, de l'intensité de fluorescence d'une solution de chlorométhoxytétrazine. De plus, cette modulation semble cohérente avec la séquence en potentiel appliquée à la microélectrode choisie de façon à pouvoir réduire la tétrazine en radical anion, puis à la réoxyder. Afin de prouver que la modulation observée est bien la signature de la sonde électrofluorochrome, la même expérience est reproduite pour quelques distances pointe-substrat selon le protocole décrit dans le paragraphe 4.2.3 en enregistrant la réponse optique du système non plus avec la caméra mais avec le spectromètre. À la différence de la caméra, la région d'intérêt dans laquelle la fluorescence est collectée est de taille fixe (carré d'environ $60 \mu\text{m}$ de côté au centre du champ de la caméra). La séquence en potentiel appliquée à la pointe à chacune de ses positions est la même que précédemment avec la caméra : potentiel de circuit ouvert (10 s); 0 V (10 s); -0,7 V (20 s); 0 V (20 s).

Le spectromètre permet d'enregistrer des cinétiques de spectre d'émission : il est possible de suivre l'évolution au cours du temps de l'intensité de fluorescence à chaque longueur d'onde sous l'effet du signal électrochimique.

Sur la Figure 4.13 sont reportées quatre cinétiques de spectres enregistrées pour quatre positions de la pointe. Les spectres ainsi représentés sont corrigés de la sensibilité de la chaîne instrumentale (selon la longueur d'onde). Sur chacune de ces cinétiques, le spectre initial présente un maximum vers 560 nm, signature de la chlorométhoxytétrazine. L'intensité au maximum augmente lorsque la pointe s'éloigne du substrat, de la même façon que l'intensité moyenne au sein de la ROI de la caméra.

Sur une cinétique donnée, le spectre d'émission reste d'intensité constante lors du passage de la pointe de son potentiel de circuit ouvert à un potentiel de 0 V par rapport à $\text{Ag} | \text{AgCl}$. Puis l'intensité du maximum décroît brusquement lors du passage de 0 V à -0,7 V pour atteindre rapidement un palier. Le retour à 0 V est corrélée à une réaugmentation tout aussi rapide de l'intensité du maximum jusqu'à sa valeur initiale. Durant toute la cinétique, la forme du spectre n'est pas modifiée. Seule l'intensité du maximum varie. Ce comportement est la signature d'une modulation de la fluorescence par conversion d'une espèce émettrice de fluorescence en une espèce non émettrice (électrofluorochromisme de type 1).

Pour chaque position de la pointe, l'intégrale des spectres en fonction du temps permet d'obtenir de nouveaux chronofluorogrammes. À partir des chronofluorogrammes, il est possible de calculer les amplitudes de la modulation de l'intensité de fluorescence normalisées associées. Ces taux de modulation ont été superposés à ceux obtenus avec la caméra au centre de la Figure 4.13. Les deux modes de calcul semblent donner des résultats cohérents.

4.3.4 Conclusion partielle

Il a été montré qu'il est possible de moduler la fluorescence d'une sonde électrofluorochrome sur substrat isolant grâce à la pointe SECM. Cette modulation est de ce fait localisée au niveau de la microélectrode et l'amplitude de la modulation enregistrée dépend de la distance pointe-substrat. En conséquence, des courbes d'approche basées sur un signal optique peuvent être enregistrées grâce au couplage SECM - microscopie de fluorescence. Ces courbes semblent plus sensibles que celles issues des courants électrochimiques dans la mesure où elles détectent la présence du substrat à des distances plus grandes.

Dans la suite, le substrat isolant est remplacé par un substrat d'ITO, semi-conducteur transparent. L'objectif est d'étudier, dans la configuration feedback positif, le comportement des courbes d'approche "optique". En effet, dans la partie introductive de ce chapitre, il a été mentionné que la rétroaction classique du mode feedback positif, responsable de la sensibilité du courant électrochimique de pointe à la nature du substrat, doit conduire ici à la régénération de l'espèce émissive. Une telle opposition du substrat à l'extinction locale devrait donc logiquement rendre les courbes "optiques" également sensibles à la nature du substrat ainsi qu'à son potentiel.

4.4 Modulation de l'intensité de fluorescence en mode "feedback" positif

Dans la configuration "feedback" négatif, seuls le potentiel de la pointe et la distance pointe-substrat pouvaient varier. On dispose désormais d'un paramètre de contrôle supplémentaire : le potentiel du substrat.

Les expériences sont menées selon le même procédé que décrit précédemment pour le substrat isolant : mise au point du microscope optique, positionnement de la pointe, courbe d'approche électrochimique, séquences en potentiel appliquées à la pointe et au substrat pour différentes distances pointe-substrat repérées sur la courbe d'approche.

Discussion sur la nécessité d'appliquer un potentiel à l'ITO pour observer la rétroaction du substrat. [75]

4.4. Modulation de l'intensité de fluorescence en mode "feedback" positif

- À la pointe, la séquence de potentiel est identique à celle utilisée en "feedback" négatif : circuit ouvert pendant 10 secondes, 0 V pendant 10 secondes, - 0,7 V pendant 20 secondes puis 0 V pendant 20 secondes. Elle correspond toujours à un cycle d'extinction/rallumage local de la fluorescence.
- Au substrat, le potentiostat laisse le circuit ouvert pendant 5 secondes puis applique un potentiel fixe pendant 55 secondes.

Parallèlement au signal électrochimique, la caméra enregistre l'évolution de l'intensité de fluorescence à proximité de la pointe. Un chronofluorogramme correspondant à l'intensité moyenne au sein de la région d'intérêt (Figure 4.8) en fonction du temps est donc obtenu pour chaque distance pointe-substrat.

Cette même expérience peut finalement être répétée pour plusieurs potentiels du substrat, les résultats obtenus aux différents potentiels pouvant être comparés.

Dans un premier temps, le potentiel du substrat est fixé à -0,235 V par rapport à Ag | AgCl. Selon la voltamétrie cyclique enregistrée sur ITO et présentée sur la Figure 4.7, ce potentiel doit permettre de bloquer la rétroaction du substrat. Il s'agit tout d'abord de reproduire les résultats obtenus sur substrat isolant.

4.4.1 Influence de la distance pointe-substrat

Les chronofluorogrammes obtenus selon le protocole décrit ci-dessus lorsque l'ITO est polarisé à -0,235 V sont reportés en B) de la Figure 4.14. Leur couleur est indicatrice de la position de la pointe à laquelle ils ont été enregistrés : cette position est repérée sur la courbe d'approche électrochimique (courbe bleue en A) de la même figure) par un point de la même couleur. A titre d'information, les signaux en potentiel effectivement appliqués parallèlement à l'enregistrement des chronofluorogrammes sont reportés en C).

De la même façon que sur substrat isolant, il apparaît que l'intensité de fluorescence initiale augmente avec la distance pointe substrat, du fait de la présence de la pointe dans la profondeur de champ du microscope. Par contre, à une position donnée de la pointe, elle est stable en l'absence de réaction électrochimique : comme attendu, les polarisations successives du substrat et de la pointe respectivement à -0,235 V et à 0 V ne modifient pas sa valeur moyenne. Le passage du potentiel de pointe de 0 V à -0,7 V est quant à lui corrélé à une chute de l'intensité de fluorescence, et cela pour toutes les distances pointe-substrat étudiées. Le retour du potentiel à 0 V est, de la même façon, accompagnée d'une réaugmentation rapide de la fluorescence jusqu'à sa valeur initiale. Il semble donc possible, de la même façon que sur substrat isolant, de moduler l'intensité de fluorescence avec la pointe sur substrat conducteur.

Toutefois, si l'intensité de fluorescence est effectivement modulée sur tous les chronofluorogrammes, il apparaît clairement que l'amplitude de cette modulation dépend de la distance pointe-substrat, comme cela était observé sur substrat isolant. Pour mettre en évidence cette dépendance, l'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence normalisée est évaluée de la même façon qu'en mode feedback négatif pour chaque chronofluorogramme. Elle est finalement représentée en fonction de la position de la pointe superposée à la courbe d'approche électrochimique en A) de la Figure 4.14.

L'allure de la courbe ainsi obtenue est assez similaire à celle sur substrat isolant. En effet, la modulation est très faible à grande distance puis augmente petit à petit lorsque la pointe se rapproche du substrat. Dans la région des très courtes distances, lorsque le courant électrochimique commence à augmenter de façon significative,

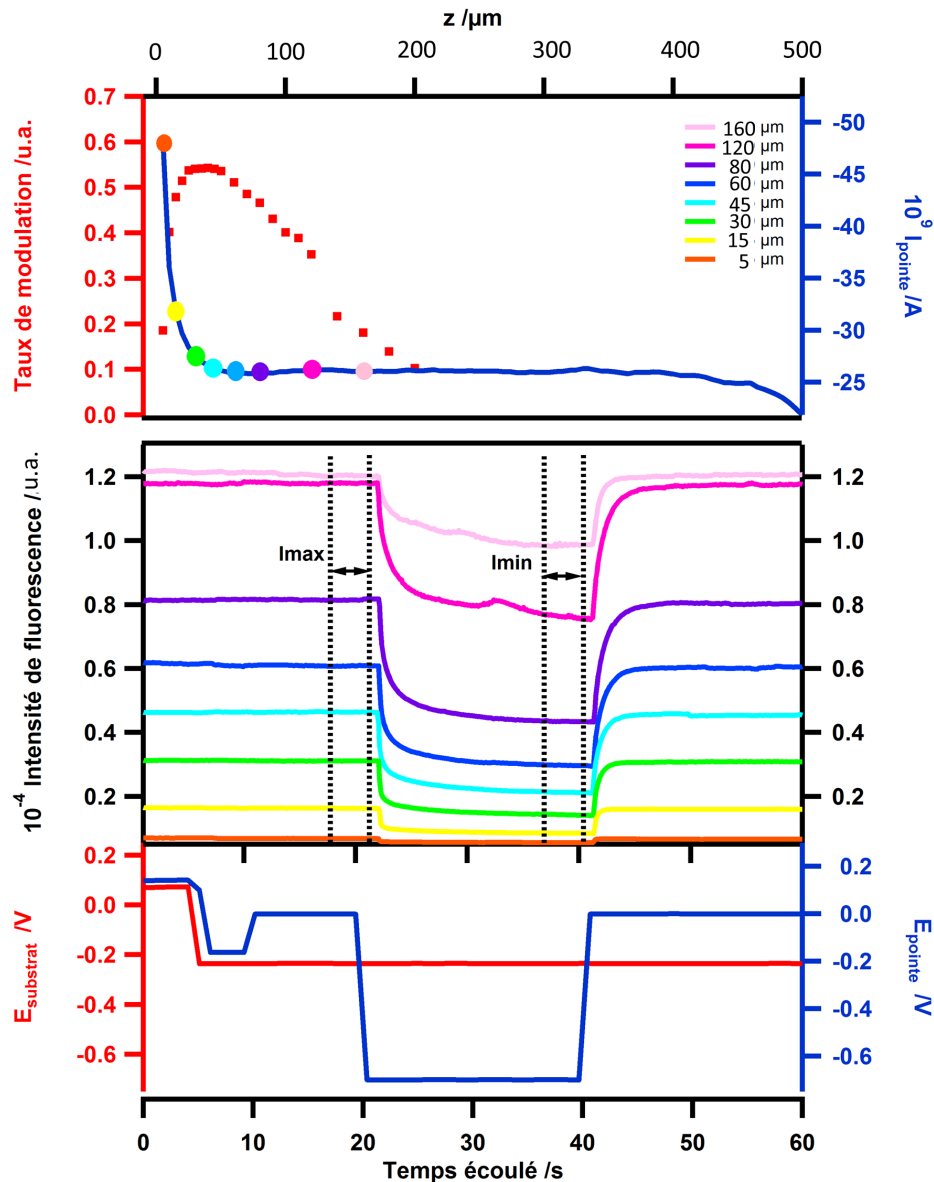


FIGURE 4.14 – Modulation de l'intensité de fluorescence en fonction du potentiel de la pointe et de la distance pointe-substrat dans le mode feedback positif (substrat : ITO). A) Courant enregistré à la pointe (bleu, échelle de droite) et taux de modulation normalisé de l'intensité de fluorescence (rose, échelle de gauche) en fonction de la distance. B) Intensité de fluorescence en fonction de la position de la pointe : les couleurs font référence aux valeurs indiquées en A). C) Potentiels en fonction du temps appliqués à la pointe (bleu) et au substrat (rouge) pour chaque distance pointe-substrat.

4.4. Modulation de l'intensité de fluorescence en mode "feedback" positif

L'amplitude de la modulation normalisée atteint un maximum puis chute. Dans cette configuration également, il peut être signalé que l'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence est plus sensible à la distance pointe-substrat que ne l'est le courant électrochimique. La chute du taux de modulation à très courte distance peut probablement être expliquée par la pollution des mesures par une lumière provenant de l'extérieur de la région d'intérêt. Celle-ci devient problématique à courte distance. En réalité, nous mesurons :

$$\gamma_{modulation} = \frac{(I_{max} + i) - (I_{min} + i)}{I_{max} + i} \quad (4.2)$$

avec i l'intensité de fluorescence parasite.

À l'avenir, il faudrait évaluer l'intensité i qui est égale à la limite de I_{min} lorsque la distance pointe-substrat tend vers 0 et le soustraire systématiquement aux intensités mesurées.

Ainsi, cette première expérience montre qu'il est possible d'utiliser la pointe SECM pour moduler localement l'intensité de fluorescence avec un substrat conducteur transparent et que la dépendance de l'amplitude de cette modulation avec la distance pointe-substrat peut permettre l'acquisition de courbes d'approche à partir d'un signal optique. Afin d'étudier l'influence de la nature et du potentiel du substrat sur l'allure de la courbe d'approche optique, cette même expérience est finalement reproduite plusieurs fois :

- avec un même substrat (l'ITO) mais polarisé à différents potentiels ;
- avec un autre type de substrat : une lame de verre recouverte d'ITO recouverte d'une couche d'or.

Les résultats de ces expériences sont rapportés et exploités dans le paragraphe suivant.

4.4.2 Influence de la nature et du potentiel du substrat

Lors de l'expérience précédente, le potentiel appliqué à l'ITO était de -0,235 V par rapport à $\text{Ag} | \text{AgCl}$. Sur la voltamétrie cyclique de la Figure 4.7, ce potentiel se situe avant le pic d'oxydation retour correspondant à la régénération de la chlorométhoxytétrazine à partir de son radical anion. Ainsi, une telle polarisation de l'ITO ne permet pas (ou très peu) la rétroaction de la part du substrat : le taux de modulation de l'intensité de fluorescence est attendu comparable à celui obtenu sur substrat isolant. Si par contre, le potentiel du substrat est tel qu'il régénère la tétrazine fluorescente à partir du radical anion non émetteur préalablement formé à la pointe, le maximum de la courbe représentant l'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat doit sensiblement diminuer.

Ainsi, l'expérience précédente est reproduite avec l'ITO en tant que substrat conducteur à deux reprises :

- Dans la première expérience, l'ITO est laissé à son potentiel de circuit ouvert. Avec la chlorométhoxytétrazine, la rétroaction à l'ITO n'est pas suffisante dans cette configuration pour observer un feedback positif.
- Dans une seconde expérience, l'ITO est polarisé à 1 V. Une telle polarisation permet, quant à elle, d'observer la forte augmentation du courant, caractéristique du feedback positif, lorsque la pointe se rapproche suffisamment du substrat.

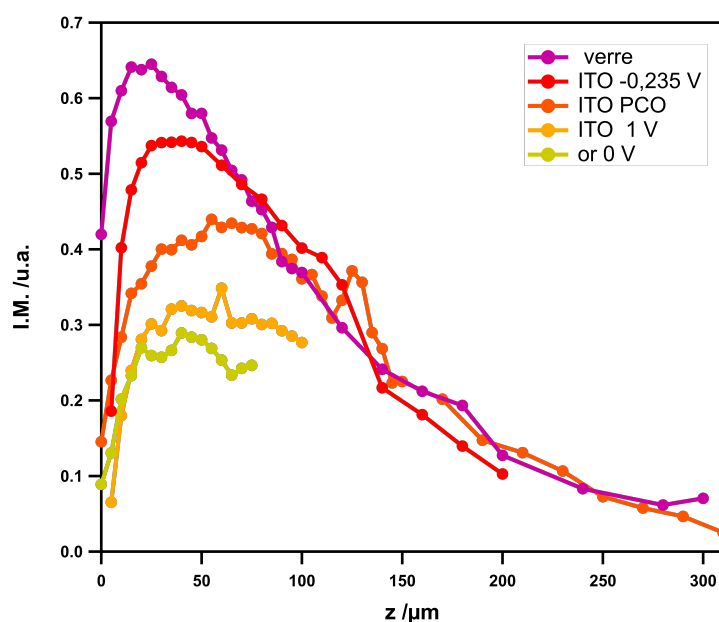


FIGURE 4.15 – Variation du taux de modulation normalisé de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat pour différents potentiels appliqués au substrat ITO. Pour toutes les courbes, le taux de modulation a été calculé pour un saut de potentiel à la pointe de 0 à -0.7 V. Pour comparaison, on a superposé la même courbe obtenue avec le substrat isolant (lame de verre) ainsi que celle obtenue quand l'ITO est recouvert d'une couche d'or d'une dizaine de nanomètres.

Le signal en potentiel appliqué à la pointe demeure quant à lui inchangé.

Sur la Figure 4.15 sont reportées les amplitudes de modulation de l'intensité de fluorescence normalisées en fonction de la distance pointe-substrat obtenues pour les deux expériences ITO PCO et ITO 1 V. Pour comparaison, les deux courbes obtenues précédemment sur substrat isolant et sur ITO polarisé à -0,235 V leur ont été superposées.

L'allure générale des quatre courbes est plutôt semblable : le taux de modulation augmente lorsque la pointe se rapproche du substrat jusqu'à atteindre un maximum, puis il chute à très courte distance. Comme attendu, il apparaît néanmoins que plus la réaction de régénération au substrat est efficace (lorsque le potentiel de l'ITO passe de -0,235 V à sa valeur en circuit ouvert et atteint finalement à 1 V) plus le maximum du taux de modulation est faible (I_{min} est plus élevée s'il y a régénération). Changer le matériau de l'électrode et remplacer l'ITO nu par de l'ITO recouvert d'une fine couche d'or semble confirmer cette tendance : le maximum de l'amplitude de modulation normalisée est plus faible sur or lorsqu'il est polarisé à 0 V que sur ITO, même lorsque le potentiel de celui-ci est porté à 1 V.

Il est à noter que quels que soient le substrat et son potentiel, toutes les courbes se superposent à grande distance du substrat. La modulation de fluorescence n'est donc logiquement pas sensible à la nature du substrat dans cette région.

4.5 Le mode génération-collecte

Dans ce mode, le substrat peut être utilisé pour générer électrochimiquement une espèce que la pointe va détecter et collecter. En pratique, pendant que le substrat est polarisé à un potentiel fixe pendant un certain temps (potentiel choisi de façon à générer une espèce), la pointe est positionnée à une distance donnée du substrat et une rampe de potentiel (voltamétrie cyclique) ou un saut de potentiel (chronoampérométrie) lui est imposée par le potentiostat. Le courant électrochimique mesuré à la pointe constitue le signal de détection.

Dans le cas de l'utilisation d'une sonde redox fluorescente et électrofluorochrome, la polarisation du substrat doit conduire à la formation de l'espèce non-émissive et donc à une extinction globale de la fluorescence. La pointe, si elle est située dans la couche de diffusion du substrat doit pouvoir, si le potentiel adéquat lui est appliqué, collecter cette espèce et la retransformer en espèce émettant de la fluorescence. Le signal de détection dans ce cas-là est donc double :

- le courant électrochimique mesuré à la pointe correspondant à la conversion de l'espèce non-émissive en espèce émissive.
- la fluorescence de l'espèce émissive ainsi générée, fluorescence localisée au niveau de la pointe.

Dans un premier temps, la détection par la pointe de l'espèce générée au substrat – le radical anion – est faite par électrochimie.

4.5.1 Mise en évidence de la détection électrochimique du radical anion par voltamétrie cyclique

Dans deux expériences successives, le substrat ITO est polarisé soit à 0 V (potentiel auquel il ne doit rien se passer), soit à -0,8 V (potentiel suffisamment faible selon la voltamétrie cyclique de la Figure 4.7 pour générer en continu le radical anion à partir de la chlorométhoxytétrazine. La Figure 4.16 rapporte les voltamétries cycliques enregistrées dans ces deux cas à la pointe lorsque celle-ci est placée à proximité du substrat, position repérée sur la courbe d'approche en A) de la même figure.

Dans le cas où l'ITO est polarisé à 0 V, un courant cathodique est enregistré, ce qui indique que la pointe détecte un oxydant. Dans le cas où il est polarisé à -0,8 V, au contraire, une vague d'oxydation est visible. Elle correspond à la réaction retour de réoxydation du radical anion en tétrazine neutre préalablement formé au substrat.

Ceci confirme que le mode génération au substrat-collecte à la pointe fonctionne comme espéré : la détection par électrochimie fonctionne. Dans la suite, la double détection par électrochimie et par fluorescence est mise en évidence et l'information délivrée par chacun de ces deux signaux comparée.

4.5.2 Mise en évidence de la détection par fluorescence : influence des potentiels de la pointe et du substrat

Afin de mettre en évidence la détection du radical anion par la fluorescence, il est possible, parallèlement au signal électrochimique, d'enregistrer des images de la pointe.

À cet effet, la pointe est placée à proximité du substrat. Substrat et pointe sont dans un premier temps polarisés suffisamment négativement pour générer le radical anion (- 0,8 V). C'est le début de la génération de l'espèce à détecter : le radical

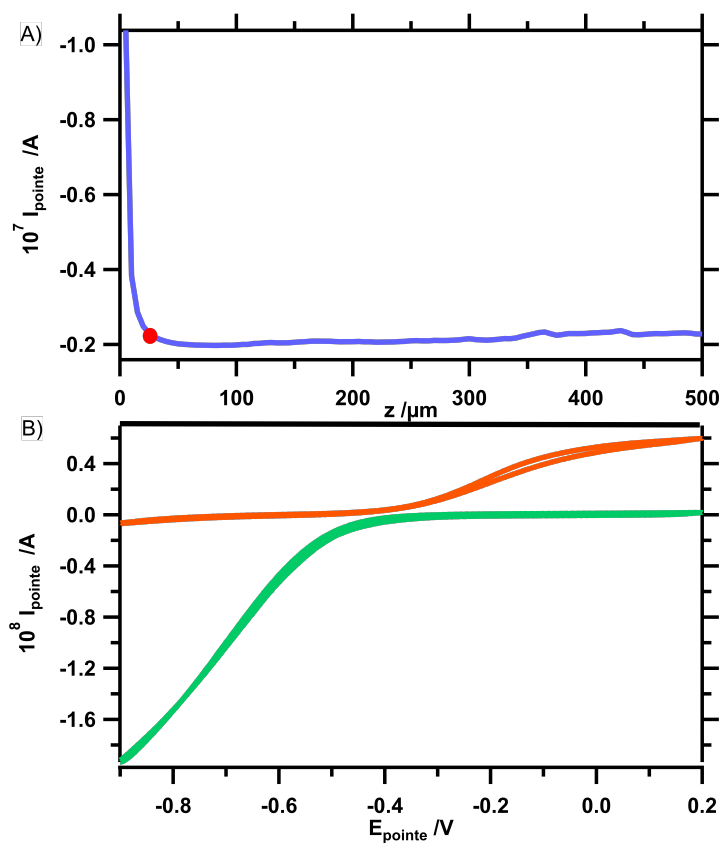


FIGURE 4.16 – A) Courant enregistré à la pointe en fonction de la position de la pointe par rapport au substrat (courbe d'approche) sur ITO. Le point rouge montre la position utilisée pour le mode génération-collecte. B) Voltamétrie cyclique sur la pointe (vitesse de balayage : 100 mV/s) enregistrée à la position représentée par le point rouge sur A) quand le substrat est polarisé à 0 V (vert) ou -0,8 V (rouge).

4.5. Le mode génération-collecte

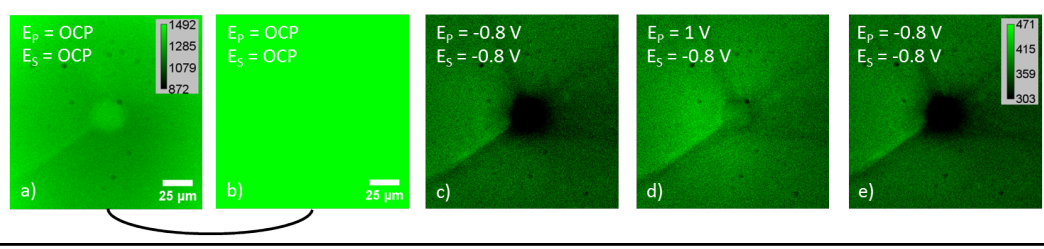


FIGURE 4.17 – Sélection d’images de fluorescence enregistrées lors de l’application à la pointe de la séquence en potentiel suivante : PCO (10 s), $-0,8$ V (10 s), 1 V (20 s), $-0,8$ V (20 s) parallèlement à celle appliquée au substrat : PCO (5 s), $-0,8$ V (55 s). Les images ont été prises aux temps : $t = 4$ s (images a et b), 18 s (image c), 38 s (image d) et 58 s (image e). Les images b) à e) correspondent à un même réglage du contraste et de la luminosité. L’image a) est en fait l’image b) avec un réglage du contraste et de la luminosité identique à celui des images de la Figure 4.9. La distance pointe-substrat est inférieure à $5 \mu\text{m}$.

anion. La conséquence d’une telle polarisation doit être la chute globale de l’intensité de fluorescence sur l’ensemble du champ de la caméra. Puis, la pointe est portée à un potentiel de 1 V, donc suffisamment positif pour permettre la réoxydation du radical anion en la forme neutre de la tétrazine. Ce temps durant lequel la pointe est polarisée à un potentiel positif correspond au temps de collecte. Le signal de détection est toujours le courant électrochimique de réoxydation, mais alors que précédemment la pointe collectait par voltammétrie cyclique, la détection du radical anion se fait ici par chronoampérométrie. Ce courant électrochimique doit être doublé d’un rallumage de la fluorescence localisé au niveau de la pointe.

Sur la Figure 4.17 sont reportées une sélection d’images de la pointe enregistrées avec la caméra parallèlement à l’application à la pointe et au substrat de ces signaux en potentiel. La comparaison des images b) et c) montrent la conséquence de la polarisation de la pointe et du substrat à $-0,8$ V par rapport à $\text{Ag} | \text{AgCl}$ à partir de leur potentiel en circuit ouvert, à savoir une chute globale de l’intensité de fluorescence. À partir de ce moment-là, le radical anion est généré en continu au substrat. Il est à noter que la pointe semble plus sombre malgré une extinction globale, probablement du fait de phénomènes d’ombre et de réflexion.

Lorsque le potentiel de la pointe est finalement porté à 1 V par rapport à $\text{Ag} | \text{AgCl}$, la comparaison des images c) et d) montre que l’intensité de fluorescence augmente au niveau de la pointe. L’intervalle de temps qui correspond au temps de collecte est donc bien marqué par une augmentation locale de la fluorescence : la présence du radical anion peut être détectée par fluorescence.

Afin de tester la sensibilité de cette détection par la fluorescence et de la comparer à celle du courant électrochimique, cette même expérience est répétée pour plusieurs potentiels de pointe au temps de la collecte. Pour chacune de ces expériences, un chronofluorogramme correspondant à l’évolution au cours du temps de l’intensité de fluorescence moyenne au sein de la région d’intérêt (Figure 4.8) est superposé au courant électrochimique mesuré dans le même temps. Les résultats de ces expériences sont reportés dans le paragraphe suivant.

4.5.3 Relation entre les deux signaux de collecte : le courant de pointe et l'intensité de fluorescence locale

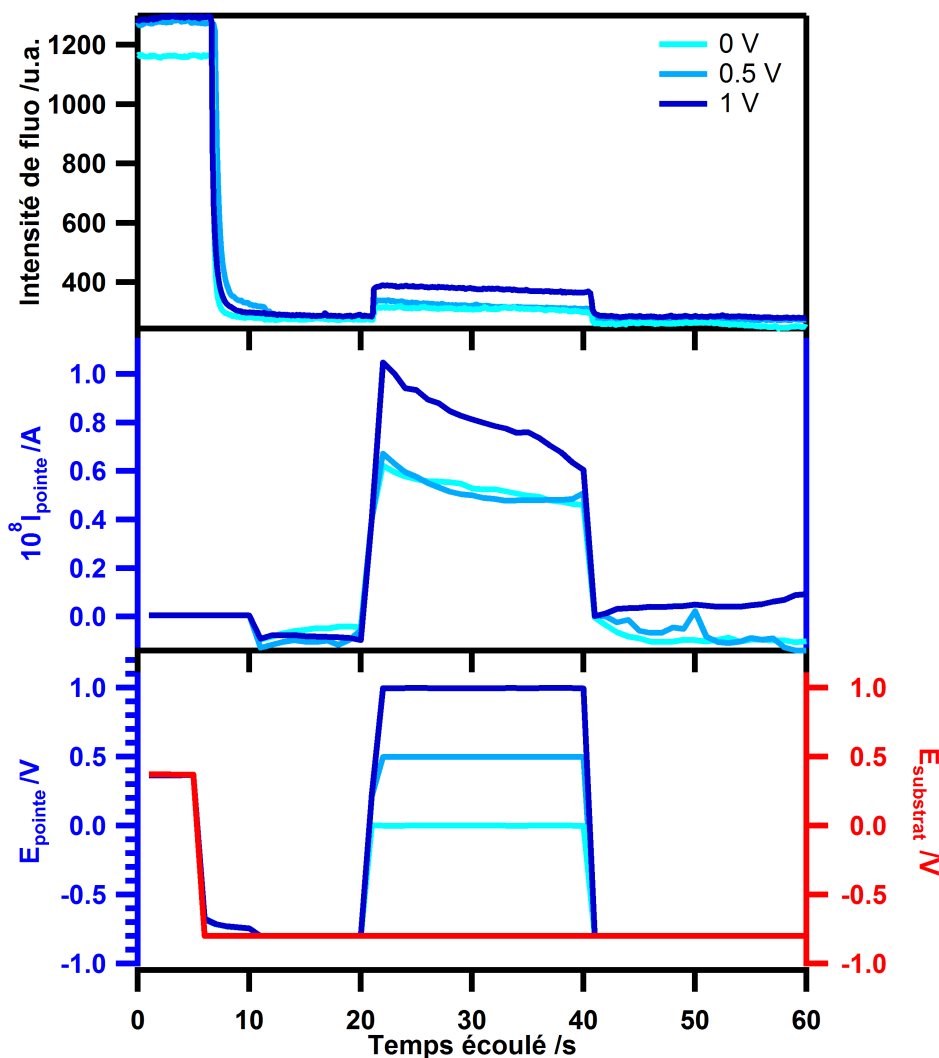


FIGURE 4.18 – Variation de l'intensité de fluorescence (haut) et du courant enregistré à la pointe (milieu) sous l'effet de la variation de potentiel appliqué à la pointe (bas) en fonction du temps en mode génération-collecte. La position de la pointe est celle montrée sur la courbe d'approche de la Figure 4.16. Le potentiel du substrat ITO est porté de circuit ouvert (5 s) à -0.8 V durant le reste de l'expérience (55 s). Le potentiel de la pointe est porté de circuit ouvert (10 s) à -0.8 V (10 s). Puis, la pointe est polarisée à 0 V ou 0,5 V ou 1V (20 s) et remise à -0.8 V (20 s).

Les courants de pointe (Figure 4.18 milieu) et les intensités de fluorescence (Figure 4.18 haut) enregistrés parallèlement aux variations de potentiel de la pointe et du substrat (Figure 4.18 bas) montrent que la double détection fonctionne bien. En effet, on peut voir que l'intensité de fluorescence augmente dès le moment que la pointe est polarisée à 0 V ou plus. Une très bonne corrélation entre le courant électrochimique et l'intensité de fluorescence peut être observée puisque des courants

4.6. Modélisation des modes feedbacks positif et négatif à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics

similaires (pour une polarisation à 0 V ou 0,5 V) correspondent à des intensités de fluorescence similaires tandis qu'un courant plus important (pour une polarisation à 1 V) donne une intensité également plus importante. Ceci semble montrer que la fluorescence enregistrée à la pointe est assez sensible pour sonder les espèces produites au substrat dans le mode génération-collecte du SECM.

La fin du chapitre revient sur le couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique en mode feedback puisqu'elle est consacrée à la description d'une modélisation par éléments finis de cette configuration. L'objectif est de simuler les courbes d'approche optiques décrites précédemment afin de mieux comprendre leur allure.

4.6 Modélisation des modes feedbacks positif et négatif à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics

Afin de comprendre les variations du taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisé en fonction de la distance pointe-substrat dans les modes "feedback" négatif et positif, nous avons modélisé le montage microscope électrochimique-microscope de fluorescence dans le logiciel Comsol Multiphysics. Ce logiciel permet la résolution numérique d'équations aux dérivées partielles par la méthode des éléments finis pour la modélisation spatialement résolue du comportement de systèmes physiques. Il s'agit dans un premier temps de dessiner la géométrie du problème physique que l'on souhaite étudier en tenant compte de ses symétries éventuelles, puis de mailler plus ou moins finement les zones dans lesquelles les équations différentielles seront résolues : un maillage fin permettra de mieux rendre compte de forts gradients locaux des grandeurs évaluées. Enfin, il s'agit de proposer une modélisation physique du système étudié en définissant les équations aux dérivées partielles à résoudre ainsi que les conditions aux limites imposées au système.

4.6.1 Définition de la géométrie du problème pour une distance pointe-substrat donnée

La géométrie considérée par la suite est celle représentée sur le schéma de la Figure 4.19. Elle est décrite en coordonnées cylindriques. La symétrie axiale du montage permet de mener les calculs en 2D. L'ultramicroélectrode est modélisée sous la forme d'un disque de rayon a enfermé dans une gaine isolante de rayon R . Elle est immergée dans une solution d'une molécule électrofluorochrome sous sa forme oxydée et luminescente à la concentration C_{bulk}^{Ox} . Le microdisque est situé à une distance d du substrat. Les dimensions de la cuvette sont choisies suffisamment grandes pour éviter les effets de bord ($R_{\infty} \gg a$ et $|Z_{\infty}| \gg a$). L'axe de symétrie est noté z . Il est descendant et l'origine ($z=0$) est fixée au niveau du microdisque.

4.6.2 Définition de la physique du problème : équation de la diffusion, conditions aux limites et conditions initiales

L'équation différentielle de transfert de masse par diffusion en géométrie cylindrique 4.3 est résolue numériquement en régime stationnaire à l'aide de la méthode des éléments finis dans toute la solution. Les phénomènes de migration et de convection sont négligés.

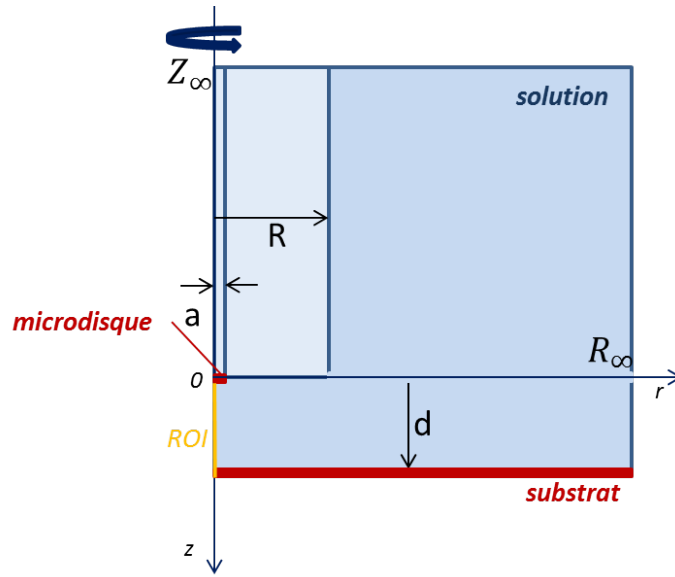


FIGURE 4.19 – Géométrie du problème pour la modélisation du couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique à balayage définie dans le logiciel de simulation

$$\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = 0 \quad (4.3)$$

Les conditions aux limites ont été choisies de façon à simuler la réduction à la pointe de la sonde électrofluorochrome et à modéliser le comportement isolant (feedback "négatif") ou conducteur (feedback "positif") du substrat. Dans le cas du "feedback" positif, il s'agit de simuler la réoxydation au niveau du substrat de la sonde redox initialement réduite à la pointe. Quant au comportement isolant, il est retranscrit par une annulation du flux au niveau du substrat. La réduction du médiateur redox électrofluorochrome à la pointe ainsi que sa réoxydation dans le cas du substrat conducteur sont considérées comme limitées uniquement par le transfert de masse. Il s'agit évidemment d'une hypothèse très forte pour un substrat semi-conducteur comme l'ITO. Les conditions aux limites finalement utilisées sont donc les suivantes :

- À la pointe :

$$C^{Ox} = 0 \text{ et } C^{Red} = C_{bulk}^{Ox} \text{ pour } 0 \leq r \leq a \text{ et } z = 0. \quad (4.4)$$

- Au niveau de la gaine isolante :

$$\left(\frac{\partial C^{Ox}}{\partial z} \right)_{z=0} = 0 \text{ et } \left(\frac{\partial C^{Red}}{\partial z} \right)_{z=0} = 0 \text{ pour } a \leq r \leq R \text{ et } z = 0. \quad (4.5)$$

$$\left(\frac{\partial C^{Ox}}{\partial r} \right)_{r=R} = 0 \text{ et } \left(\frac{\partial C^{Red}}{\partial r} \right)_{r=R} = 0 \text{ pour } r = R \text{ et } z \leq 0. \quad (4.6)$$

- Au niveau du substrat :

$$C^{Red} = 0 \text{ et } C^{Ox} = C_{bulk}^{Ox} \text{ pour } r \geq 0 \text{ et } z = d \text{ sur substrat conducteur.} \quad (4.7)$$

4.6. Modélisation des modes feedbacks positif et négatif à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics

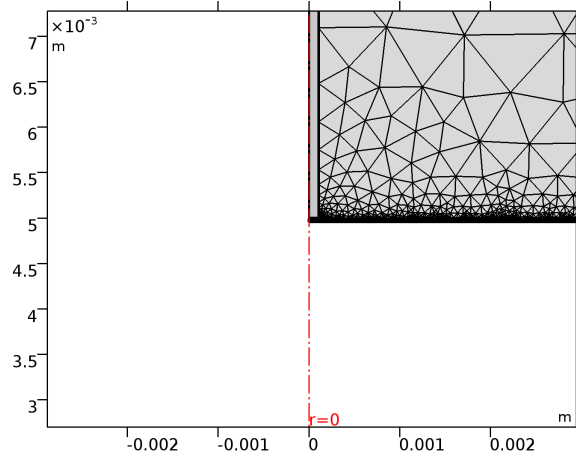


FIGURE 4.20 – Maillage utilisé lors de la simulation pour une distance pointe-substrat de $40 \mu\text{m}$. Pour chaque distance pointe-substrat, le logiciel redéfinit un maillage et calcul le champ de concentration associé à ce nouveau maillage. Un zoom de cette image autour du microdisque est représenté Figure 4.21.

$$\left(\frac{\partial C^{Ox}}{\partial z}\right)_{z=d} = 0 \text{ et } \left(\frac{\partial C^{Red}}{\partial z}\right)_{z=d} = 0 \text{ pour } r \geq 0 \text{ et } z = d \text{ sur substrat isolant.} \quad (4.8)$$

- Sur les autres frontières :

$$C^{Ox} = C_{bulk}^{Ox} \text{ pour } r = R_{\infty} \text{ et } Z_{\infty} \leq z \leq d \quad (4.9)$$

$$C^{Ox} = C_{bulk}^{Ox} \text{ pour } R \leq r \leq R_{\infty} \text{ et } z = Z_{\infty} \quad (4.10)$$

Dans le cas présent, le maillage de la solution a été choisi particulièrement fin dans les zones où les gradients de concentration sont potentiellement les plus importants, à savoir au niveau du microdisque (pour $0 \leq r \leq a$ et $z = 0$), du substrat (pour $r \geq 0$ et $z = d$) et sur l'axe de symétrie entre la pointe et le substrat ($r = 0$ et $0 \leq z \leq d$). Ce maillage est représenté pour une distance pointe-substrat de $40 \mu\text{m}$ sur les Figures 4.20 et 4.21.

4.6.3 Paramétrage du problème : variation de la distance pointe-substrat

De tels calculs permettent d'obtenir le profil spatial de la concentration $C_d^{Ox}(r, z)$ en la forme oxydée de la sonde électrofluorochrome associé à la distance pointe-substrat d définie dans la géométrie du problème. Afin de simuler les courbes d'approche optiques, ces calculs doivent être reproduits pour toutes les distances pointe-substrat d'intérêt. d est donc traité comme un paramètre variant de $0 \mu\text{m}$ à $500 \mu\text{m}$. Pour chaque valeur du paramètre d , le logiciel modifie la géométrie, redéfinit un maillage et calcule le nouveau profil de concentration $C_d^{Ox}(r, z)$ issu de la modélisation définie dans le paragraphe 4.6.2. À titre d'exemple, sont représentés sur la Figure 4.22 trois exemples de profils $C_d^{Ox}(r, z)$ calculés pour trois distances d différentes.

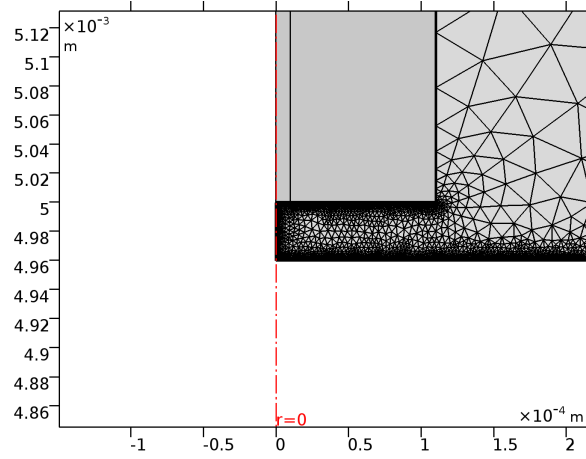


FIGURE 4.21 – Zoom sur le maillage au niveau de la pointe et de l'axe de symétrie. Celui-ci est choisi très fin au niveau du disque de la microélectrode, de l'axe de symétrie et du substrat.

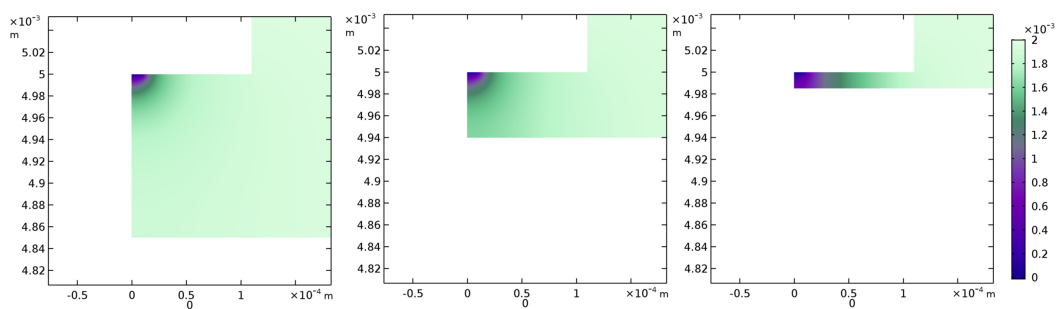


FIGURE 4.22 – Représentations des champs de concentration calculés par Comsol en configuration "feedback" négatif pour trois distances pointe-substrat (de la plus grande à gauche à la plus petite à droite). Du bleu foncé au vert très clair, la concentration en tétrazine locale tend de 0 mM à 2 mM.

4.6.4 Exploitation des différents profils de concentration : modélisation du taux de modulation de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat

À ce stade, pour chaque distance pointe-substrat d , il reste à définir une région d'intérêt "simulée" ROI_d aussi représentative que possible de la région d'intérêt "expérimentale" (voir Figure 4.8). Puis, on peut utiliser le champ de concentration en espèce émettrice $C_d^{Ox}(r, z)$, calculé à cette position de la pointe, pour simuler des "mesures" de l'intensité de fluorescence $I_{min}(d)$ et $I_{max}(d)$ au sein de la région d'intérêt ainsi définie.

Étant donné la relation de proportionnalité observée expérimentalement entre I_{max} et la distance pointe-substrat, l'influence de la profondeur de champ peut être négligée et, en l'absence de réaction électrochimique, la fluorescence collectée expérimentalement au niveau de la caméra dans la ROI expérimentale (carré rouge de la Figure 4.8) peut être considérée comme provenant de façon égale de tous les émetteurs de fluorescence situés dans le volume de solution délimité d'une part par ce carré rouge, d'autre part par l'espace disponible entre la pointe et le substrat. Ainsi la région d'intérêt théorique ROI_d doit nécessairement commencer à $z = 0$ et finir à $z = d$ et l'intensité $I_{max}(d)$ théorique au sein de cette ROI peut être considérée comme directement proportionnelle à la quantité d'espèce électrofluorochrome présente dans la région considérée. Sous cette hypothèse, elle sera égale au produit de C_{bulk}^{Ox} par d . Quant à l'intensité $I_{min}(d)$ théorique, elle peut être calculée dans un premier temps avec l'hypothèse supplémentaire qu'il n'y a pas non plus d'interaction entre l'espèce oxydée émettrice et l'espèce réduite non fluorescente électrogénérée (absence d'inhibition). Sous toutes ces hypothèses, $I_{min}(d)$ sera proportionnelle à l'intégrale de $C_d^{Ox}(r, z)$ sur le volume de la région d'intérêt et le coefficient de proportionnalité est égal à celui en l'absence de réaction électrochimique.

4.6.5 Mise en œuvre et résultats de la modélisation

Finalement, a , R , R_∞ et Z_∞ sont fixés respectivement à $10 \mu\text{m}$, $110 \mu\text{m}$, 1 cm et $-0,3 \text{ cm}$. La concentration de la solution à l'infini C_{bulk}^{Ox} est posée égale à 2 mM . La valeur du paramètre d , quant à elle, varie de $5 \mu\text{m}$ à $500 \mu\text{m}$ par pas de $5 \mu\text{m}$. Pour chaque valeur de d , Comsol calcule le profil de concentration $C_d^{Ox}(r, z)$.

La région d'intérêt "théorique" ROI_d est définie par le segment situé sur l'axe de symétrie z et délimité par le microdisque d'un côté et le substrat de l'autre côté ($r = 0$ et $0 \leq z \leq d$). $I_{min}(d)$ et $I_{max}(d)$ correspondant aux intensités de fluorescence dans la région d'intérêt ainsi définie respectivement en la présence et en l'absence de la réaction électrochimique, peuvent être calculés selon les équations suivantes :

$$I_{min}(d) \propto \int_{z=0}^d C_d^{Ox}(r = 0, z) dz \quad (4.11)$$

$$I_{max}(d) \propto C_{bulk}^{Ox} \int_{z=0}^d dz = C_{bulk}^{Ox} \times d \quad (4.12)$$

Finalement, l'amplitude du taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisée est donnée par :

$$\frac{I_{max}(d) - I_{min}(d)}{I_{max}(d)} = 1 - \frac{\int_{z=0}^d C_d^{Ox}(r = 0, z) dz}{C_{bulk}^{Ox} \times d} \quad (4.13)$$

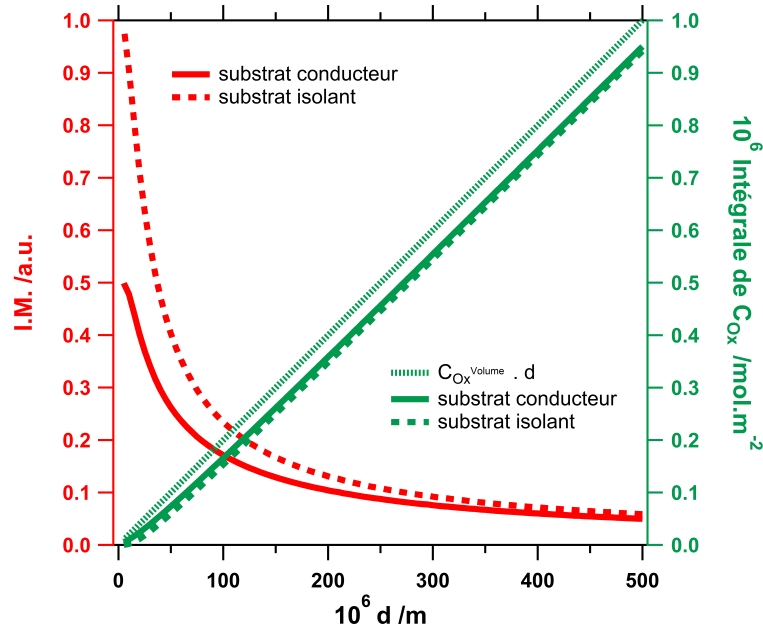


FIGURE 4.23 – Représentation en vert de $\int_{z=0}^d C_d^{Ox}(r=0,z)dz$, grandeur proportionnelle à I_{min} , et de $C_{bulk}^{Ox} \times d$, grandeur proportionnelle à I_{max} , superposées à celles, en rouge, des taux de modulation simulés, en fonction de la distance pointe-substrat d . La configuration "feedback" négatif est en traits pointillés, la configuration "feedback" positif en trait plein.

La Figure 4.23 montre les représentations graphiques de $\int_{z=0}^d C_d^{Ox}(r=0,z)dz$ et $C_{bulk}^{Ox} \times d$ en fonction de la distance pointe-substrat d , ainsi que celles des taux de modulation normalisés "simulés" en modes feedback négatif et positif. Elles ont été obtenues comme décrits précédemment.

À courte distance, le maximum de modulation théorique est de 100 % sur substrat isolant et de seulement 50 % sur substrat conducteur. Ces résultats théoriques viennent corroborer l'hypothèse selon laquelle les différences observées expérimentalement entre substrat conducteur et substrat isolant concernant les maxima des taux de modulation s'expliquent par la régénération de l'espèce émettrice au niveau du substrat conducteur.

Toutefois, plusieurs différences sont notables entre courbes simulées et courbes expérimentales.

Ainsi, la modélisation ne permet pas de retrouver la chute du taux de modulation observée expérimentalement à très courte distance dans toutes les configurations SECM. En effet, l'intensité de fluorescence minimale théorique $I_{min}(d)$ tend logiquement vers 0 lorsque la distance pointe-substrat d tend vers 0, puisque le volume devient tellement faible que tout est éteint. Ainsi, le taux de modulation normalisé théorique $\frac{I_{max}(d) - I_{min}(d)}{I_{max}(d)}$ tend quant à lui vers $\frac{I_{max}(0)}{I_{max}(0)} = 1$. Expérimentalement, la décroissance vers 0 peut s'expliquer par la lumière provenant de l'environnement extérieur de la ROI, comme vu précédemment :

$$\frac{I_{max}(0) - I_{min}(0)}{I_{max}(0)} = \frac{i - i}{i} \quad (4.14)$$

4.7. Conclusions et perspectives

avec i l'intensité lumineuse parasite.

La seconde différence vient du comportement à longue distance. Si l'allure générale est comparable entre courbe simulée et courbe expérimentale, la décroissance observée est en réalité beaucoup plus "rapide" sur les courbes théoriques puisque dès $100\ \mu\text{m}$, le taux de modulation est inférieur à 10 %, alors qu'il n'atteint une telle valeur qu'à partir de $300\ \mu\text{m}$ sur la courbe expérimentale. Nous tenterons d'expliquer ce phénomène dans le chapitre suivant.

4.7 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons décrit le couplage entre un microscope électrochimique à balayage et un microscope de fluorescence par l'utilisation d'une unique sonde à la fois électroactive et fluorescente : la chlorométhoxytétrazine. Il a été montré que l'intensité de fluorescence du médiateur électrofluorochrome peut être contrôlée par le potentiel de la pointe du SECM et que l'amplitude de la modulation est sensible :

- à la distance pointe-substrat ;
- à la nature (isolante ou conductrice) du substrat ainsi qu'à son potentiel lorsqu'il est conducteur.

Ces dépendances permettent l'enregistrement de courbes d'approche optiques plus sensibles à la présence du substrat que ne le sont les courbes d'approche électrochimiques classiques. Quant à la dépendance envers la nature du substrat et son potentiel (pour un substrat conducteur), elle s'exprime expérimentalement par un maximum de l'amplitude de la modulation d'autant plus faible que la réaction de rétroaction au substrat est efficace. Ce comportement est confirmé par les résultats de la simulation numérique.

Dans le mode génération-collecte, le courant électrochimique à la pointe et l'intensité de fluorescence sont tous les deux sensibles à l'espèce produite par le substrat.

Dans la suite, nous détaillons d'autres résultats obtenus en modifiant le montage. Dans le dispositif expérimental utilisé dans ce chapitre, l'excitation de la sonde électrofluorochrome est assurée par l'association d'une lampe blanche à un filtre d'excitation et un miroir dichroïque. Par ailleurs, l'information de la modulation optique est donnée par la mesure d'une intensité de fluorescence. Cette dernière est collectée à la pointe :

- soit par la caméra CCD, qui permet d'obtenir une information spatiale.
- soit par le spectromètre, qui offre une information résolue en longueur d'onde.

Dans le chapitre suivant, nous remplacerons la lampe blanche par une source d'excitation pulsée, la caméra et le spectromètre par une carte d'acquisition. De cette façon, des mesures de fluorescence résolues en temps sont envisageables. La mesure de la durée de vie s'ajoute à celle de l'intensité de fluorescence. Cette mesure peut apporter un complément d'information utile notamment à l'étude des mécanismes d'inhibition.

Chapitre 5

Couplage de la microscopie de fluorescence résolue en temps avec le SECM par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome

5.1 Objectifs

Dans le montage tel que décrit précédemment, l'application d'un signal en potentiel à la pointe SECM permettait d'enregistrer au cours du temps, d'une part le courant lié à la réaction électrochimique, d'autre part l'intensité de fluorescence modulée par cette réaction électrochimique. Le remplacement de la source d'excitation continue par une source d'excitation pulsée est ici envisagé pour permettre, en outre, l'acquisition simultanée de mesures de durée de vie de fluorescence.

Des mesures de durée de vie avaient déjà été entreprises par l'équipe grâce au montage couplant une simple cellule électrochimique à trois électrodes à la microscopie de fluorescence décrit sur la Figure 1.26. Des fluorophores organiques (Bodipy et tétrazines) ou des complexes organométalliques (complexe de ruthénium) étaient utilisés.[65] [66] Au cours de ces mesures, l'équipe a constaté que, dans le cas de la tétrazine, la chute de l'intensité de fluorescence lors de la polarisation de l'électrode-substrat transparente d'ITO était corrélée à une chute de la durée de vie. Ainsi, il semblerait que la chute d'intensité de fluorescence observée soit non seulement due à la diminution du nombre de fluorophores émetteurs mais également à une inhibition de la fluorescence des tétrazines restantes par le radical anion électrogénéré. Dans le cas des Bodipy, la chute de la durée de vie observée est très faible. Ceci est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle le radical anion électrogénéré réagit dans le milieu et ne peut pas inhiber la fluorescence du fluorophore restant. Pour le complexe de ruthénium, il est également observé une chute de la durée de vie, également attribuée à l'inhibition de la fluorescence par la forme oxydée électrogénérée.

Dans le cas de la tétrazine, ces études mécanistiques sont avancées comme argument pour expliquer les cinétiques d'extinction et de rallumage de l'intensité de fluorescence observées expérimentalement. En effet, il est montré que la variation de la durée de vie, grandeur estimée grâce à l'équation de Stern-Volmer qui la relie à la concentration en inhibiteur (et donc à la charge Coulombienne), varie linéairement avec la racine carrée du temps, comme attendu pour un phénomène diffusif.

Il paraissait intéressant d'introduire cette composante résolue en temps sur le couplage SECM - microscopie de fluorescence. En effet, l'utilisation d'une ultramicroélectrode, en plaçant le système dans des conditions stationnaires au niveau

de l'électrochimie, doit permettre de relier directement le potentiel de pointe et la concentration en inhibiteur pour une étude mécanistique plus précise. Réciproquement, à la lumière du mécanisme d'inhibition, il est attendu une meilleure compréhension des phénomènes intervenant dans le couplage microscopie de fluorescence - microscopie électrochimique responsables de l'allure des courbes d'approche optiques.

Après la description du dispositif expérimental dans le paragraphe 5.2, deux aspects sont donc successivement traités :

- la mise en évidence expérimentale de l'inhibition de la fluorescence de la tétrazine neutre par le radical anion dans le cas du couplage SECM - microscopie de fluorescence (par la modulation de la durée de vie de fluorescence sous l'effet du potentiel de pointe) et la modélisation approfondie du mécanisme d'inhibition font l'objet de la partie 5.3. Une telle modélisation nécessite l'étude couplée des mesures de durée de vie et d'intensité de fluorescence enregistrées parallèlement à l'application de séquences de potentiel à la pointe, pour une distance pointe-substrat donnée (application d'un potentiel de réduction de valeur variable).
- l'étude du rôle de l'inhibiteur sur l'aspect des courbes d'approche optique est décrite dans la partie 5.4. L'utilisation de la microscopie résolue en temps permet de mesurer non seulement la modulation de l'intensité de fluorescence mais également celle de la durée de vie et donc de tracer les courbes d'approche relatives à ces deux grandeurs. L'objectif est ici d'étudier l'influence de l'inhibition sur la forme des courbes d'approche optique grâce à la modélisation aux éléments finis.

Les expériences décrites dans les parties 5.3 et 5.4 sont toutes menées en configuration "feedback" négatif. C'est dans la dernière partie du chapitre, partie 5.5, que l'influence de la nature du substrat et de son potentiel est étudiée sur le nouveau dispositif expérimental. Le substrat utilisé est alors une lame d'ITO transparente.

5.2 Mise en œuvre expérimentale du couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps

5.2.1 Description du dispositif expérimental

Dans ce chapitre, il s'agit toujours d'étudier l'association d'un microscope électrochimique à balayage et d'un microscope de fluorescence avec éclairage en plein champ. Toutefois, le montage est modifié de façon à pouvoir faire des mesures de fluorescence résolues en temps. Le nouveau dispositif est représenté sur le schéma de la Figure 5.1. Au niveau du microscope électrochimique à balayage, il n'y a pas de modification par rapport à celui représenté sur la Figure 4.4. Un ordinateur est utilisé pour le contrôle des deux potentiostats et du piezoélectrique. Avec un tel dispositif expérimental, le substrat et la pointe SECM peuvent être polarisés séparément grâce au mode bipotentiostat.

Au niveau de la source d'excitation, l'association lampe blanche dichroïque utilisée dans le chapitre 4 est remplacée par une diode laser pulsée de longueur d'onde 465 nm (largeur des pulses de 30 ps) pilotée par un contrôleur. Le contrôleur permet de régler la puissance de la source et le taux de répétition du pulse, fixés pour les expériences décrites ici respectivement à 1 mW à l'échantillon et 2,5 MHz. Il gère

5.2. Mise en œuvre expérimentale du couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps

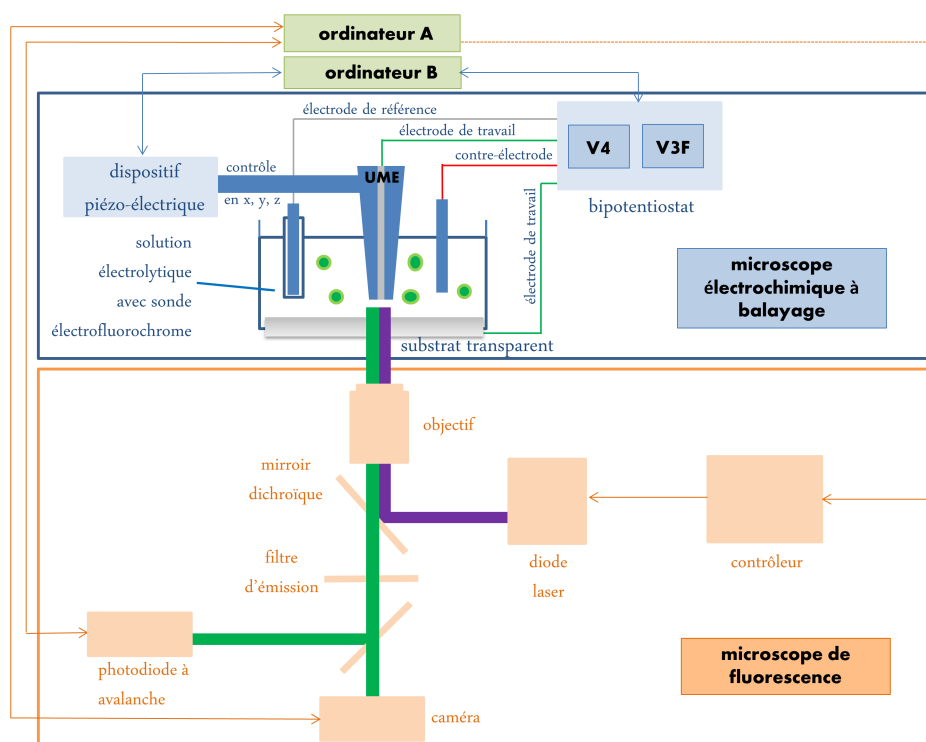


FIGURE 5.1 – Dispositif expérimental du couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique à balayage adapté à des mesures de fluorescence résolues en temps. V4 et V3F sont les noms des deux potentiostats branchés en mode bipotentiostat

également la synchronisation avec la collecte de l'émission. L'excitation pulsée du laser est focalisée sur l'interface substrat solution à travers l'objectif.

Enfin, le signal émis traverse le miroir dichroïque et le filtre d'émission. Un miroir permet de récupérer les photons soit sur la caméra (pour faire les réglages optiques et de positionnement de la pointe), soit sur une photodiode à avalanche. Les données collectées par la photodiode sont traitées sur le deuxième ordinateur via une carte de comptage de résolution 250 ps. Celle-ci est synchronisée avec la source grâce au contrôleur.

La synchronisation entre les deux ordinateurs est quant à elle manuelle.

La solution utilisée est similaire à celle utilisée dans le chapitre 4 : la chlorométhoxytétrazine est dissout dans l'acétonitrile à la concentration 1,1 mM en présence de tétrabutylammonium hexafluorophosphate (0,1 M) qui joue le rôle de sel de fond. De même que précédemment, cette solution est dégazée à l'argon préalablement à toute expérience. Le flux est ensuite maintenu en surface.

La carte d'acquisition compte les photons "tombés" dans des canaux temporels à partir du pulse laser (grâce à la synchronisation avec le laser). La largeur temporelle d'un canal est fixée par la résolution de la carte. Le nombre de canaux temporels de la carte dépend de la fréquence de répétition du pulse puisqu'il est égal au rapport de la période entre deux pulses (inverse de la fréquence) sur la résolution de la carte. Dans le cas décrit ici, le nombre de canaux est donc égal à :

$$\frac{1/F}{\text{résolution}} = \frac{1/(2,5 \cdot 10^6)}{250 \cdot 10^{-9}} = 1600 \quad (5.1)$$

Ainsi, dans le canal numéroté i "tombent" tous les photons émis un delta de temps donné après le pulse laser noté dt_i et égal à i multiplié par la résolution. Au bout d'un temps défini par l'expérimentateur (de l'ordre de quelques secondes) noté T_j , on compte l'ensemble des photons tombés dans chacun des canaux, puis on construit un histogramme temporel. La durée totale de l'histogramme est la période entre deux pulses. La résolution des classes est choisie supérieure à la résolution de la carte (1 seconde). L'amplitude de la classe est donc le nombre de photons reçus par seconde, donc l'intensité de fluorescence.

À partir de cet histogramme, la durée de vie de fluorescence telle que décrite dans le chapitre 1 peut être évaluée de nombreuses façons. Seules les deux ci-dessous sont utilisées dans ce manuscrit :

- par ajustement numérique direct de ces chronofluorogrammes (dont l'allure est celle d'un déclin exponentiel);
- par calcul d'une moyenne.

La durée de vie moyenne est calculée de façon discrète. Ainsi, sur une période de comptage notée T_j , la durée de vie moyenne notée τ_j est donnée par :

$$\tau_j = \frac{\sum_i n_i \cdot dt_i}{\sum_i n_i} \text{ tel que } dt_i > 0 \text{ et } n_i > s \quad (5.2)$$

L'indice i est associé à un canal. dt_i est le temps après pulse laser associé au canal i . Ainsi, un photon émis un temps dt_i après le pulse "tombe" dans le canal i . La condition $dt_i > 0$ permet de ne compter que les photons après les pulses, le canal 0 étant fixe. n_i est le nombre de photons tombés dans le canal i sur l'ensemble de la période T_j . Dans la condition $n_i > s$, s est une valeur seuil fixée au courant d'obscurité sur la période T_j (bruit du détecteur).

5.2. Mise en œuvre expérimentale du couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps

La méthode d'évaluation de la durée de vie par ajustement numérique des déclin exponentiels avec la méthode des moindres carrés est la plus utilisée car elle permet, entre autres choses, de détecter d'éventuelles contributions d'espèces différentes (si le déclin est biexponentiel voire triexponentiel ou plus). De plus, la qualité de l'ajustement peut être évaluée grâce au calcul d'un paramètre statistique : le χ^2 .

Dans le cas d'un déclin monoexponentiel, les deux évaluations de la durée de vie (moyenne en intensité et intrinsèque par ajustement numérique des déclin) sont cependant équivalentes. L'évaluation de la durée de vie par le calcul de la moyenne en intensité présente l'avantage d'un accès rapide à l'information, pratique en cours d'expériences. Elle peut cependant être biaisée dans plusieurs cas :

- Elle est sous-évaluée si le déclin n'a pas fini de décroître avant le nouveau pulse laser, car la statistique est incomplète.
- Elle est surestimée dans le cas où le nombre de photons est insuffisant.

À l'exception du paragraphe 5.3.5, toutes les durées de vie dont il est question dans ce chapitre sont en fait des durées de vie moyenne. Un moyen paraissant raisonnable pour estimer la qualité de l'évaluation de la durée de vie par le calcul de la moyenne des temps d'arrivée de photons est de la comparer directement à celle issue de l'étude des déclin, après s'être assuré, bien sûr, que les ajustements numériques de ces déclin sont eux-mêmes recevables (étude des χ^2) et que le déclin est bien monoexponentiel. C'est l'étude qui est proposée dans le paragraphe 5.3.5.

Il est à noter que, pour chaque photon, le temps dt d'arrivée après un pulse est enregistré mais aussi le temps dT après le début de la période T_j . Le montage tel que décrit ci-dessus permet donc également de reconstruire des chronofluorogrammes comme ceux étudiés dans le chapitre précédent.

5.2.2 Les différentes configurations

Sauf mention contraire, toutes les expériences sont mises en œuvre en mode feed-back négatif. Le substrat isolant utilisé, tout comme dans le chapitre précédent, est une lame de verre de microscope.

Dans la suite, deux types d'expériences sont décrites pour répondre à deux types d'objectifs.

Le premier objectif est la mise en évidence de l'inhibition de la fluorescence de la tétrazine neutre par le radical anion et l'étude de son mécanisme, dans le contexte du couplage SECM-microscope de fluorescence.

Pour cela, la pointe est positionnée à une distance fixe du substrat, de l'ordre de grandeur du diamètre de l'UME. Puis, des séquences en potentiel correspondant chacune à un cycle d'extinction-rallumage lui sont successivement appliquées, la valeur du potentiel appliqué à l'extinction étant de plus en plus négative au fur et à mesure des séquences. Plus le potentiel imposé à la réduction est négatif, plus la quantité d'inhibiteur, i.e. de radical anion, générée est importante. Il est proposé une estimation de cette quantité à partir de l'évaluation de la charge coulombienne sur les courbes de courant. Les mesures de durée de vie, d'intensité de fluorescence et de courant (donc de la quantité d'inhibiteur) effectuées parallèlement permettent une étude globale du mécanisme d'inhibition.

Le deuxième objectif concerne les courbes d'approche d'optiques établies dans le chapitre précédent. Ces courbes d'approche sont réétablies avec le nouveau montage non seulement à l'aide du signal en intensité de fluorescence mais également de celui en durée de vie. Les différentes courbes ainsi obtenues sont comparées. Puis,

la connaissance du mécanisme d'inhibition, acquise de part le premier objectif, est utilisée pour les modéliser plus finement que dans le chapitre précédent et rendre compte du rôle de l'inhibition dans leur allure globale.

Pour cela, la position de la pointe par rapport au substrat est préalablement repérée à l'aide d'une courbe d'approche électrochimique classique. Au cours de la série de mesures qui suit, la séquence en potentiel correspondant à un cycle d'extinction rallumage qui est appliqué à la microélectrode demeure identique (même potentiel de réduction) et c'est la distance pointe-substrat qui devient le paramètre variable. Ainsi, pour chaque distance pointe substrat étudiée, parallèlement à l'application de la séquence en potentiel, l'intensité de fluorescence, la durée de vie et l'intensité du courant traversant l'UME sont enregistrées.

5.3 Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

Dans cette partie, l'objectif est de mettre en évidence l'inhibition de la fluorescence de la tétrazine neutre par le radical anion électrogénéré dans le couplage SECM - microscope de fluorescence et d'en étudier le mécanisme.

Comme vu dans la partie 1.3.4, il existe plusieurs mécanismes d'inhibition. Le mécanisme dynamique, par exemple, résulte d'une interaction entre le fluorophore à l'état excité et l'inhibiteur. Il est caractérisé macroscopiquement par un taux de desexcitation noté k_q et par une constante appelée constante de Stern-Volmer notée K_{SV} . Il est mis en évidence expérimentalement par une relation affine entre le rapport de la durée de vie en l'absence d'inhibiteur par celle en présence d'inhibiteur $\frac{\tau_f}{\tau}$ et la concentration en inhibiteur $[Q]$, le coefficient directeur étant la constante de Stern-Volmer.

Le mécanisme statique peut, par exemple, résulter de la formation d'un complexe entre le fluorophore à l'état fondamental et l'inhibiteur. Cette interaction est caractérisée macroscopiquement par une constante de complexation notée K_S . Elle est mise en évidence expérimentalement par une relation affine entre le rapport de l'intensité de fluorescence en l'absence d'inhibiteur par celle en présence d'inhibiteur $\frac{I_f}{I}$ et la concentration en inhibiteur $[Q]$, le coefficient directeur étant la constante d'inhibition statique. La durée de vie n'est, par contre, pas affectée.

Ces deux mécanismes peuvent intervenir séparément mais également de façon couplée.

Dans la partie 5.2, il a été vu que le dispositif expérimental utilisé permettait de mesurer simultanément les courants de pointe, les durées de vie moyennes et les intensités de fluorescence. Dans la suite, une méthode est proposée pour relier les courants de pointe à la concentration en inhibiteur $[Q]$. Les mesures de durées de vie et d'intensités de fluorescence sont mises en relation avec ces quantités d'inhibiteur pour modéliser au mieux le mécanisme d'inhibition. Les résultats de la modélisation à partir des données expérimentales sont appuyés par des calculs de chimie computationnelle effectués sur des dimères de tétrazine. Enfin, une réflexion est proposée sur la méthode d'évaluation de la durée de vie de fluorescence.

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

durée (s)	10	20	30	60
potentiel (V)	PCO	0	x	0

TABLEAU 5.1 – Signal en potentiel appliqué à la pointe du microscope électrochimique, x varie de -0,45 V à -0,80 V, sur substrat isolant

5.3.1 Mise en évidence expérimentale par modulation du potentiel appliqué à la pointe

La pointe de 25 microns de diamètre est placée à 30 μm du substrat (lame de verre). Cette distance pointe-substrat est volontairement choisie de l'ordre de grandeur de la sphère de diffusion autour de la pointe. Le signal en potentiel appliqué, au cours du temps, à l'ultra-microélectrode est décrit dans le tableau 5.1.

La valeur de x varie de - 0,45 V à - 0,8 V.

Le montage tel que décrit précédemment permet, pour chaque potentiel x, d'enregistrer à la fois le courant traversant l'ultra-microélectrode, l'intensité de fluorescence et la durée de vie de fluorescence qui sont tracés en fonction du temps écoulé respectivement en haut, au milieu et en bas de la Figure 5.2.

Conformément à ce qui a été vu dans le chapitre précédent, l'application d'un saut de potentiel de 0 V à x V (pour $-0,8 < x < -0,45$) entraîne à nouveau l'apparition d'un courant de réduction parallèlement à une chute de l'intensité de fluorescence. De plus, la valeur du courant de réduction de la tétrazine en son radical anion est d'autant plus grande en valeur absolue et l'intensité de fluorescence au cours de la réduction d'autant plus faible que le potentiel appliqué x est négatif. La valeur initiale de l'intensité de fluorescence est retrouvée lorsque le potentiel de l'électrode est ramené à 0 V. De la même façon, le courant électrochimique s'annule à nouveau. À ce stade, la chute de fluorescence lors de la réduction peut être attribuée à une simple baisse du nombre de molécules fluorescentes, étant donné qu'une partie des molécules de tétrazine émettrices a été transformée en des radicaux anions non émetteurs.

Toutefois, on constate que la baisse de l'intensité de fluorescence est également corrélée à une chute de la durée de vie (Figure 5.2 bas). Ces durées de vie plus courtes peuvent s'expliquer par une inhibition de type dynamique : le radical anion non seulement n'émet pas de fluorescence, mais également offre une voie de désexcitation supplémentaire à la tétrazine excitée qui, dans ce cas, n'émet pas non plus de fluorescence, cela se traduit macroscopiquement par une durée de vie apparente plus faible.

La Figure 5.2 bas montre également que la durée de vie est d'autant plus abaissée que le potentiel appliqué à la pointe est négatif. Cette relation entre durée de vie et potentiel appliqué à la pointe est attendue. En effet, plus le potentiel appliqué à la pointe est négatif, plus la quantité de radical anion formée (donc d'inhibiteur) est importante. Or, dans le cas d'une inhibition de nature dynamique et selon la relation de Stern-Volmer, la durée de vie de fluorescence apparente est inversement proportionnelle à la concentration en inhibiteur.

Dans la suite, la relation entre durée de vie et potentiel appliqué à la pointe est formalisée plus précisément, l'objectif étant de vérifier si un modèle d'inhibition dynamique simple peut être ajusté sur les données collectées au cours de cette expérience.

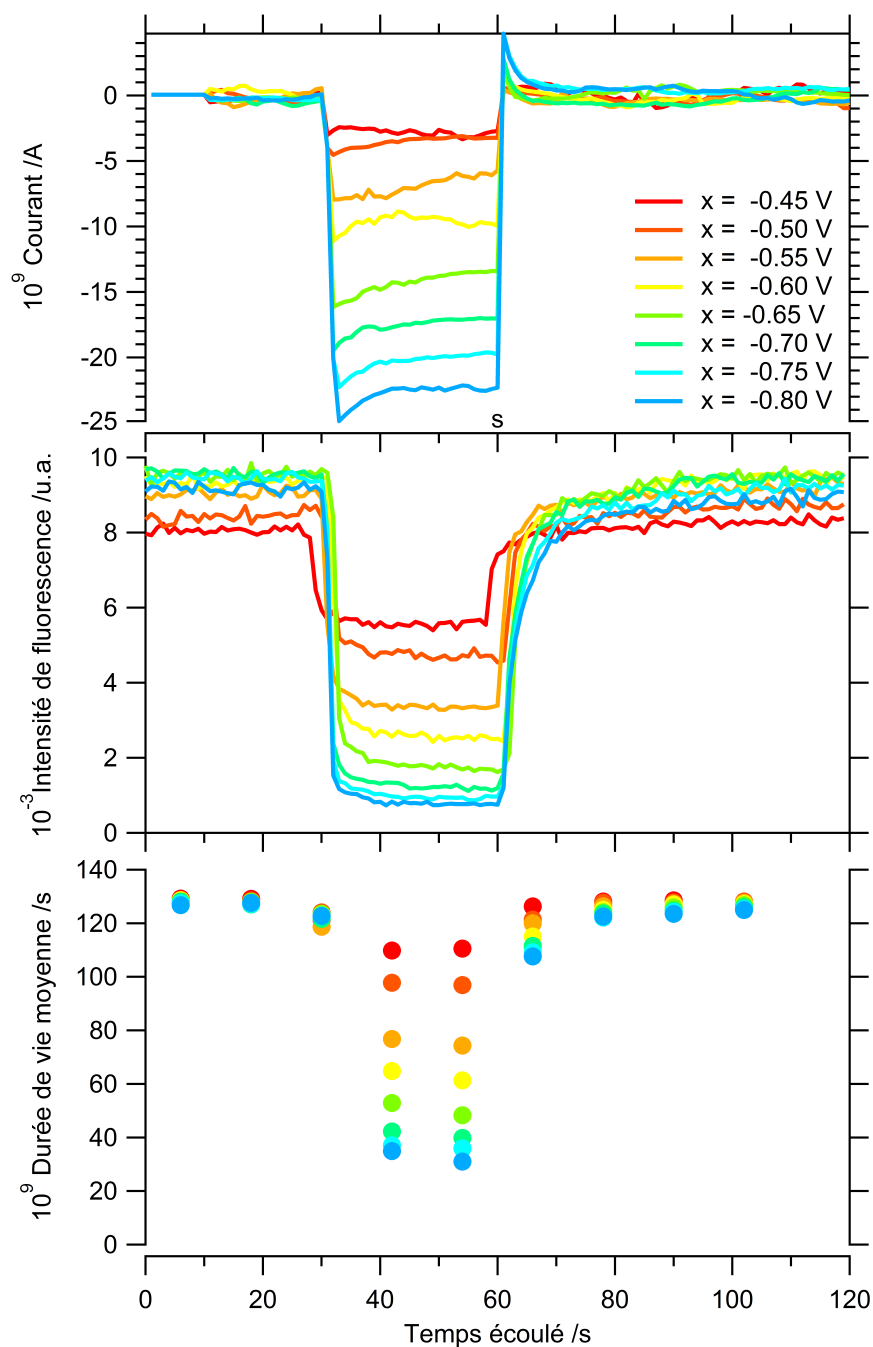


FIGURE 5.2 – Représentation graphique de l'évolution au cours du temps (en haut) des courants de pointe, (au milieu) de l'intensité de fluorescence et (en bas) de la durée de vie de fluorescence lors de l'application à la pointe de la séquence en potentiel décrite dans le Tableau 5.1, à savoir : PCO (10 s), 0 V (20 s), x V (30 s), 0 V (30 s).

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

5.3.2 Modélisation du mécanisme d'inhibition par un mécanisme d'inhibition dynamique simple

Expression de l'équation de Stern Volmer pour la durée de vie en fonction de la charge coulombienne D'après le paragraphe 1.3.4, il existe une relation affine entre le rapport adimensionné de la durée de vie en l'absence d'inhibiteur τ_F avec la durée de vie apparente τ en présence d'inhibiteur à la concentration $[Q]$ et cette même concentration. Il s'agit de la relation de Stern-Volmer :

$$\frac{\tau_F}{\tau} = 1 + k_q \tau_F [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (5.3)$$

Dans cette expression, k_q est la constante associée au taux de désexcitation par interaction avec l'inhibiteur, τ_F la durée de vie du fluorophore en l'absence d'inhibiteur et K_{SV} la constante de Stern-Volmer.

Dans la configuration étudiée ici, l'inhibiteur – le radical anion – est formé électrochimiquement à partir du fluorophore inhibé – la tétrazine – à l'aide de la pointe SECM. De plus, le nombre d'électrons échangés est de 1. La quantité d'inhibiteur en solution est donc directement égale au nombre d'électrons ayant traversé le circuit. De ce fait, la relation suivante est théoriquement vérifiée :

$$[Q] = \frac{n_Q}{V} = \frac{n_{e^-}}{V} \quad (5.4)$$

Avec n_Q le nombre total de moles d'inhibiteur formé, V le volume de solution dans lequel sont contenues les n_Q moles d'inhibiteur. n_{e^-} est le nombre de moles d'électrons échangées avec la microélectrode.

Or, on a :

$$n_{e^-} = \frac{Q_C}{F} \quad (5.5)$$

où Q_C est la charge coulombienne ayant traversé le circuit et F la constante de Faraday (égale à la charge d'une mole d'électrons).

L'équation de Stern-Volmer se réécrit donc en fonction de la charge coulombienne :

$$\frac{\tau_F}{\tau} = 1 + k_q \tau_F \frac{Q_C}{FV} = 1 + K_{SV} \frac{Q_C}{FV} \quad (5.6)$$

De la même façon qu'avec la concentration, la relation entre le rapport des durées de vie $\frac{\tau_0}{\tau}$ et la charge doit être une relation affine.

Dans la suite, les objectifs sont donc :

- d'évaluer la charge coulombienne et le rapport τ_F/τ pour les différents potentiels de réduction appliqués à la pointe ;
- de vérifier s'il est possible d'ajuster numériquement une fonction affine sur la représentation graphique du rapport $\frac{\tau_F}{\tau}$ en fonction de la charge établie à partir des données expérimentales. Un bon ajustement doit permettre de conclure à l'existence d'un mécanisme d'inhibition dynamique et d'évaluer la constante de Stern Volmer.

Détermination de la charge coulombienne en fonction du potentiel de réduction appliqué à la pointe D'une façon générale, la charge coulombienne est obtenue par intégration de la courbe de courant en fonction du temps écoulé. Dans la suite,

on cherche donc à déterminer la valeur de la charge à partir des courbes du courant mesuré au cours du temps obtenues pour les différentes valeurs du potentiel appliqué à la pointe (représentées sur la Figure 5.2 en haut).

Sur chacune de ces courbes, il apparaît clairement que, lors de l'application du potentiel de réduction, le système passe par deux phases successives :

- un régime transitoire. Ce régime est très bref. Un tel comportement est effectivement celui attendu pour une ultramicroélectrode. Durant cette phase, le courant évolue rapidement depuis une valeur nulle jusqu'à atteindre une valeur constante dépendant de la valeur du potentiel appliqué.
- un régime stationnaire de diffusion. Durant cette phase, le courant ne varie plus.

La charge coulombienne ayant traversé le circuit lors du régime transitoire correspond à la charge qui a été nécessaire pour l'établissement de la demi-sphère de diffusion autour de la pointe. La charge utilisée ensuite a permis uniquement le maintien de cette demi-sphère de diffusion et celui du courant à sa valeur stationnaire. Or, la part de la charge coulombienne qui doit évoluer linéairement avec le rapport des durées de vie tel que démontré dans la relation 5.6 (voir le paragraphe précédent) doit être celle ayant permis l'établissement de la sphère de diffusion (si le volume de la zone d'excitation de la diode laser est égale à la sphère de diffusion de la pointe).

Une façon d'estimer la valeur de la charge doit donc être, pour chaque potentiel, d'intégrer la courbe de courant correspondante entre le temps t_1 tel que I est encore égal à 0 A et le temps t_2 tel que I atteigne sa valeur stationnaire. Toutefois, la résolution du potentiostat est trop faible pour obtenir une valeur d'intégrale correcte.

Une autre possibilité est d'utiliser directement l'expression du courant traversant une microélectrode telle qu'elle a été rappelée dans la section 1.2.2. Ce courant est la somme d'un terme dépendant du temps, correspondant au régime transitoire, et d'un terme constant, correspondant au régime stationnaire :

$$i(t, V) = -nFAJ_{Ox}(r_0, t) = 4\pi nr_0^2 FD(C_{Ox}^{sol} - C_{Ox}^{el}(V)) \left[\frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} + \frac{1}{r_0} \right] \quad (5.7)$$

où V est le potentiel appliqué à l'électrode.

Ainsi, $A(V) = 4\pi nr_0^2 FD(C_{Ox}^{sol} - C_{Ox}^{el}(V))$ ne dépend que du potentiel et le courant associé au régime stationnaire s'exprime :

$$I_{stationnaire}(V) = \frac{A(V)}{r_0} \quad (5.8)$$

Les courants stationnaires $I_{stationnaire}(V)$ étant connus expérimentalement pour chaque potentiel de réduction appliqué à l'électrode (valeur des paliers) de même que le rayon r_0 de l'électrode, il est possible d'exprimer les constantes $A(V)$ exclusivement en fonction de données connues expérimentalement :

$$A(V) = I_{stationnaire}(V)r_0 \quad (5.9)$$

Ainsi, le courant transitoire $i_{transitoire}$ s'écrit :

$$i_{transitoire}(t, V) = \frac{I_{stationnaire}(V)r_0}{\sqrt{\pi Dt}} = \frac{dq_{transitoire}}{dt}(t, V) \quad (5.10)$$

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

En supposant la charge nulle à $t = 0$, la valeur de la charge transitoire $q_{transitoire}$, pour un potentiel appliqué à la pointe V, ayant traversé le circuit au bout d'un temps t s'écrit :

$$q_{transitoire}(t, V) = \frac{2I_{stationnaire}(V)r_0\sqrt{t}}{\sqrt{\pi D}} \quad (5.11)$$

Dans le cas des expériences décrites ici, le rayon de l'électrode mesure $r_0 = 12,5 \mu\text{m}$, le coefficient de diffusion de la chlorométhoxytétrazine dans l'acétonitrile peut être estimé à $D = 1,6 \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Expérimentalement, la forme des courbes de courant indique que le régime stationnaire est établi au bout d'un temps $t = 2 \text{s}$ environ.

Avec l'ensemble de ces valeurs, il est possible de calculer $q_{transitoire}$ comme une fonction du potentiel, en Coulomb :

$$q_{transitoire}(2, V) = 0,5 I_{stationnaire}(V) \quad (5.12)$$

où $I_{stationnaire}(V)$ est la valeur du courant en Ampère sur le palier lorsque le potentiel appliqué à la pointe est V. En pratique, la valeur de $I_{stationnaire}(V)$ est estimée comme étant égale à la valeur moyenne de $i(t)$ sur la période comprise entre $t = 30 \text{s}$ et $t = 60 \text{s}$, période pendant laquelle la pointe est polarisée négativement.

Dans la suite, la charge sera considérée en valeur absolue. Elle est représentée en fonction de la valeur du potentiel appliqué à la pointe entre $t = 30 \text{s}$ et $t = 60 \text{s}$ sur la Figure 5.3 en haut. On constate qu'elle est bien d'autant plus grande que le potentiel appliqué est négatif, c'est-à-dire qu'on forme d'autant plus de radical anion que le potentiel est faible.

Ajustement numérique des données expérimentales de la durée de vie en fonction de la charge avec une fonction affine Quant au rapport $\frac{\tau_F^0}{\tau}$, il est calculé pour chaque cinétique en prenant τ_F égal à la durée de vie moyenne initiale τ_0 mesurée au cours de cette cinétique lorsque le potentiel de pointe est de 0 V et τ égal à la durée de vie moyenne mesurée lorsque le potentiel est égal à x V au bout d'une durée de 50 secondes. La représentation graphique ainsi obtenue de $\frac{\tau_0}{\tau}$ en fonction de x est également reportée sur la Figure 5.3 en haut (triangles bleus). Comme attendu, ce rapport est d'autant plus grand – donc la durée de vie τ d'autant plus faible – que le potentiel appliqué est négatif (valeur de x).

Finalement, les points expérimentaux du rapport $\frac{\tau_0}{\tau}$ ainsi calculés sont représentés en fonction de la charge sur le graphe de la Figure 5.3 en bas. Cette courbe est ajustée numériquement avec une fonction affine du type :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = a + b \cdot Q_C \quad (5.13)$$

Q_C étant la charge coulombienne, a et b étant les paramètres à déterminer.

La régression linéaire donne finalement, avec un coefficient de corrélation relativement bon ($r^2 = 0,993517$) :

$$a = 0,73778 \quad (5.14)$$

$$b = 2,908410^8 \text{ C}^{-1} \quad (5.15)$$

À partir des valeurs de a et b , et par identification avec l'expression de Stern-Volmer en fonction de la charge déterminée dans le paragraphe précédent, il est possible d'estimer les valeurs de k_Q et K_{SV} :

$$a = 1 \quad (5.16)$$

$$b = \frac{k_q \tau_0}{FV} = \frac{K_{SV}}{FV} \quad (5.17)$$

Le volume impacté par la microélectrode de 25 μm de diamètre est estimé de l'ordre de grandeur d'un cube de 30 μm de côté. Dans ce cas, V est égal à $2,7 \cdot 10^{-14} \text{ m}^3$ soit $2,7 \cdot 10^{-11} \text{ L}$.

La constante de Faraday est égale à $96500 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$.

τ_0 est prise égale à la durée de vie moyenne mesurée lorsque le potentiel appliqué est de 0 V c'est-à-dire $\tau_0 = 130 \text{ ns}$.

On trouve $k_q = 5,8 \cdot 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et $K_{SV} = 7,6 \cdot 10^2 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

La constante est de l'ordre de grandeur des valeurs du tableau de la Figure 1.10.

À ce stade, les données de durées de vie ont permis de conclure à l'existence d'un mécanisme d'inhibition dynamique de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion associé. Dans la suite sont analysées les données d'intensité de fluorescence. Ces dernières constituent un complément d'information puisqu'elles peuvent indiquer si l'inhibition s'explique effectivement par un mécanisme dynamique simple ou si le mécanisme est en réalité plus complexe.

Expression de l'équation de Stern-Volmer pour l'intensité de fluorescence en fonction de la charge coulombienne Dans le cas d'un simple mécanisme d'inhibition dynamique : le rapport de l'intensité de fluorescence en l'absence d'inhibiteur et de l'intensité de fluorescence en présence d'inhibiteur à la concentration $[Q]$ devrait également être linéaire avec la charge coulombienne.

$$\frac{I_F}{I} = \frac{\tau_0 F}{\tau} = 1 + k_q \tau_F \frac{Q_C}{FV} = 1 + K_{SV} \frac{Q_C}{FV} \quad (5.18)$$

avec I_F l'intensité de fluorescence en l'absence d'inhibiteur et I l'intensité de fluorescence en présence d'une concentration $[Q]$ d'inhibiteur associée à une valeur Q_C de la charge coulombienne.

Il s'agit donc, comme pour la durée de vie, d'estimer le rapport $\frac{I_F}{I}$ et la charge pour chaque potentiel de réduction appliqué à la pointe, puis d'ajuster numériquement un modèle affine sur les données expérimentales du rapport $\frac{I_F}{I}$ en fonction de la charge.

Ajustement numérique des données expérimentales d'intensité de fluorescence en fonction de la charge avec une fonction affine Pour chaque potentiel appliqué à la pointe, l'intensité de fluorescence I_F est évaluée comme l'intensité de fluorescence mesurée entre 23 et 28 secondes I_0 (lorsque le potentiel appliqué à la pointe est de 0 V) tandis que l'intensité de fluorescence I est évaluée comme étant l'intensité de fluorescence moyenne mesurée entre 55 et 58 secondes. La charge coulombienne a quant à elle été déterminée précédemment à partir de l'étude du régime transitoire.

La représentation graphique du rapport $\frac{I_0}{I}$ ainsi calculé en fonction de la charge est reportée sur le graphe de la Figure 5.3. La courbe obtenue ne semble cependant

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

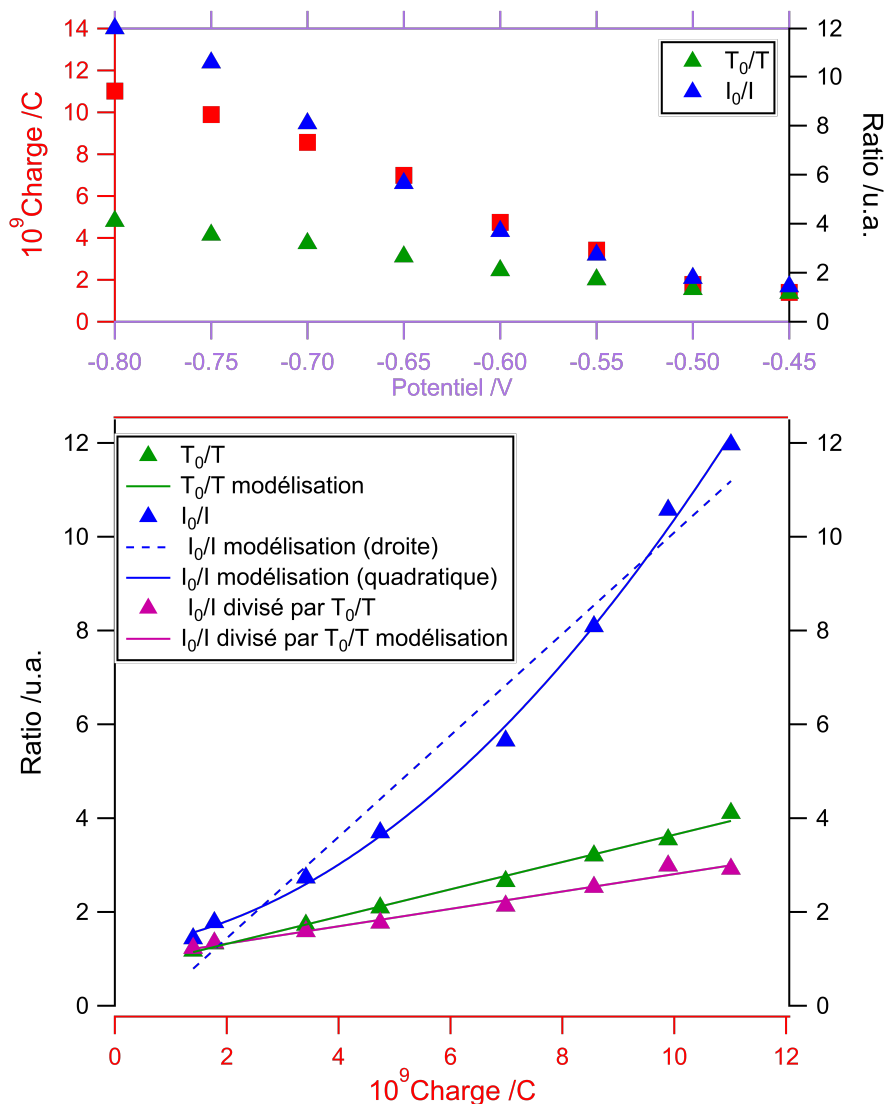


FIGURE 5.3 – En haut : représentation de la charge (carré rouge, axe de gauche), du rapport de l'intensité initiale sur l'intensité lors de la polarisation de la pointe I_0/I (triangles bleus, axe de droite) et du rapport de la durée de vie initiale sur la durée de vie lors de la polarisation de la microélectrode τ_0/τ (triangles verts, axe de droite) en fonction du potentiel appliqué à la microélectrode. En bas : représentation des rapports expérimentaux I_0/I , τ_0/τ et I_0/I divisé par τ_0/τ en fonction de la charge, ainsi que leurs ajustements numériques

pas affine, comme le prévoirait pourant la théorie dans la cas d'une inhibition dynamique simple. Cette impression est confirmée par la tentative de régression linéaire selon l'expression :

$$\frac{I_0}{I} = a' + b' \cdot Q_C \quad (5.19)$$

En effet, le coefficient de corrélation associé à cet ajustement numérique est de $r^2 = 0,966289$ avec des valeurs pour a' et b' respectives de $0,72482$ et $1,0815 \cdot 10^9 \text{ C}^{-1}$.

Dans la suite, un mécanisme d'inhibition plus complexe, impliquant à la fois une inhibition dynamique et une inhibition statique, est envisagé afin d'expliquer l'évolution de l'intensité de fluorescence avec la quantité d'inhibiteur.

5.3.3 Modélisation du mécanisme d'inhibition par un couplage entre inhibition dynamique et inhibition statique

Comme vu dans la partie 1.3.4, l'existence d'une inhibition statique n'a pas d'influence sur l'état excité du fluorophore : la concentration en inhibiteur statique ne modifie donc pas la valeur apparente de la durée de vie de fluorescence. Dans le cas d'une molécule pouvant jouer à la fois le rôle d'inhibiteur dynamique et d'inhibiteur statique, l'expression de l'équation de Stern-Volmer liant la concentration en inhibiteur $[Q]$ au rapport des durées de vie $\frac{\tau_F}{\tau}$ reste inchangée par rapport à celle obtenue dans le cadre d'un modèle d'inhibition dynamique simple. Il en va de même pour celle reliant le rapport des durées de vie à la charge coulombienne.

L'intensité de fluorescence est par ailleurs modifiée : la concentration en espèce émettrice diminue avec la concentration en inhibiteur statique.

Expression de l'équation de Stern-Volmer pour l'intensité de fluorescence en fonction de la charge coulombienne D'après le paragraphe 1.3.4, l'équation de Stern-Volmer pour l'intensité dans le cas d'une double inhibition statique et dynamique devient :

$$\frac{I_F}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_S[Q]) = 1 + (K_{SV} + K_S)[Q] + K_{SV}K_S[Q]^2 \quad (5.20)$$

Comme précédemment, la concentration en inhibiteur – le radical anion – peut s'exprimer dans le cas étudié ici en fonction de la charge, ce qui permet d'écrire le rapport des intensités de fluorescence de la façon suivante :

$$\frac{I_F}{I} = 1 + \frac{K_{SV} + K_S}{VF} Q_C + \frac{K_{SV}K_S}{(VF)^2} Q_C^2 \quad (5.21)$$

Ainsi, dans un mécanisme couplant inhibition statique et inhibition dynamique, la relation entre le rapport des intensités de fluorescence et la charge coulombienne est quadratique alors que, dans un mécanisme de type inhibition dynamique, la relation était affine.

Ajustement numérique des données expérimentales d'intensité de fluorescence en fonction de la charge avec une fonction quadratique Afin de vérifier si les données expérimentales du rapport des intensités de fluorescence en fonction de la charge suivent mieux une relation quadratique, l'ajustement numérique est fait, dans un premier temps, avec une fonction polynomiale de degré 2, sans contrainte

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

supplémentaire. Le résultat d'une telle modélisation est reportée sur la Figure 5.3. Il apparaît une relativement bonne corrélation entre les données et la fonction.

Dans la suite, il s'agit de déterminer un ordre de grandeur de la constante d'inhibition statique K_S , sachant qu'on connaît celle de Stern-Volmer K_{SV} . La relation considérée est donc la suivante :

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau}(Q_C) \cdot \left(1 + \frac{K_S}{FV}Q_C\right) \quad (5.22)$$

Plusieurs possibilités d'ajustement numériques sont envisageables.

- la première stratégie consiste à ajuster, sur les données expérimentales du rapport $\frac{I_0}{I}$ en fonction de la charge, un modèle quadratique de la forme :

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau}(Q_C) \cdot (a'' + b'' * Q_C) \quad (5.23)$$

avec a'' et b'' les paramètres d'ajustement. En guise de rapport $\frac{\tau_0}{\tau}$, il paraît judicieux d'utiliser l'expression de la droite affine déterminée précédemment.

- la deuxième stratégie consiste à se ramener à une droite en divisant préalablement les données expérimentales du rapport $\frac{I_0}{I}$ par $\frac{\tau_0}{\tau}$, puis à utiliser un modèle de la forme $(a'' + b''Q_C)$ pour modéliser $\left(1 + \frac{K_S}{FV}Q_C\right)$, a'' et b'' étant les paramètres d'ajustement :

$$\frac{\frac{I_0}{I}}{\frac{\tau_0}{\tau}} = a'' + b''Q_C \quad (5.24)$$

Cette stratégie présente l'avantage d'obtenir un coefficient de corrélation qui peut être comparé à celui obtenu par régression linéaire des données expérimentales de $\frac{I_0}{I}$ en fonction de la charge. En guise de rapport $\frac{\tau_0}{\tau}$, les points expérimentaux peuvent être directement utilisés. Les valeurs numériques de la droite affine modélisant le rapport peuvent l'être également.

À partir de b'' , K_S est déterminé de la façon suivante :

$$K_S = b''FV \quad (5.25)$$

avec F la constante de Faraday et V le volume de solution considéré.

Comme précédemment, $F = 96\,500 \text{ C.mol}^{-1}$ et $V = 2,7 \cdot 10^{-11} \text{ L}$.

Dans le tableau 5.2 sont reportées les valeurs de K_S déterminées avec les différentes stratégies ainsi que l'évaluation des erreurs associées. De plus, la droite résultant de l'ajustement numérique réalisé avec la méthode 2 (division préalable par les valeurs expérimentales du rapport $\frac{\tau_0}{\tau}$) est reporté en bas de la Figure 5.3 (droite violette).

Les coefficients de corrélation pour les méthodes 2 et 3 sont meilleurs que ceux obtenus lors de l'ajustement numérique du rapport $\frac{I_0}{I}$ en fonction de la charge ($r^2 = 0,966289$). De plus, l'ajustement sur la Figure 5.3 semble visuellement être en bonne adéquation avec les points expérimentaux. Les trois méthodes aboutissent à une estimation de la constante de complexation entre la tétrazine neutre et le radical anion K_S de l'ordre de $5 \cdot 10^2$.

Les données expérimentales tendent donc à prouver l'existence d'un mécanisme d'inhibition de type statique. Ce type de mécanisme sous-entend l'association favorable entre une tétrazine neutre dans son état fondamental et un radical anion. Afin

modèle utilisé	a''	b'' (C ⁻¹)	K _S	r ² ou χ ²
$\frac{\tau_0}{\tau}(a'' + b'' * C)$	0,82924	2.0066 10 ⁸	523	0,587298
$a'' + b'' Q_C$ (div. préalable par valeurs exp. de $\frac{\tau_0}{\tau}$)	0,95227	1,8527 10 ⁸	483	0,979701
$a'' + b'' Q_C$ (div. préalable par valeurs théori. de $\frac{\tau_0}{\tau}$)	0,96395	1,8364 10 ⁸	479	0,971951

TABLEAU 5.2 – Résultat des ajustements numériques pour la détermination de la constante d'inhibition statique K_S : modèle utilisé, valeurs déterminées pour les paramètres d'ajustement a'' et b'', calcul de K_S et r² ou χ².

de vérifier si cette association est effectivement favorable, des calculs de DFT sur des dimères de tétrazines neutres, réduits ou doublement réduits sont mis en œuvre.

5.3.4 Etude de l'inhibition statique par chimie computationnelle

Stratégie de calcul

L'inhibition statique résulte de l'interaction entre une molécule de fluorophore dans son état fondamental et une molécule d'inhibiteur.

Afin d'étudier si l'interaction entre une molécule de tétrazine neutre et une molécule de radical anion est effectivement favorable, des calculs de DFT sont mis en œuvre sur le dimère [Tz – Tz[•]]⁻. Le dimère formé par deux molécules neutres [Tz – Tz] et celui formé par deux molécules réduites [Tz[•] – Tz[•]]²⁻ doivent servir de composés modèles.

La difficulté réside dans la prise en compte des interactions intermoléculaires, ce qui est une faiblesse connue de la DFT.

Pour cela, quatre fonctionnelles différentes sont utilisées :

- B3LYP qui est la fonctionnelle la plus utilisée pour les composés organiques. Elle est cependant peu adaptée à l'étude de complexe supramoléculaires.
- cam-B3LYP dont l'objectif est de corriger les déficiences de la première à longue distance.
- wb97xd [15] et APFD [6] sont des fonctionnelles mises au point pour contrer les effets à longues distances. De plus, leurs auteurs ont rajouté un terme de corrélation permettant de simuler la dispersion (les interactions de London). La fonctionnelle APFD est la plus récente.

Dans un premier temps, les géométries des dimères sont optimisées et un calcul des fréquences est mis en œuvre. Puis, les niveaux d'énergie sont calculés à partir des géométries optimisées avec ou sans BSSE. Enfin, les calculs d'optimisation de la géométrie et des fréquences sont réitérés à partir des dernières structures obtenues en prenant en compte la correction BSSE, l'objectif étant de vérifier que les structures précédemment obtenues sans la correction sont correctes.

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

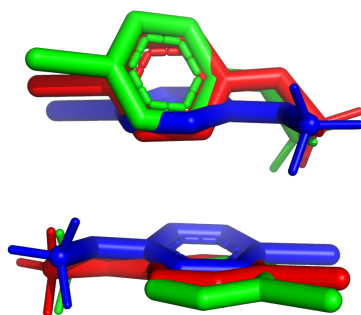


FIGURE 5.4 – Géométries des complexes $[Tz - Tz]$ optimisées avec trois méthodes différentes (vert : B3LYP; rouge : cam-B3LYP; bleu : APFD) dans la base 6-31+g(d)

méthode	angle ($^{\circ}$)
B3LYP	63,9
cam-B3LYP	63,8
APFD	7,3

TABLEAU 5.3 – Pour chaque géométrie optimisée de la Figure 5.4, valeur de l'angle formé par l'intersection des deux plans contenant chacun un des membres du dimère $[Tz - Tz]$.

Étude du dimère $[Tz - Tz]$ (deux tétrazines neutres)

Optimisation de la géométrie et calcul des fréquences Dans un premier temps sont mis en œuvre des calculs d'optimisation de géométrie. Les calculs sont réalisés en parallèle avec trois fonctionnelles : B3LYP, cam-B3LYP et APFD, dans la base 6-31+g(d). Les fréquences calculées sont systématiquement négatives : les géométries obtenues correspondent à des minima d'énergie.

Sur la Figure 5.4 sont reportées les géométries obtenues avec les trois méthodes de calcul. Celle obtenue avec la fonctionnelle B3LYP est représentée en vert, celle obtenue avec cam-B3LYP en rouge et celle obtenue avec APFD en bleu. Dans le tableau 5.3 sont reportés les angles mesurés entre les plans contenant chacun une des molécules du dimère dans chacune de ces géométries.

Calcul des énergies et des orbitales moléculaires À partir des géométries optimisées ci-dessus, des calculs d'énergie sont mis en œuvre. Ainsi, la géométrie précédemment optimisée avec cam-B3LYP est utilisée pour le calcul d'énergie avec les fonctionnelles B3LYP et wb97xd. Celui-ci est effectué dans la base 6-311+g(d,p). L'énergie de la géométrie issue de l'optimisation avec la fonctionnelle APFD est quant à elle calculée avec cette même fonctionnelle. Le calcul est également fait dans la base 6-311+g(d,p). Dans le tableau 5.4 sont reportées les valeurs obtenues avec ces trois fonctionnelles, avec et sans correction BSSE.

La méthode BSSE permet, en outre, de calculer des énergies de complexation qui sont reportées dans le tableau 5.5 pour les trois fonctionnelles B3LYP, wb97xd et

méthode	énergie (Hartree)	énergie BSSE (Hartree)
B3LYP	-1740,8266615	-1740,823779881898
wb97xd	-1740,861406	-1740,858283689479
APFD	-1740,2887145	-1740,283506341494

TABLEAU 5.4 – Énergies calculées pour le dimère $[Tz - Tz]$ à partir de géométries préalablement optimisées avec trois fonctionnelles différentes : B3LYP, wb97xd et APFD dans la base 6-311+g(d,p).

méthode	énergie de complexation (kcal/mol)
B3LYP	-3,45
wb97xd	-7,47
APFD	-8,07

TABLEAU 5.5 – Énergies de complexation du dimère $[Tz - Tz]$ composé de deux tétrazines neutres en kcal/mol évaluées à l'aide des trois fonctionnelles B3LYP, wb97xd et APFD

APFD utilisées. Les énergies ainsi calculées sont négatives, ce qui est le signe d'une interaction favorable.

Sur la Figure 5.5 sont dessinées les orbitales moléculaires du complexe $[Tz - Tz]$, composé de deux tétrazines neutres, obtenues avec la fonctionnelle APFD dans la base 6-311+g(d,p). Le diagramme énergétique associé à ces orbitales moléculaires est représenté sur la Figure 5.6. Pour comparaison, le diagramme orbitalaire de la chlorométhoxytétrazine seul a été présenté dans le chapitre 1 (Figure 1.20). Sur ce diagramme, il avait été remarqué que l'orbitale la plus haute occupée, notée HO, était une orbitale de type n alors que l'orbitale HO-1 était plutôt de nature π . L'objectif est ici de comprendre comment évolue ces orbitales au sein du dimère. En premier lieu, au niveau énergétique, on constate que les orbitales HO-3 et HO-2 du dimères sont quasiment dégénérées. Il en va de même pour les orbitales notées HO-1 et HO, ou encore pour celles notées BV et BV+1.

Si on regarde la densité de probabilité associée à chacune de ces paires d'orbitales, il apparaît que HO et HO-1 du dimère, anciennement orbitales HO des deux tétrazines (de nature n), restent totalement localisées sur l'un ou l'autre membre du dimère. Les orbitales HO-3 et HO-2 du dimères, anciennes orbitales HO-1 de chaque tétrazine (de nature π) sont, quant à elles, légèrement délocalisées sur le deuxième membre du dimère conduisant à une légère interaction liante. Enfin, les orbitales BV et BV+1 du dimère, anciennes orbitales BV de chacune des tétrazines sont également légèrement délocalisées.

Étude du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^-$ (une tétrazine neutre et un radical anion)

Optimisation de la géométrie et calcul des fréquences Dans ce cas également, le calcul d'optimisation de la géométrie du dimère est effectué dans la base 6-31+g(d) à l'aide des trois fonctionnelles suivantes : B3LYP, cam-B3LYP et APFD avec le formalisme unrestricted.

Seules les approches B3LYP et APFD ont convergé. Les géométries correspondantes sont représentées sur la Figure 5.7. Les molécules représentées en rouge correspondent à la géométrie optimisée avec B3LYP, celles en vert à celle optimisée avec

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

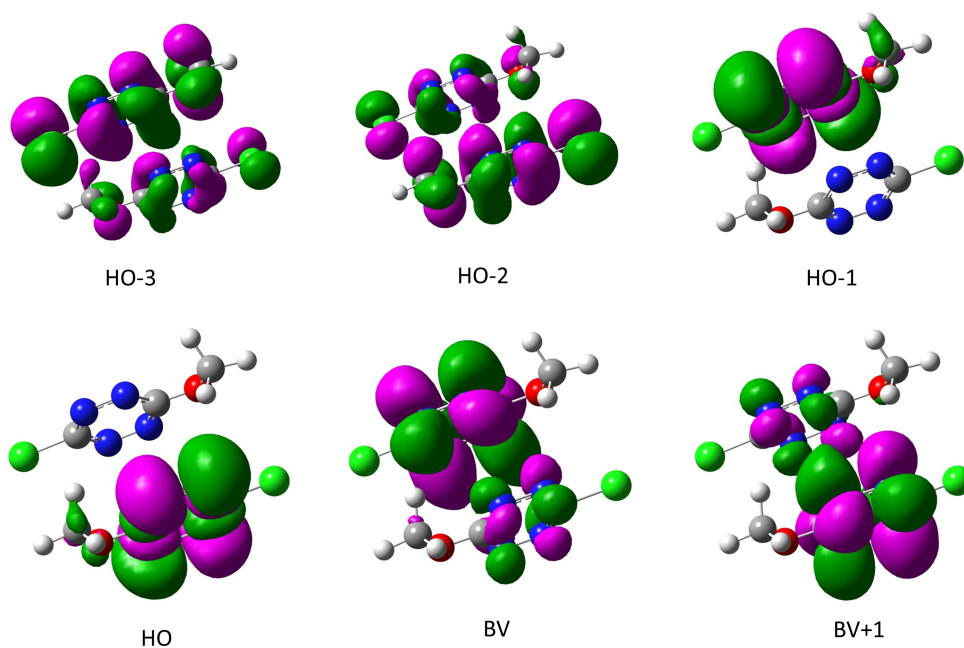


FIGURE 5.5 – Orbitales moléculaires du dimère $[Tz - Tz]$, composé de deux tétrazines neutres, obtenues dans la base $6 - 311 + g(d, p)$ avec la fonctionnelle APFD. HO : orbitale la plus haute occupée, BV : orbitale la plus basse vacante.

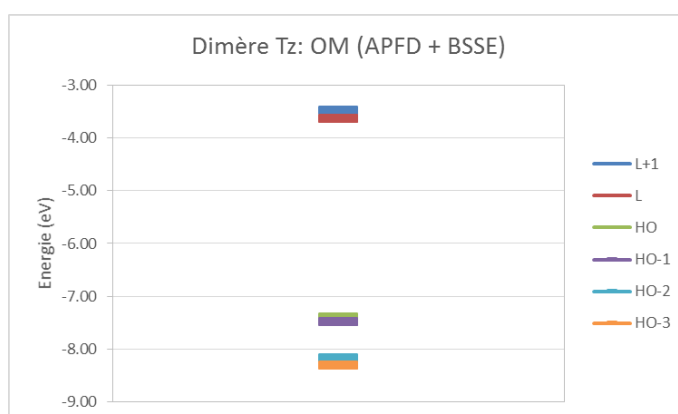


FIGURE 5.6 – Diagramme énergétique des orbitales moléculaires du complexe Tz-Tz neutre issu du calcul APFD. HO : orbitale la plus haute occupée, L : orbitale la plus basse vacante.

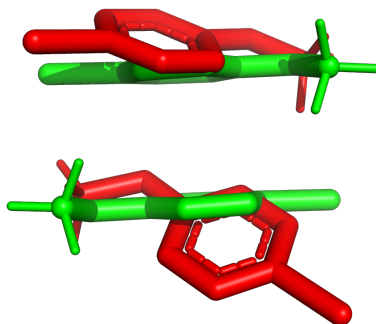


FIGURE 5.7 – Géométries des complexes $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ optimisées avec deux méthodes différentes dans la base 6-31+g(d) (rouge : B3LYP; vert : APFD)

méthode	angle (°)
B3LYP	22,8
APFD	1,4

TABLEAU 5.6 – Pour chaque géométrie optimisée de la Figure 5.7, valeur de l'angle formé par l'intersection des deux plans contenant chacun un des membres du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$.

APFD. L'angle formé par les deux plans contenant chacun une des deux molécules du dimère est reporté dans le Tableau 5.6.

Dans le cas du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ également, l'angle entre les deux plans obtenu avec la fonctionnelle APFD est très inférieur à celui obtenu avec B3LYP. Il est à noter que pour une fonctionnelle donnée, l'angle est plus faible pour le dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ que pour le dimère $[Tz - Tz]$. Les molécules sont donc plus "parallèles" dans le cas du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$, traduisant peut-être des interactions de π -stacking plus importantes.

Calcul des énergies et des orbitales moléculaires À partir des géométries précédemment optimisées du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$, des calculs d'énergie sont effectués dans la base 6-311+g(d,p). Pour cela, les fonctionnelles B3LYP et wb97xd sont utilisées sur la géométrie optimisée avec B3LYP, tandis que la fonctionnelle APFD est utilisée sur la géométrie également optimisée avec APFD. Pour les trois fonctionnelles, les résultats obtenus avec et sans correction BSSE sont reportés dans le Tableau 5.7.

méthode	énergie (Hartree)	énergie BSSE (Hartree)
B3LYP	-1740,9035248	-1740,900750328968
wb97xd	-1740,9340785	-1740,931147209505
APFD	-1740,3765701	-1740,371282416949

TABLEAU 5.7 – Énergies calculées pour le dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ à partir de géométries préalablement optimisées avec trois fonctionnelles différentes : B3LYP, wb97xd et APFD dans la base 6-311+g(d,p).

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

méthode	énergie de complexation (kcal/mol)
B3LYP	-11,55
wb97xd	-14,97
APFD	-25,43

TABLEAU 5.8 – Énergies de complexation du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ composé de deux tétrazines neutres en kcal/mol évaluées à l'aide des trois fonctionnelles B3LYP, wb97xd et APFD

De la même façon que pour le dimère $[Tz - Tz]$, la méthode BSSE permet de calculer des énergies de complexation. Dans le Tableau 5.8 sont reportées les énergies de complexation calculées avec chacune des trois fonctionnelles utilisées : B3LYP, wb97xd et APFD. Quelle que soit la méthode, l'énergie de complexation est toujours trouvée négative. La formation du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ est donc favorable. De plus, ces énergies de complexation calculées avec les trois fonctionnelles pour le dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ sont à comparer avec celles calculées avec les trois mêmes fonctionnelles pour le dimère $[Tz - Tz]$ (voir le Tableau 5.5). Ainsi, pour une fonctionnelle donnée, l'énergie de complexation est plus négative dans le cas du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ que dans celui du dimère $[Tz - Tz]$. La formation du dimère est donc plus favorable entre une tétrazine neutre et une tétrazine réduite qu'entre deux tétrazines neutres.

La stabilisation par interaction entre les deux molécules est particulièrement visible sur la représentation des orbitales moléculaires de la Figure 5.8 et sur celle de la densité de spin de la Figure 5.9 puisque cette dernière est parfaitement partagée par les deux tétrazines. La SOMO est complètement délocalisée sur les deux membres du dimère et la probabilité de présence est très importante entre les deux tétrazines. Globalement, l'ensemble des orbitales du dimère ont perdu leur caractère moléculaire, ce qui se traduit sur le diagramme énergétique de la Figure 5.10 par des orbitales non dégénérées.

Étude du dimère $[Tz^{\bullet} - Tz^{\bullet}]^{2-}$ (deux radicaux anions)

Dans ce cas, aucune des approches utilisées précédemment n'a permis d'atteindre une géométrie favorable à la formation d'un dimère stable.

Conclusion des calculs de chimie quantique

Au vu du résultat des calculs, la formation d'un dimère à partir de deux tétrazines neutres semble légèrement favorable. L'énergie d'interaction reste cependant faible. Elle se fait par l'intermédiaire d'interactions $\pi - \pi$. La formation du dimère composé d'une tétrazine réduite et d'une tétrazine neutre est également favorable, l'énergie d'association est plus forte que pour le dimère neutre. De plus, le calcul des orbitales moléculaires met en évidence une véritable interaction entre les deux membres du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ (perte du caractère moléculaire des orbitales).

Ainsi, dans le cadre du couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique, ces calculs soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition observée lors de l'utilisation de la chlorométhoxytétrazine en tant que sonde est non seulement de nature dynamique mais également de nature statique. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible que, dans les conditions de l'expérience (lorsque la pointe est polarisée négativement), une tétrazine neutre est probablement entourée

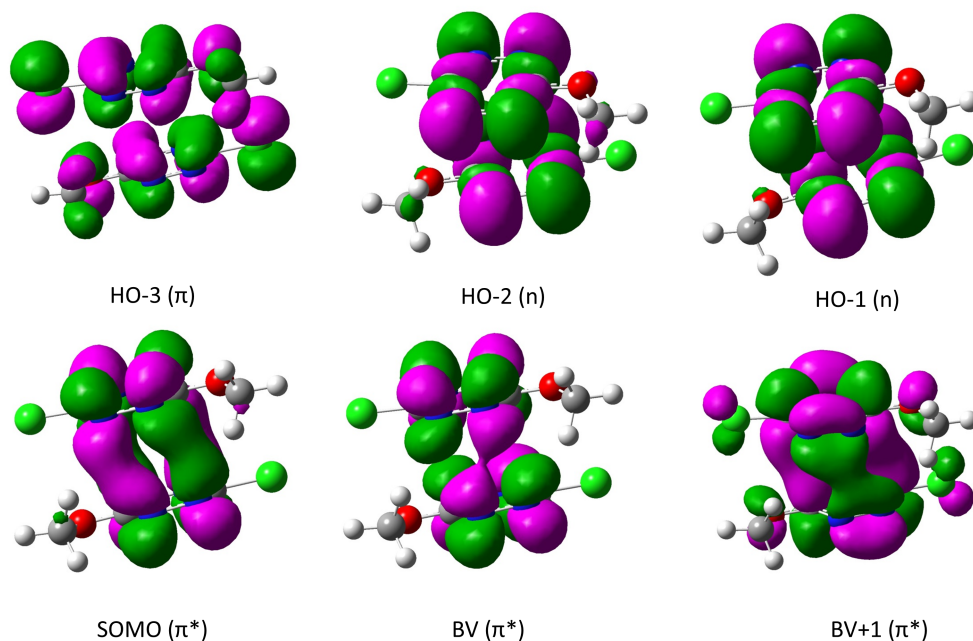


FIGURE 5.8 – Orbitales moléculaires du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$, composé d'une tétrazine neutre et d'un radical anion, obtenues dans la base 6-311+g(d,p) avec la fonctionnelle APFD. HO : orbitale la plus haute occupée, BV : orbitale la plus basse vacante.

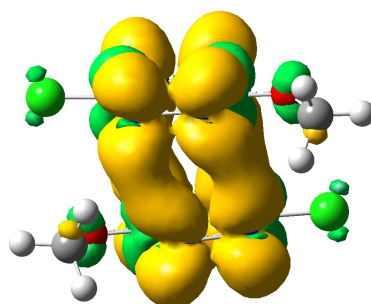


FIGURE 5.9 – Densité de spin (APFD/6-311+g(d,p)) du dimère $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

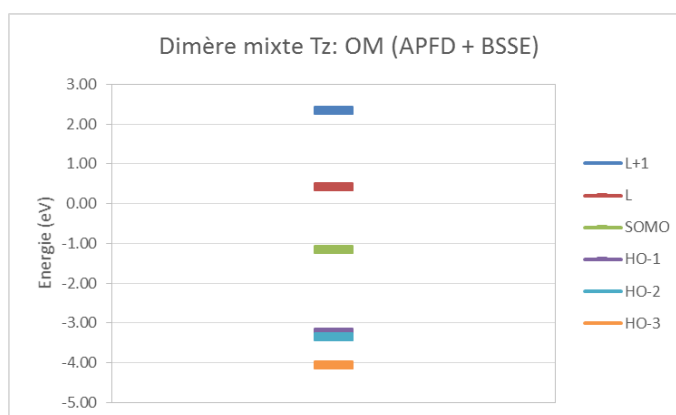


FIGURE 5.10 – Diagramme énergétique des orbitales moléculaires du complexe $[Tz - Tz^{\bullet}]^{-}$ issu du calcul APFD. HO : orbitale la plus haute occupée, L : orbitale la plus basse vacante.

d'un grand nombre de radicaux anions, conditions favorables à un tel mécanisme d'inhibition [96].

5.3.5 Discussion sur la qualité de l'évaluation de la durée de vie

L'étude mécanistique précédente a été faite en évaluant les durées de vie par le calcul de la moyenne (approche discrète). Comme décrit dans la partie 5.2.1, cette évaluation peut être biaisée dans deux cas principaux :

- Il y a sous-estimation de la durée de vie lorsque le déclin est long, ce qui est le cas avec le fluorophore utilisé ici puisque la chlorométhoxytétrazine présente une durée de vie longue : elle est donnée dans la littérature comme étant environ égale à 160 ns. Or, l'évaluation par la moyenne en l'absence d'inhibiteur (à un potentiel de pointe de 0 V) donne, dans les expériences décrites ci-dessus, une valeur plus proche de 130 ns. La valeur de la durée de vie semble donc effectivement sous-estimée.
- Il y a surestimation de la durée de vie lorsque le nombre de photons n'est pas suffisant. Or, quand la pointe est polarisée négativement, le radical anion est généré (donc la quantité de tétrazine émettrice diminue) et ce radical inhibe la fluorescence. Ce double effet de la pointe engendre nécessairement une quantité très faible de photons. Il est donc possible que la durée de vie soit au contraire surestimée dans les phases de réduction.

Afin d'estimer l'erreur faite sur l'évaluation de la durée de vie selon le potentiel de la pointe et donc sur la valeur de la constante de Stern-Volmer, il paraissait intéressant d'étudier les déclins exponentiels pour pouvoir calculer d'une autre façon les durées de vie et ainsi comparer les deux méthodes.

Analyse des déclins

Les histogrammes de déclins sont construits à partir des photons collectés sur les paliers bas des chronofluorogrammes, lorsque la pointe est polarisée négativement (voir Figure 5.2, milieu), en faisant attention à ne considérer que le régime stationnaire. L'intervalle est cependant choisi suffisamment large pour travailler avec un

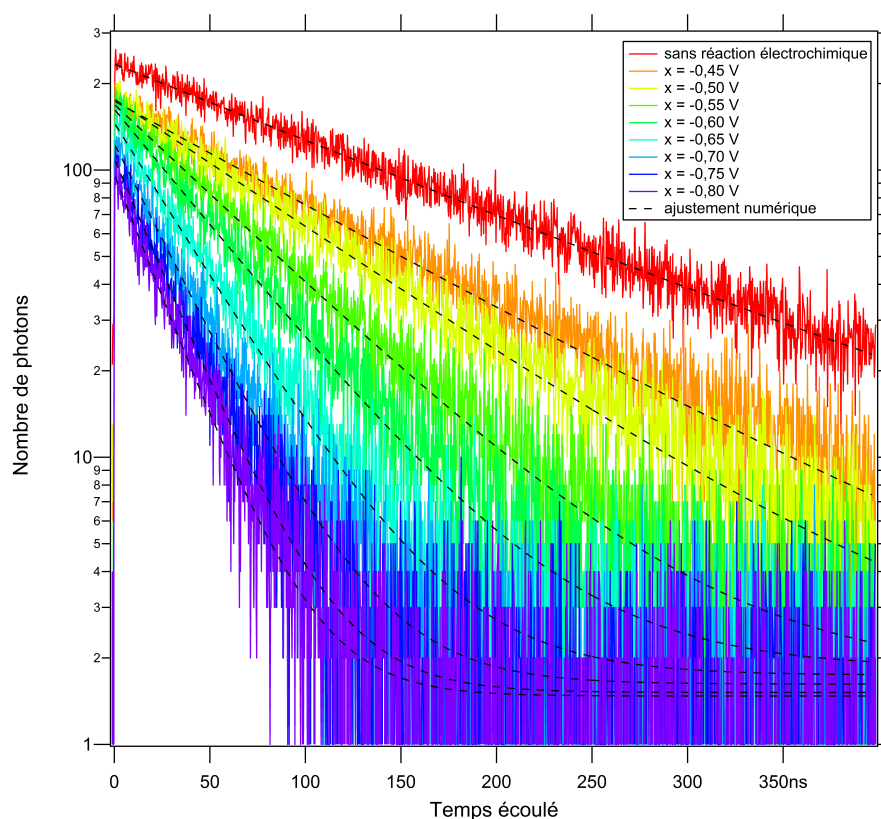


FIGURE 5.11 – Déclins de fluorescence enregistrés pour chaque valeur de potentiel x appliquée à la pointe

maximum de photons et ainsi augmenter la qualité de l'ajustement numérique. Les déclins ainsi obtenus pour chaque potentiel de pointe sont représentés sur la Figure 5.11. L'échelle choisie est logarithmique. À cette échelle, quel que soit le potentiel appliqué à la pointe, les courbes semblent linéaires. Ainsi, les déclins seraient bien monoexponentiels.

Pour s'en assurer, chacune des courbes de la Figure 5.3.5 est ajustée avec l'équation 5.26 :

$$I_x(t) = y_0 + A \exp\left(\frac{-(t - x_0)}{\tau_x}\right) \quad (5.26)$$

avec x la valeur du potentiel appliqué à la pointe lors de la réduction et τ_x la durée de vie associée à ce potentiel que l'on cherche à déterminer.

Les représentations graphiques des modèles issus des ajustements sont superposés aux déclins de la Figure 5.11 (courbes noires pointillées). Les paramètres correspondants sont rapportés dans le Tableau 5.9.

Sur la Figure 5.11, les modèles semblent visuellement assez fidèles aux courbes expérimentales. Les ajustements numériques sont faits par la méthode des moindres carrés. Une façon d'analyser la qualité de chacun de ces ajustements est de construire la carte des résidus pondérés et de calculer le $\chi^2_{\text{réduit}}$. [29]

Sur la Figure 5.12 est représentée la carte des résidus pondérés. Une ligne correspond à un déclin enregistré au potentiel de pointe dont la valeur est indiquée en début de ligne. La carte n'est pas complète car un filtre a été appliqué afin de supprimer les points où il y avait trop peu de photons. Une "bonne" carte de résidus

5.3. Etude du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré

	y_0	A	τ
sans électrochimie	3.36193	229.918	1.6037e-07
$x = -0,45$ V	1.25875	171.86	1.1884e-07
$x = -0,50$ V	1.47583	174.102	9.66699e-08
$x = -0,55$ V	1.73981	166.321	6.87456e-08
$x = -0,60$ V	1.84744	159.569	5.31059e-08
$x = -0,65$ V	1.74344	142.36	4.00246e-08
$x = -0,70$ V	1.62257	120.264	3.20733e-08
$x = -0,75$ V	1.51693	106.12	2.71409e-08
$x = -0,8$ V	1.47381	93.2836	2.4906e-08

TABLEAU 5.9 – Résultats des ajustements numériques des déclins obtenus pour chaque potentiel de pointe appliqué à la réduction

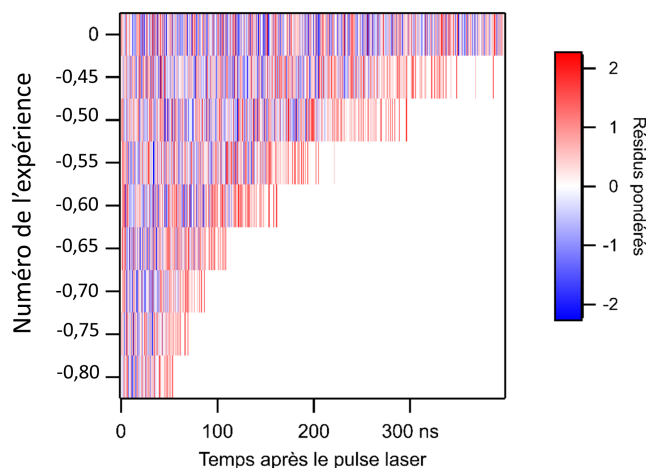


FIGURE 5.12 – Carte des résidus pondérés calculés au cours de chaque déclin pour les différentes valeurs de potentiel de réduction appliqués à la pointe.

pondérés correspond à une bonne alternance des trois couleurs. À ce niveau-là, le résultat des ajustements numériques semble acceptable.

Sur la Figure 5.13 est représentée la valeur de $\chi^2_{\text{réduit}}$ calculée pour chacun des déclins. Ces valeurs sont globalement satisfaisantes.

Il est à noter que lorsqu'on augmente le temps de polarisation de la pointe, l'établissement des déclins peut se faire sur un intervalle de temps plus grand. Le nombre de photons collectés est donc plus important. La carte des résidus pondérés et les valeurs du $\chi^2_{\text{réduit}}$ sont alors meilleures. Toutefois, les valeurs de la durée de vie sont sensiblement les mêmes que celles calculées avec des temps de polarisation de la pointe plus courts. Ceci justifie l'utilisation de ces temps courts.

En conclusion concernant les déclins, la décroissance semble bien monoexponentielle quel que soit le potentiel appliqué à la pointe. L'ajustement avec une double exponentielle plutôt qu'une simple ne permet pas d'améliorer la qualité de la modélisation. Le dispositif expérimental détecte donc une unique espèce en solution. En phase stationnaire, la sphère de diffusion de la pointe n'évolue plus. Le volume

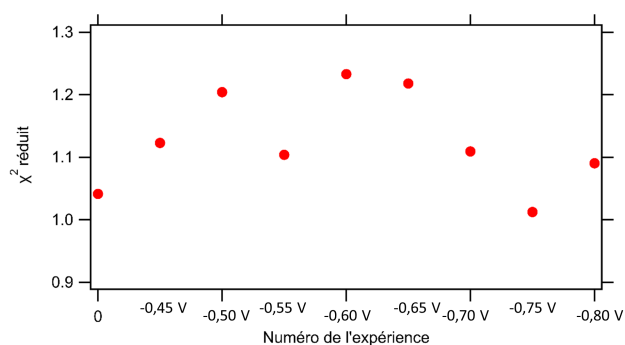


FIGURE 5.13 – Valeur du $\chi^2_{\text{réduit}}$ calculée pour chaque déclin selon la valeur du potentiel de réduction appliqué à la pointe. Un bon $\chi^2_{\text{réduit}}$ est proche de 1.

de solution excité par la diode laser étant de l'ordre de grandeur de cette sphère, on aurait pu s'attendre à observer plusieurs espèces puisque la distribution en inhibiteur n'est pas uniforme. Soit le déclin observé est une moyenne, soit la diffusion n'étant pas limitante, il est effectivement possible d'observer une constante d'inhibition dynamique intrinsèque indépendante de l'environnement en inhibiteur du fluorophore. Enfin, le calcul des résidus et l'évaluation du χ^2 semblent corrects et il apparaît donc comme raisonnable d'utiliser ces déclins pour évaluer la qualité des valeurs de durée de vie moyenne.

Comparaison des méthodes

Pour rappel, la méthode d'évaluation de la durée de vie par calcul de la moyenne est appropriée seulement si la déclin est monoexponentiel, ce qui est vraisemblablement le cas au vu des déclins.

De plus, sur la Figure 5.14, la comparaison des valeurs de durée de vie obtenues par le calcul de la moyenne montre une très bonne corrélation avec celles obtenues avec les déclins, même si les valeurs sont légèrement surestimées dans le premier cas, comme attendu.

Le rapport $\frac{\tau_0}{\tau}$ calculé avec les déclins est superposé à celui précédemment obtenu avec les durées de vie moyenne en fonction du numéro de l'expérience sur la Figure 5.15. La sous-estimation de la valeur de la durée de vie moyenne en l'absence de réaction électrochimique τ_0 et la surestimation de celles aux différents potentiels de pointe conduit globalement à des rapports $\frac{\tau_0}{\tau}$ plus faibles dans le cas d'une évaluation par calcul de la moyenne. La comparaison avec les déclins laisse donc penser que la constante d'inhibition k_d précédemment évaluée est en réalité sous-estimée d'un facteur 1,5 environ.

5.4 Influence de la distance pointe-substrat dans le couplage SECM-microscopie de fluorescence

La première partie du chapitre nous a permis de confirmer l'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion électrogénéré. Dans la suite, nous utilisons cette information pour améliorer la simulation par éléments finis du chapitre 4.

5.4. Influence de la distance pointe-substrat dans le couplage SECM-microscopie de fluorescence

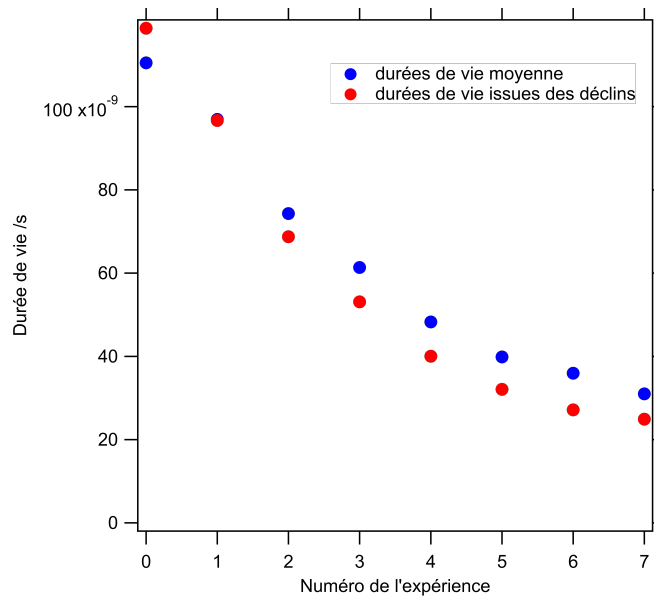


FIGURE 5.14 – Représentation des durées de vie obtenues en fonction du numéro de l'expérience (l'expérience 0 correspond à l'application du potentiel -0,45 V et l'expérience 7 à celle de -0,8 V) par les deux méthodes d'évaluation considérées : la valeur moyenne et l'ajustement numérique des déclin

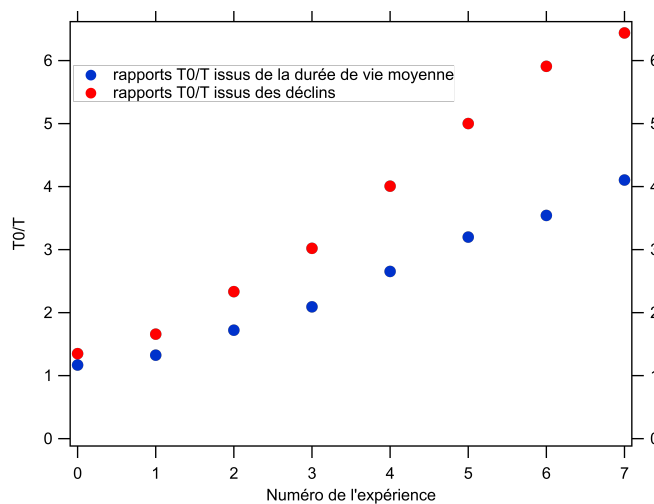


FIGURE 5.15 – Rapports $\frac{T_0}{T}$ obtenues en fonction du numéro de l'expérience (l'expérience 0 correspond à l'application du potentiel -0,45 V et l'expérience 7 à celle de -0,8 V) à partir des durées de vie calculées par valeur moyenne et par ajustement numérique des déclin

Nous allons chercher à expliquer les écarts observés avec les courbes expérimentales aux grandes distances pointe-substrat.

5.4.1 Procédure d'acquisition

Dans cette partie, le montage expérimental reste identique à celui décrit au début de ce chapitre. Toutefois, la procédure d'acquisition est similaire à celle utilisée dans le chapitre précédent (voir paragraphe 4.2.3). La mise au point du microscope est faite au substrat. La pointe est centrée dans le champ de la caméra et mise au contact manuellement à l'aide du dispositif piezoélectrique. Puis elle est remontée de 500 μm et une courbe d'approche est enregistrée. Elle est finalement replacée à proximité du substrat à une position repérée sur la courbe d'approche. Puis elle est remontée pas à pas. À chaque position de la pointe, le potentiostat applique à la pointe la séquence en potentiel suivante : 0 V (30 s), -0,7 V (30 s), 0 V (40 s). Il enregistre le courant qui traverse l'ultramicroélectrode. En parallèle, la photodiode à avalanche collecte les photons.

Par conséquent, pour chaque position de la pointe, il est possible de tracer un chronofluorogramme, l'évolution au cours du temps de la durée de vie et celle du courant de pointe. La durée de vie considérée est la durée de vie moyenne mesurée sur une période T_j égale à 13 secondes selon la formule 5.2 du paragraphe 5.2.1.

5.4.2 Observations expérimentales

Les évolutions au cours du temps de l'intensité et de la durée de vie de fluorescence enregistrées pour les différentes positions de la pointe parallèlement à l'application du signal en potentiel à la microélectrode sont reportés respectivement en B) et en C) de la Figure 5.16. La couleur d'un chronofluorogramme est indicatrice de la distance pointe-substrat à laquelle il a été enregistré, distance indiquée dans le cadre noir sur la droite de la Figure 5.16.

Sur la Figure 5.16 milieu, il apparaît que l'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence dépend de la distance pointe-substrat z comme observé dans le chapitre précédent. Afin d'évaluer plus précisément cette dépendance, le calcul de l'amplitude de modulation de l'intensité de fluorescence normalisée $I.M.$ est fait de la même façon que dans le chapitre précédent :

$$I.M.(z) = \frac{I_{max}(z) - I_{min}(z)}{I_{max}(z)} \quad (5.27)$$

L'amplitude de modulation de l'intensité de fluorescence normalisée ainsi évaluée est représentée en fonction de la distance pointe-substrat z sur le graphe de la Figure 5.16 haut (points verts).

L'allure de la courbe obtenue avec la photodiode à avalanche apparaît comme différente de celle obtenue avec la caméra. En effet, si de la même façon, le taux de modulation est très faible à grande distance puis augmente progressivement lorsque la pointe se rapproche, à plus courte distance, il n'atteint pas de maximum avant de chuter à très courte distance. Au contraire, le taux de modulation normalisé augmente en continu jusqu'au contact où un maximum de près de 90 pour cent est atteint. De ce point de vu, la courbe se rapproche plus de celle issue de la modélisation par éléments finis faite dans le paragraphe 4.6.

5.4. Influence de la distance pointe-substrat dans le couplage SECM-microscopie de fluorescence

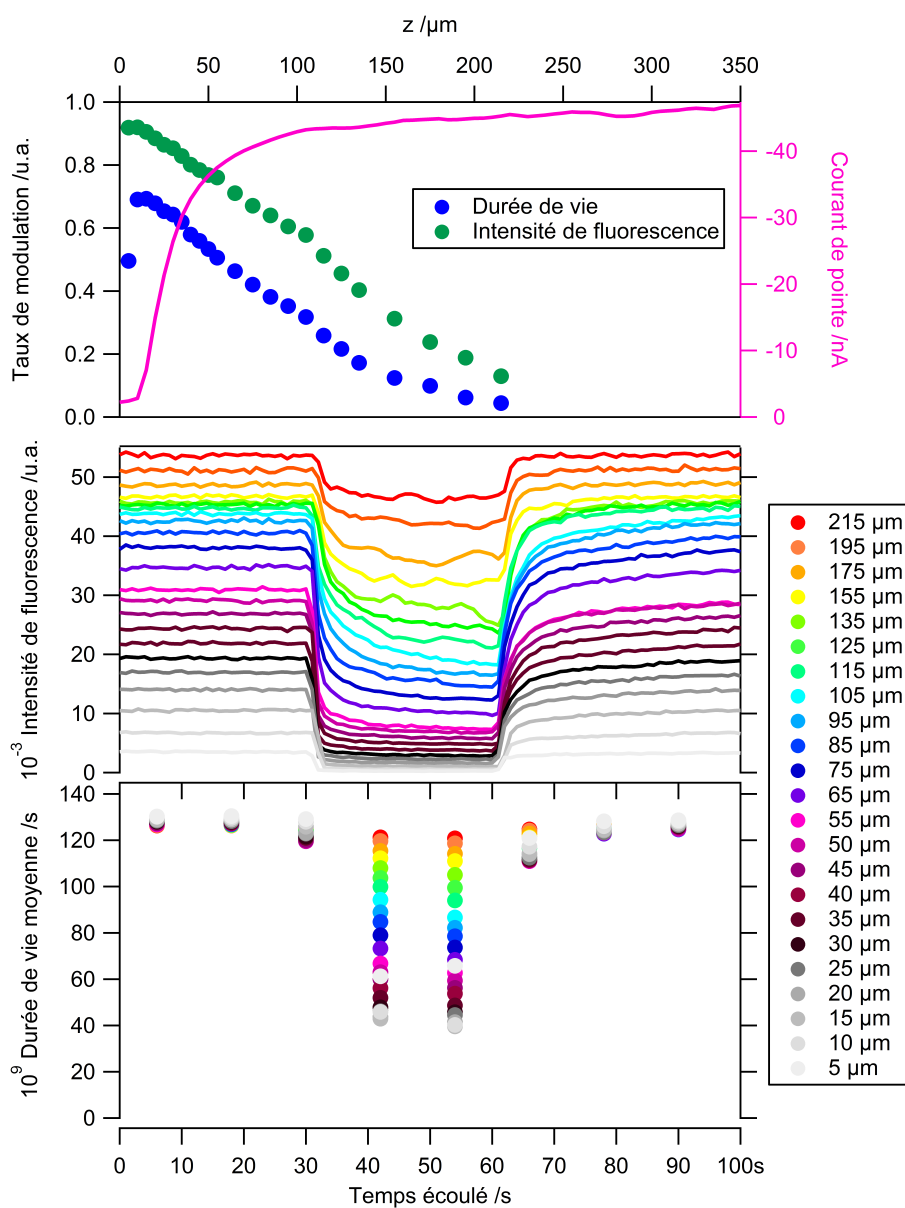


FIGURE 5.16 – (en haut) axe de droite, courbe rose : courant de pointe enregistré en fonction de la distance pointe-substrat lorsque la pointe est polarisée à $-0,7$ V par rapport à $\text{Ag}|\text{AgCl}$; axe de gauche : taux de modulation normalisés de la durée de vie de fluorescence (points bleus) et de l'intensité de fluorescence (points verts) en fonction de la distance pointe-substrat, évalués à partir des chronofluorogrammes ci-dessous. Évolution au cours du temps (au milieu) de l'intensité de fluorescence et (en bas) de la durée de vie de fluorescence lors de l'application à la pointe de la séquence en potentiel suivante : 0 V (30 s), $-0,7$ V (30 s), 0 V (40 s), enregistrés pour différentes positions de la pointe.

Pour comparaison, la courbe d'approche optique électrochimique lui est superposée (courbe rose). Une nouvelle fois, la détection optique est plus sensible à la proximité du substrat que ne l'est le courant électrochimique mesuré à la pointe.

Sur la Figure 5.16 bas, il apparaît que l'amplitude de la modulation de la durée de vie apparente dépend aussi de la distance pointe-substrat z . Afin de l'évaluer plus précisément, de la même façon que pour l'intensité, on calcule l'amplitude de la modulation de la durée de vie de fluorescence normalisée de la façon suivante :

$$\tau.M.(z) = \frac{\tau_0 - \tau(z)}{\tau_0} \quad (5.28)$$

L'amplitude de modulation de la durée de vie de fluorescence normalisée ainsi calculée est représentée en fonction de la distance pointe-substrat z sur le graphe de la Figure 5.16 haut (points bleus). Il apparaît que, de la même façon que l'intensité de fluorescence, la durée de vie est effectivement sensible à la présence du substrat. De plus, l'allure de la courbe est similaire à celle obtenue avec l'intensité. Très faible à longue distance, elle augmente jusqu'à atteindre un maximum. La chute à très courte distance sur le dernier point est probablement due au manque de photons lors de la polarisation négative de la pointe qui cause une surestimation de τ . La sensibilité à la proximité du substrat de la durée de vie est similaire à celle de l'intensité de fluorescence.

5.4.3 Affinage de la modélisation des courbes d'approche optique par la prise en compte de l'inhibition dynamique

La modélisation est à nouveau réalisée avec l'aide du logiciel Comsol Multiphysics.

Dans le chapitre précédent, la modélisation par Comsol considérait que toutes les molécules de tétrazines présentes dans la ROI émettaient de la même façon, qu'elles soient à proximité d'un inhibiteur ou non. Ceci revenait à considérer un rendement quantique homogène et constant qu'il y ait une réaction électrochimique à la pointe ou non.

À la lumière des études mécanistiques faites dans la partie 5.3, un modèle Comsol essayant de tenir compte du phénomène d'inhibition dynamique est mis en place. L'objectif est de voir si ces phénomènes d'inhibition permettent d'expliquer la meilleure sensibilité des courbes d'approche optiques.

Rappel sur la physique du problème pour la détermination des champs $[Tz](r, z)$ et $[Tz^{\bullet-}](r, z)$

Dans cette nouvelle modélisation, la pointe est toujours immergée dans la solution et les deux mêmes espèces sont considérées : la tétrazine et son radical anion. Initialement, seule la tétrazine est présente en solution à la concentration $[Tz]_0$. La réaction de réduction à la pointe est toujours modélisée comme étant totale.

Ne sont donc pas modifiés :

- la géométrie du problème (voir schéma de la Figure 4.19) et le maillage (voir Figures 4.20 et 4.21),
- les conditions initiales,
- les conditions aux limites (voir paragraphe 4.6.2).

5.4. Influence de la distance pointe-substrat dans le couplage SECM-microscopie de fluorescence

L'équation résolue par le calculateur est toujours l'équation de la diffusion en régime stationnaire 4.3.

De cette façon, les champs de concentration de la tétrazine $[Tz](r, z)$ et du radical anion $[Tz^{\bullet-}](r, z)$ calculés par Comsol ne sont finalement pas modifiés.

Le changement se situe uniquement dans la façon de calculer les intensités de fluorescence en présence de réaction électrochimique (I_{min}) et en absence de réaction à la pointe (I_{max}), qui est affinée.

En effet, le calcul tel qu'effectué jusqu'à présent ne tenait pas compte de l'existence d'une inhibition dynamique puisqu'il considérait que toutes les tétrazines à l'état oxydée émettent de la fluorescence et contribuent, à parts égales, à la fluorescence totale collectée, qu'elles soient ou non à proximité d'un inhibiteur.

Nouvelle expression des intensités de fluorescence en présence et en l'absence de réaction électrochimique I_{min} et I_{max}

Soit une distance pointe-substrat notée l .

L'intensité de fluorescence totale récoltée sur l'axe de symétrie entre la pointe et le substrat parallèlement à la réaction électrochimique, notée $I_{min}(l)$, était considérée jusqu'ici comme proportionnelle à l'intégrale de la concentration locale en tétrazine $[Tz](r, z)$ le long de l'axe de symétrie (intégration en $r = 0$, de $z = 0$ à $z = l$). Ceci revenait à considérer le coefficient de proportionnalité entre l'intensité émise localement $dI_{min}(r, z)$ et la concentration locale en tétrazine $[Tz](r, z)$ homogène (donc indépendant de la position (r, z)) sur toute la zone d'intégration. Il pouvait donc sortir de l'intégrale. De plus, ce coefficient était supposé identique à celui en l'absence de réaction électrochimique (pour laquelle l'intensité de fluorescence est notée $I_{max}(l)$). Ainsi, lors du calcul du rapport $(I_{max}(l) - I_{min}(l)) / I_{max}(l)$, ce coefficient se simplifiait parfaitement.

Pour la suite, il convient de s'intéresser plus précisément à l'expression de ce coefficient de proportionnalité entre intensité de fluorescence et concentration. Pour rappel, celui entre intensité de fluorescence et intensité absorbée est le rendement quantique de fluorescence (voir l'équation 1.22). La relation entre l'intensité absorbée et la concentration est, quant à elle, donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$\log\left(\frac{I_0}{I_{trans}}\right) = \epsilon l C \quad (5.29)$$

On en déduit l'expression de l'intensité absorbée :

$$I_{abs} = I_0(1 - 10^{-\epsilon l C}) \quad (5.30)$$

Puis celle de l'intensité de fluorescence :

$$I = \Phi I_{abs} = \Phi I_0(1 - 10^{-\epsilon l C}) \quad (5.31)$$

Par développement limité à faible concentration :

$$I = \Phi I_0 \epsilon l C \ln(10) \quad (5.32)$$

Exprimée localement en coordonnées cylindriques (r, z) , l'équation 5.32 devient :

$$dI(r, z) = \Phi I_0 \epsilon C(r, z) \ln(10) \quad (5.33)$$

Ainsi, l'intensité de fluorescence émise localement $dI(r, z)$ est proportionnelle à l'intensité absorbée et donc, selon la loi de Beer-Lambert, proportionnelle à la concentration locale en tétrazine $[Tz](r, z)$, le coefficient de proportionnalité étant $\Phi I_0 \epsilon \ln(10)$.

Pour rappel, en l'absence d'inhibiteur, le rendement quantique de fluorescence Φ s'exprime en fonction des taux de desexcitation radiatif et non-radiatif :

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (5.34)$$

avec k_r la constante de desexcitation radiative, k_{nr} la constante de desexcitation non radiative.

Dans le cas où le radical anion n'inhiberait pas la fluorescence de la tétrazine neutre, ce coefficient serait effectivement homogène sur toute la zone d'intégration (il peut donc sortir de l'intégrale) et identique pour I_{min} et I_{max} . Il se simplifie lors du calcul du rapport I.M..

En présence d'un inhibiteur par contre, le rendement quantique de fluorescence est abaissé (puisque la présence d'inhibiteur offre une voie de desexcitation supplémentaire) et sa valeur dépend de la concentration en inhibiteur.

Le rendement quantique en présence d'inhibiteur est

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]} \quad (5.35)$$

avec k_q la constante de Stern Volmer et $[Q]$ la concentration en inhibiteur.

Ainsi, si le radical anion inhibe effectivement la fluorescence de la tétrazine neutre, le rendement quantique de fluorescence est donc différent en l'absence et en présence de réaction électrochimique. De plus, en présence de réaction électrochimique, la concentration en inhibiteur $[Tz^{\bullet-}](r, z)$ étant non homogène, il convient de considérer également un rendement quantique de fluorescence local $\Phi(r, z)$ qui ne peut donc plus sortir de l'intégrale.

Dans ces conditions, par combinaison des équations 5.35 et 5.33 pour $dI_{min}(r, z)$ et des équations 5.34 et 5.33 pour $dI_{max}(r, z)$, on obtient :

$$dI_{min}(r = 0, z) = I_0 \epsilon \ln(10) \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Tz^{\bullet-}](r = 0, z)} [Tz](r = 0, z) dz \quad (5.36)$$

$$dI_{max} = I_0 \epsilon \ln(10) \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} [Tz]_0 dz \quad (5.37)$$

Par intégration des équations 5.36 et 5.37 le long de l'axe de symétrie ($r = 0$) entre $z = 0$ et $z = l$, on obtient :

$$I_{min}(l) = I_0 \epsilon \ln(10) \int_0^l \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Tz^{\bullet-}](r = 0, z)} [Tz](r = 0, z) dz \quad (5.38)$$

$$I_{max}(l) = I_0 \epsilon \ln(10) \int_0^l \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} [Tz]_0 dz = I_0 \epsilon \ln(10) \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} [Tz]_0 l \quad (5.39)$$

Le taux de modulation de l'intensité de fluorescence s'exprime ensuite par :

5.4. Influence de la distance pointe-substrat dans le couplage SECM-microscopie de fluorescence

$$I.M.(l) = \frac{I_{max}(l) - I_{min}(l)}{I_{max}(l)} \quad (5.40)$$

$$I.M.(l) = \frac{\frac{k_r}{k_r+k_{nr}}[Tz]_0 - \int_0^l \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Tz]^{\bullet-}}(r=0, z) [Tz](r=0, z) dz}{\frac{k_r}{k_r+k_{nr}}[Tz]_0} \quad (5.41)$$

Dans la suite, Comsol est utilisé pour évaluer numériquement l'intégrale 5.42 pour les différentes distances pointe-substrat l , à partir de laquelle il sera possible de calculer le taux de modulation I.M.(l).

$$\int_0^l \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Tz]^{\bullet-}}(r=0, z) [Tz](r=0, z) dz \quad (5.42)$$

Pour cela, il est nécessaire de lui fournir au préalable des valeurs numériques de k_r , k_{nr} et k_q .

Évaluation numérique des constantes k_r et k_{nr}

Le rendement quantique de fluorescence et la durée de vie de fluorescence ont été évalués expérimentalement :

$$\tau_0 = 130 \text{ ns} \quad (5.43)$$

$$\Phi = 0,38 \quad (5.44)$$

Ces deux grandeurs sont définies par les relations suivantes :

$$\tau_0 = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (5.45)$$

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (5.46)$$

Un réarrangement de ces deux expressions permet d'exprimer k_r et k_{nr} en fonction de Φ et de τ_0 :

$$k_r = \frac{\Phi}{\tau_0} \quad (5.47)$$

$$k_{nr} = \frac{1 - \Phi}{\tau_0} \quad (5.48)$$

L'application numérique permet d'évaluer ces deux grandeurs :

$$k_r = 2,9.10^6 \text{ s}^{-1} \quad (5.49)$$

$$k_{nr} = 4,8.10^6 \text{ s}^{-1} \quad (5.50)$$

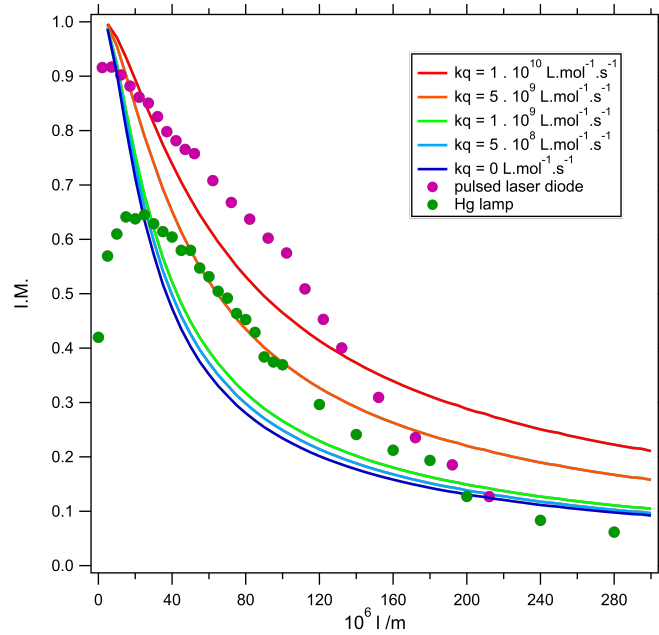


FIGURE 5.17 – Taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisés simulés selon la formule 5.53 en fonction de la distance pointe-substrat l pour différentes valeurs de la constante d'inhibition dynamique k_q . Pour comparaison, les courbes obtenues expérimentalement leur sont superposées.

Évaluation numérique du taux de modulation de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat et de la constante de Stern-Volmer

Avec les valeurs calculées précédemment pour les taux de desexcitation radiatif et non radiatif k_r et k_{nr} respectivement, il est possible d'évaluer l'intégrale relative à $I_{max}(l)$:

$$\Phi[Tz]_0 l = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} [Tz]_0 l \quad (5.51)$$

l étant la distance pointe-substrat.

Quand à l'intégrale relative à I_{min} , elle dépend également de la constante de Stern Volmer k_q . S'il est fourni à Comsol une valeur de k_q , le logiciel, connaissant k_r , k_{nr} et les champs de concentration $[Tz](r,z)$ et $[Tz^{\bullet-}](r,z)$, peut l'évaluer pour toutes les valeurs de l :

$$\int_0^l \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q [Tz^{\bullet-}](r=0,z)} [Tz](r=0,z) dz \quad (5.52)$$

Afin de juger du rôle joué par l'inhibition dynamique, les calculs de $I_{min}(l, k_q)$ sont reproduits pour plusieurs valeurs de la constante de Stern-Volmer k_q .

Puis, à partir des valeurs des intégrales relatives à $I_{min}(l, k_q)$ et $I_{max}(l)$, le taux de modulation de l'intensité de fluorescence est calculé de la façon suivante :

$$I.M.(l, k_q) = \frac{I_{max}(l) - I_{min}(l, k_q)}{I_{max}(l)} \quad (5.53)$$

5.4. Influence de la distance pointe-substrat dans le couplage SECM-microscopie de fluorescence

Les résultats de cette double étude paramétrique (sur la distance pointe-substrat l et sur la constante de Stern-Volmer k_q) sont reportés sur la Figure 5.17.

Les taux de modulation calculés à l'aide de Comsol pour les différentes valeurs de k_q comme précédemment expliqués y sont représentés en fonction de la distance pointe-substrat. Pour comparaison, les taux de modulation obtenus expérimentalement avec la lampe blanche et avec le laser leur sont superposés.

Sur ce graphe, il apparaît que la simulation entreprise permette effectivement de rendre compte de l'influence de l'inhibition dynamique sur la forme des courbes d'approche optiques telles qu'envisagées jusqu'ici. Ainsi, plus l'inhibition dynamique est efficace, donc plus la valeur de k_q est grande, plus la décroissance du taux de modulation en fonction de la distance pointe-substrat est lente. Autrement dit, si quelque soit la valeur de k_q le taux de modulation vaut 1 à très courte distance (environ $5 \mu\text{m}$), la valeur de 0,4 est atteinte pour une distance pointe-substrat d'environ $60 \mu\text{m}$ lorsque $k_q = 5.10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ alors qu'elle est de plus de $120 \mu\text{m}$ lorsque $k_q = 1.10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Ainsi, la simulation de l'inhibition dynamique seule suffit à rendre compte de la meilleure sensibilité, observée expérimentalement, des courbes d'approche optique par rapport à celles basées sur la mesure du courant de pointe. La sensibilité à la présence du substrat est d'autant meilleure que l'inhibition dynamique est efficace, i.e. que la constante k_q est grande.

Évaluation numérique du taux de modulation de la durée de vie de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat

La modélisation par éléments finis de l'expérience de couplage entre microscopie électrochimique à balayage et microscopie de fluorescence permet de calculer les champs de concentration $[Tz](r, z)$ et $[Tz^{\bullet-}](r, z)$. Ces champs ont pu être utilisés pour modéliser les amplitudes de modulation de l'intensité de fluorescence normalisées en fonction de la distance pointe-substrat et comparées aux courbes expérimentales, grâce à la proportionnalité entre intensité de fluorescence locale et concentration locale en espèce émettrice, ainsi qu'à la relation entre rendement quantique de fluorescence et concentration en inhibiteur.

Grâce à la relation de Stern-Volmer, le champ de concentration $[Tz^{\bullet-}](r, z)$ peut également être utilisé, par intégration sur la ROI, pour simuler la durée de vie moyenne apparente en fonction de la distance pointe-substrat et donc l'amplitude normalisée de la modulation associée.

Pour rappel, la relation de Stern-Volmer relie une durée de vie apparente en présence d'inhibiteur τ à la concentration en inhibiteur $[Q]$:

$$\tau = \frac{\tau_0}{1 + k_q \tau_0 [Q]} \quad (5.54)$$

C'est une relation macroscopique qui considère une concentration en inhibiteur homogène. Dans le cas décrit ici, l'inhibiteur est le radical anion généré à la pointe ; il est donc inégalement réparti dans la solution. On supposera que la valeur de la durée de vie apparente τ mesurée dans une région d'intérêt donnée est égale à la valeur qui serait mesurée en présence d'une concentration homogène d'inhibiteur égale à la concentration moyenne au sein de la région d'intérêt en question. Dans la région d'intérêt considérée jusqu'ici ($r = 0$ et $0 < z < l$), la concentration moyenne en radical anion est donnée par :

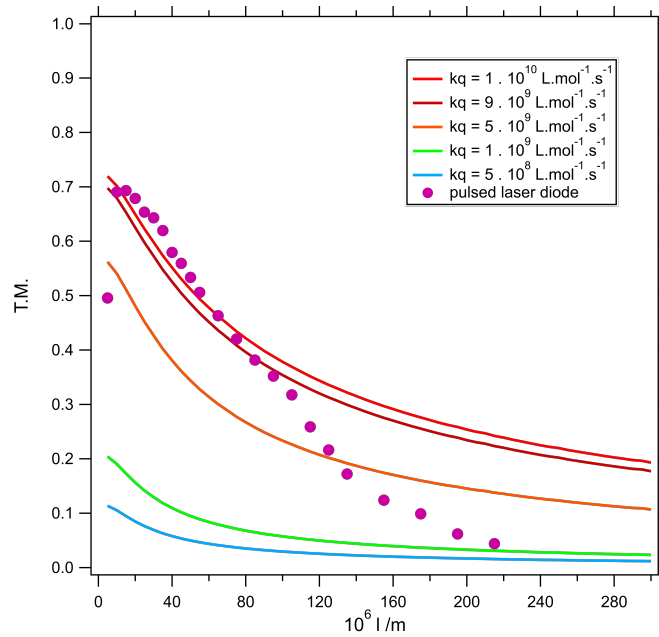


FIGURE 5.18 – Taux de modulation normalisés de la durée de vie de fluorescence simulés selon la formule 5.53 en fonction de la distance pointe-substrat l pour différentes valeurs de la constante d'inhibition dynamique k_q . Pour comparaison, les courbes obtenues expérimentalement leur sont superposées.

$$[Tz^{\bullet-}]_{ROI}(l) = \frac{\int_0^l [Tz^{\bullet-}](r=0, z) dz}{l} \quad (5.55)$$

avec l la distance pointe-substrat.

À partir de la relation 5.55 et de l'équation de Stern-Volmer 5.54, il est possible d'évaluer la durée de vie moyenne au sein de la ROI(l) pour chaque distance pointe-substrat $\tau(l)$ et donc de simuler les courbes des taux de modulation de la durée de vie en fonction de la distance pointe-substrat pour différentes valeurs de k_q :

$$\tau_M(l, k_q) = \frac{\tau_0(l) - \tau(l, k_q)}{\tau_0(l)} \quad (5.56)$$

Le résultat de ces simulations est présenté sur le graphe de la Figure 5.18. Pour comparaison, la courbe obtenue expérimentalement est également reportée sur le graphe. Comme attendu, la valeur de k_q influence beaucoup l'allure générale de la courbe mais également son maximum : plus elle est grande, plus le taux de modulation est important et plus la décroissance à longue distance est lente.

Un tel paramétrage pourrait également être un moyen d'estimation de la valeur de la constante dans le cas du système tétrazine neutre - radical anion par comparaison avec la courbe expérimentale. Toutefois, l'inhibition statique n'est pas prise en compte dans la modélisation.

5.5. Couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps sur substrat conducteur

durée (s)	30	30	20
potentiel (V)	0	x	0

TABLEAU 5.10 – Signal en potentiel appliqué à la pointe du microscope électrochimique, x varie de -0,45 V à -0,80 V, sur substrat isolant

5.5 Couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps sur substrat conducteur

Dans cette partie, l'influence de la nature du substrat est étudiée. En effet, toutes les mesures de durée de vie décrites jusqu'ici ont été menées sur substrat isolant. Il s'agit maintenant d'étudier l'influence de la rétroaction d'un substrat conducteur sur la durée de vie de fluorescence apparente (mesurée). Pour cela, l'étude de l'influence de la valeur du potentiel appliqué à la pointe pour la réduction de la tétrazine décrite en 5.3 est reproduite en utilisant une lame d'ITO en guise de substrat.

Le reste du montage demeure inchangé par rapport à celui décrit dans le paragraphe 5.2.1.

La pointe est donc placée à 30 μm du substrat. Le potentiostat applique à l'ultramicroélectrode les signaux en potentiel décrits dans le tableau 5.10, la valeur de x variant de -0,3 V à -0,8 V successivement.

Parallèlement à l'application du signal électrochimique, l'excitation de la tétrazine est assurée par l'association laser- filtre d'excitation -dichroïque. Les photons sont collectés à travers le dichroïque, le filtre d'émission et la photodiode à avalanche.

Cette même expérience est conduite deux fois :

- une première fois, le substrat est laissé à son potentiel de circuit ouvert ;
- une seconde fois, le montage fonctionne en mode bipotentiostat. Parallèlement à l'application du signal électrochimique appliqué à la pointe, l'ITO est polarisé à -0,23 V, potentiel suffisamment négatif pour bloquer la rétroaction du substrat sans pour autant réduire la tétrazine (voir la voltamétrie cyclique de la Figure 4.7).

Lors de l'application de ces deux séries de signaux électrochimiques, les courants de pointe, l'intensité de fluorescence et les durées de vie moyennes sont mesurés simultanément. Leur évolution au cours du temps est représentée sur la Figure 5.19 pour l'ITO à son potentiel de circuit ouvert et sur la Figure 5.20 pour l'ITO polarisé à -0,23 V respectivement.

Sur les Figures 5.19 et 5.20 en haut, il apparaît que le saut de potentiel de l'ultramicroélectrode de 0 V à sa valeur x V s'accompagne bien de l'apparition d'un courant de réduction d'autant plus négatif que le potentiel appliqué à la pointe est faible. Pour un potentiel donné, le palier de courant atteint est plus bas sur ITO PCO que sur ITO polarisé à -0,23 V, le courant de réduction est plus grand en valeur absolue et peut être attribué au feedback positif.

De plus, cette chute du courant est corrélée, comme observé précédemment avec la lampe blanche, à une chute de l'intensité de fluorescence.

Enfin, de la même façon que sur isolant, la polarisation négative de la pointe entraîne une chute de la durée de vie de fluorescence d'autant plus grande que la valeur du potentiel de pointe est faible. Cette chute semble plus importante sur ITO polarisé à -0,23 V que sur ITO à son potentiel de circuit ouvert. Il faut donc des

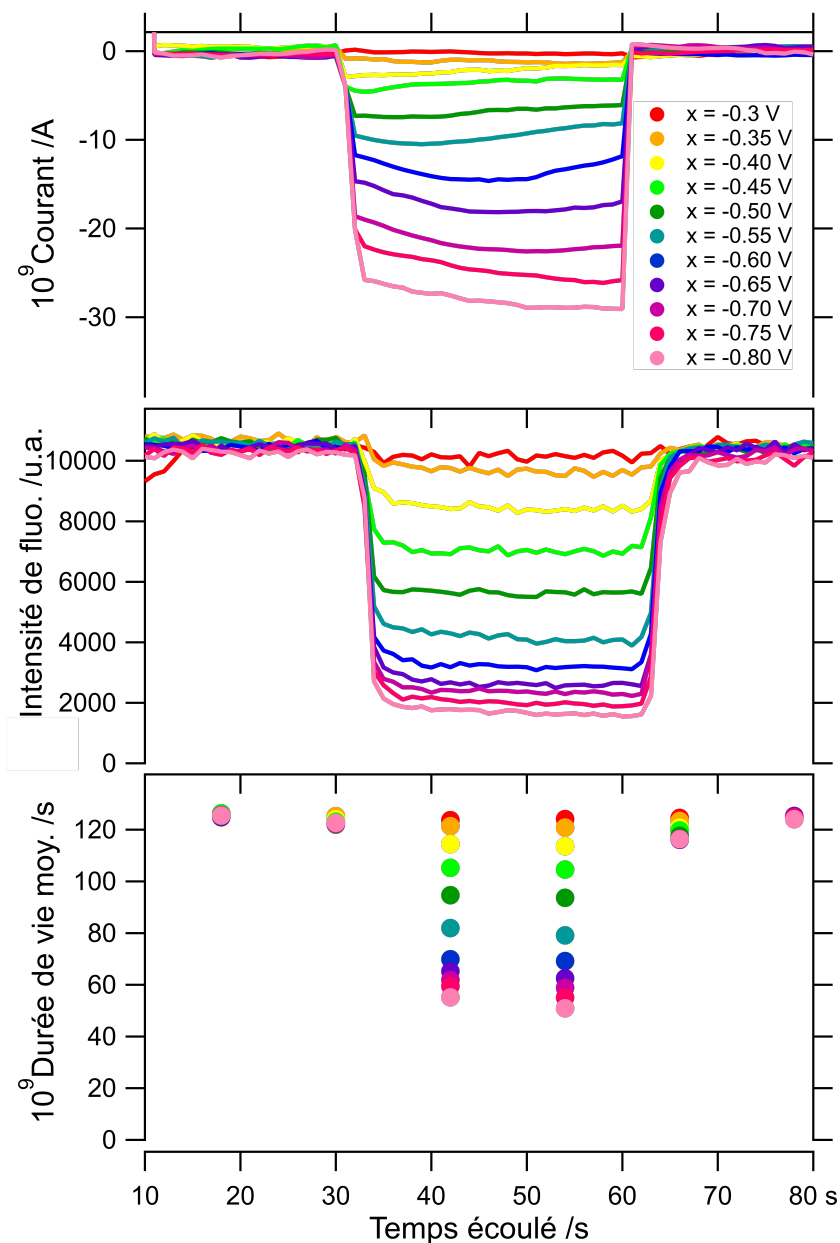


FIGURE 5.19 – Représentation graphique de l'évolution au cours du temps (en haut) des courants de pointe, (au milieu) de l'intensité de fluorescence et (en bas) de la durée de vie de fluorescence lors de l'application à la pointe de la séquence en potentiel décrite dans le Tableau 5.10, à savoir : 0 V (30 s), x V (30 s), 0 V (20 s). Substrat : ITO à son potentiel de court circuit. Distance pointe-substrat : $30 \mu\text{m}$

5.5. Couplage SECM - microscopie de fluorescence résolue en temps sur substrat conducteur

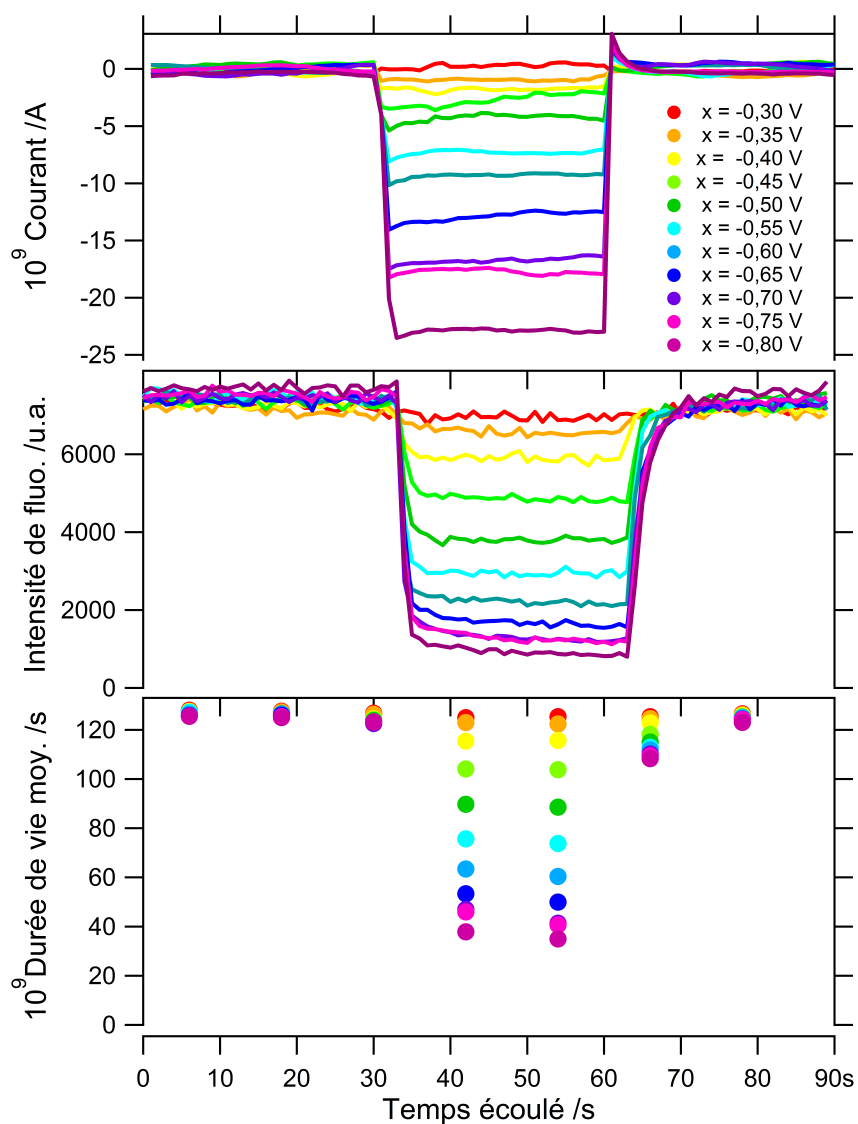


FIGURE 5.20 – Représentation graphique de l'évolution au cours du temps (en haut) des courants de pointe, (au milieu) de l'intensité de fluorescence et (en bas) de la durée de vie de fluorescence lors de l'application à la pointe de la séquence en potentiel décrite dans le Tableau 5.10, à savoir : 0 V (30 s), x V (30 s), 0 V (20 s). Substrat : ITO polarisé à -0,23 V par rapport à Ag | AgCl. Distance pointe-substrat : $30 \mu\text{m}$

substrat	a	b	r ²
isolant	0,73778	2,9084.10 ⁸	0,993517
ITO PCO	1,0099	1,1002. 10 ⁸	0,992065
ITO -0,23 V	0,9327	2,4557. 10 ⁸	0,994361

TABLEAU 5.11 – Résultat des ajustements numériques d'une fonction affine de la forme $y = a + bx$ sur la représentation graphique des rapports $\frac{\tau_0}{\tau}$ expérimentaux en fonction de la charge mesurés sur les trois substrats : isolant, ITO PCO et ITO polarisé à -0,23 V

courants plus importants sur ITO PCO pour obtenir une modulation de la fluorescence plus faible. Ceci semble cohérent avec l'existence d'une rétroaction diminuant la quantité de radical anion formé à la pointe donc d'inhibiteur.

Afin de comparer plus précisément les deux expériences, les rapports de $\frac{\tau_0}{\tau}$ des deux expériences sont représentées en fonction de la charge en haut de la Figure 5.21, la charge étant calculée comme précédemment expliqué dans le paragraphe 1.3.4.

Comme sur isolant, ces représentations graphiques sont linéaires conformément à ce qui est attendu d'après la relation de Stern-Volmer. Les résultats des ajustements numériques sont reportés dans le tableau 5.11. Il apparait que le coefficient directeur de la droite obtenue pour ITO PCO est plus faible que celui obtenu sur isolant : la pointe doit fournir une charge plus importante pour obtenir un taux de modulation de la durée de vie aussi important que sur substrat isolant. Autrement dit, la rétroaction du substrat non seulement augmente la quantité d'espèce émettrice par rapport au substrat isolant pour un potentiel de pointe donné mais également limite la quantité d'inhibiteur, conduisant à une constante d'inhibition dynamique apparente plus faible. La relation entre charge et rapport $\frac{\tau_0}{\tau}$ reste cependant linéaire.

Une polarisation légèrement négative de l'ITO (-0,23 V) permet de bloquer la rétroaction du substrat et donc de restaurer une quantité d'inhibiteur comparable à celle sur substrat isolant pour une charge fournie par la pointe donnée. La constante d'inhibition dynamique mesurée est alors comparable à celle mesurée sur substrat isolant.

Sur la Figure 5.21 milieu sont représentés les rapports $\frac{I_0}{I}$ mesurés sur substrat ITO à son potentiel de circuit ouvert (points verts) et sur ITO polarisé à -0,23 V (points bleus). Sur la Figure 5.21 bas sont représentés les rapports $\frac{I_0}{I}$ divisés par les rapports $\frac{\tau_0}{\tau}$, division effectuée point par point. Les quatre séries de points correspondantes sont ajustées numériquement avec des droites affines. Les résultats de ces régressions linéaires sont représentées dans le tableau 5.12 pour l'ITO en circuit ouvert et dans le tableau 5.13 pour l'ITO polarisé à -0,23 V, les courbes correspondantes sont les droites respectivement verte et bleue sur la Figure 5.21 milieu et bas.

Que ce soit pour l'ITO PCO ou pour l'ITO polarisé à -0,23 V, le coefficient de corrélation est meilleur pour $\frac{I_0}{I}$ divisé par $\frac{\tau_0}{\tau}$ que pour $\frac{I_0}{I}$. Une telle observation est cohérente avec l'idée selon laquelle de l'inhibition statique intervient dans le mécanisme global d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine neutre par le radical anion associé.

5.6 Conclusion

L'expérience de couplage entre microscopie électrochimique à balayage et microscopie de fluorescence par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome décrite dans

5.6. Conclusion

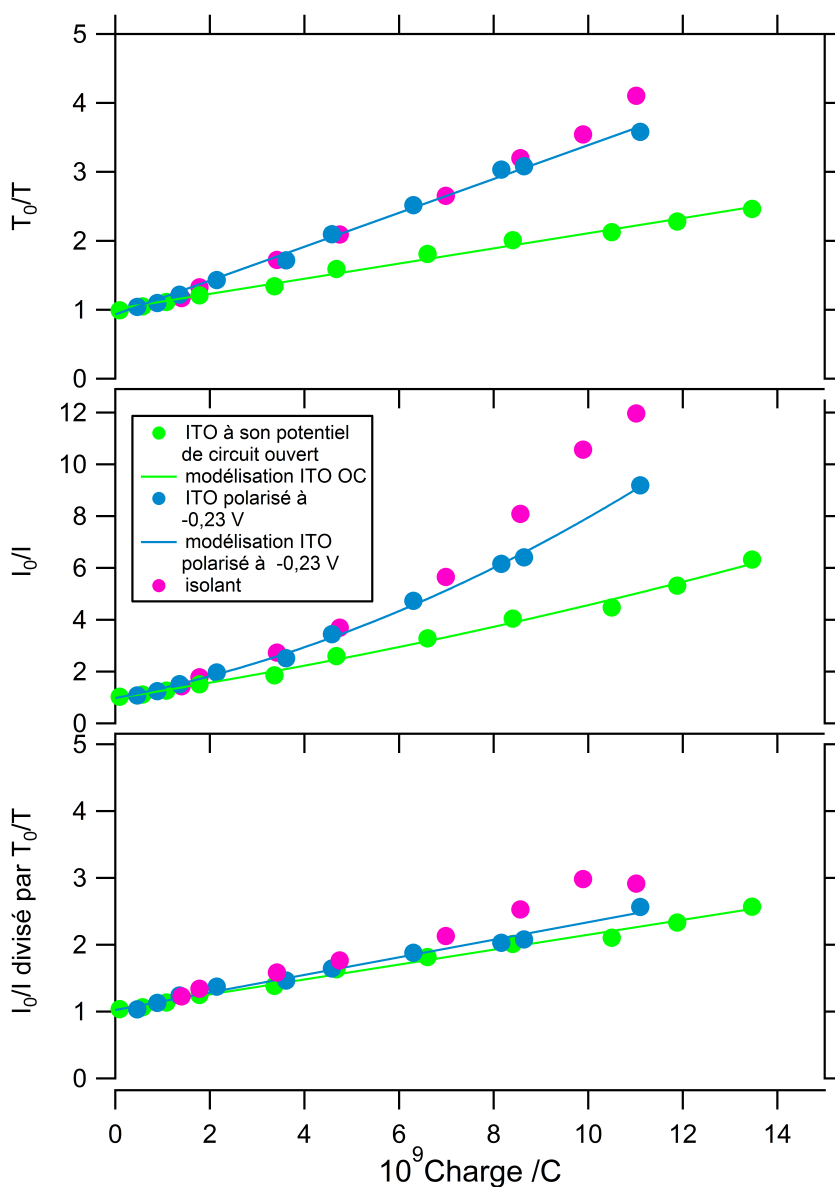


FIGURE 5.21 – Représentation graphique (en haut) des rapports $\frac{\tau_0}{\tau}$ (au milieu) des rapports $\frac{I_0}{I}$ (en bas) des rapports $\frac{I_0}{I}$ par $\frac{\tau_0}{\tau}$ en fonction de la charge coulombienne enregistrés sur ITO non polarisé (en vert) et sur ITO polarisé à -0,23 V par rapport à Ag|AgCl (en bleu). Pour comparaison, les résultats obtenus sur isolant leur sont superposés (en rose)

ITO PCO	a	b	r ²
$\frac{I_0}{I}$	0,81779	3,8151 10 ⁸	0,989357
$\frac{I_0}{I} / \frac{\tau_0}{\tau}$	1,0344	1,114610 ⁸	0,99177

TABEAU 5.12 – Résultat des ajustements numériques d’une fonction affine de la forme $y = a + bx$ sur la représentation graphique des rapports $\frac{I_0}{I}$ et $\frac{I_0}{I} / \frac{\tau_0}{\tau}$ expérimentaux en fonction de la charge mesurés sur ITO à son potentiel de circuit ouvert

Chapitre 5. Couplage de la microscopie de fluorescence résolue en temps avec la SECM par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome

ITO -0,23 V	a	b	r ²
$\frac{I_0}{I}$	0,53749	7,0779 10 ⁸	0,977742
$\frac{I_0}{I} / \frac{\tau_0}{\tau}$	1,0241	1,3133 10 ⁸	0,988514

TABLEAU 5.13 – Résultat des ajustements numériques d'une fonction affine de la forme $y = a + bx$ sur la représentation graphique des rapports $\frac{I_0}{I}$ et $\frac{I_0}{I} / \frac{\tau_0}{\tau}$ expérimentaux en fonction de la charge mesuré sur ITO polarisé à -0,23 V

le chapitre précédent a été adaptée dans ce chapitre pour la réalisation de mesures de fluorescence résolues en temps. De cette façon, il est possible, au cours d'une unique expérience, d'enregistrer les courants de pointe, les intensités de fluorescence et les durées de vie moyennes.

Le positionnement de la pointe à proximité du substrat et le régime de diffusion stationnaire créent des conditions favorables à la compréhension du mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la tétrazine par le radical anion. Il semblerait que ce mécanisme soit d'ordre à la fois dynamique et statique, comme le laisse à penser la modélisation des rapports de durée de vie et d'intensité de fluorescence en fonction de la charge par des cinétiques de Stern-Volmer. L'idée d'une composante statique est corroborée par des calculs de chimie théorique. En effet, l'étude énergétique et orbitale des dimères, composés de deux tétrazines neutres ou d'une tétrazine neutre et d'un radical anion, montre que l'interaction est beaucoup plus favorable dans ce deuxième cas.

L'impact de ce mécanisme sur les mesures faites dans l'expérience de couplage entre microscopie de fluorescence et microscopie électrochimique est ensuite étudié, notamment lorsque la distance pointe-substrat varie ou lorsque la nature du substrat change. Ainsi, pour étudier l'influence de l'inhibition sur les courbes d'approche optiques présentées dans le chapitre précédent, la modélisation par éléments finis présentée dans ce même chapitre est affinée à la lumière de ces études mécanistiques. Pour rappel, il était observé expérimentalement une meilleure sensibilité de la courbe optique (par rapport à la courbe électrochimique) à la présence du substrat. La première modélisation, exclusivement basée sur un modèle de diffusion, ne permettait pas d'en rendre compte, la courbe modélisée décroissant rapidement lorsque la pointe s'éloignait du substrat. La prise en compte d'une inhibition dynamique dans la modélisation permet bien de "ralentir" cette décroissance. Cette modélisation permet également de modéliser les courbes d'approche basées sur le signal de durée de vie. Une relativement bonne corrélation est observée entre courbe simulée et courbe expérimentale. Le modèle pourrait sans doute être amélioré par la prise en compte de la composante statique de l'inhibition.

Enfin, les mesures de durée de vie ont été entreprises sur substrat conducteur. Elles semblent également sensibles à la rétroaction du substrat. Une polarisation de ce dernier à une valeur choisie de façon à bloquer la rétroaction permet de retrouver des résultats comparables à ceux obtenus sur substrat isolant. À l'avenir, il pourrait être intéressant d'appliquer la modélisation tenant compte de l'inhibition dynamique à la configuration "feedback" positif pour voir son influence sur les courbes d'approche enregistrées dans cette configuration.

Dans le chapitre suivant, la source d'excitation est à nouveau la lampe blanche. Le dispositif expérimental est celui du chapitre 4. Les mesures de fluorescence sont

5.6. Conclusion

donc à nouveau faites en régime stationnaire. En effet, l'objet du chapitre concerne un autre axe de développement de la technique de couplage entre la microscopie de fluorescence et la microscopie électrochimique à balayage : son utilisation en milieux aqueux pour d'éventuelles applications à l'étude de milieux biologiques. Pour cela une nouvelle sonde remplace la chlorométhoxytétrazine. Il s'agit de la résorufine.

Chapitre 6

Extension du couplage microscopie de fluorescence - SECM à une sonde électrofluorochrome soluble en milieu aqueux : la résorufine

6.1 Objectifs

Dans le chapitre 4, le couplage entre SECM et microscopie d'épifluorescence était permis par l'utilisation d'une sonde à la fois électroactive et fluorescente. La preuve de concept a été faite avec un fluorophore bien connu au PPSM, la chlorométhoxytétrazine, soluble en milieu organique. Pour d'éventuelles applications de la méthode dans l'étude de milieux biologiques, il est apparu intéressant de tester une nouvelle sonde, cette fois-ci soluble en milieu aqueux. De plus, les propriétés de l'interface électrolyte-ITO peuvent changer drastiquement d'un solvant organique à un milieu aqueux [62]. Les effets de ces changements sur le dispositif expérimental couplant SECM et microscopie de fluorescence méritent d'être évalués.

Le choix de la sonde s'est porté sur le système résazurine - résorufine - dihydro-résorufine puisque ses propriétés spectroélectrochimiques avaient été par ailleurs bien décrites par l'équipe de Thomas Doneux et Laurent Bouffier [27].

La description des propriétés photophysiques, électrochimiques et spectroélectrochimiques de ce système fait l'objet de la section 6.2 de ce chapitre. Des exemples de son utilisation dans des expériences couplant microscopie de fluorescence et électrochimie trouvés dans la littérature sont également détaillés. La section 6.3 est consacrée à la description des résultats obtenus par l'utilisation du couple résorufine / dihydro-résorufine en tant que sonde dans le couplage de la microscopie de fluorescence à la microscopie électrochimique à balayage. Comme pour la tétrazine, les configurations "feedback" négatif, "feedback" positif et génération – collecte ont été testées successivement. Les différences de comportement entre les deux sondes (la tétrazine en milieu organique et la résorufine en milieu aqueux) sont analysées.

6.2 Le système résazurine-résorufine-dihydro-résorufine

La résorufine est une molécule colorée fortement fluorescente qui a déjà servi à plusieurs reprises de sonde pour l'étude de différents phénomènes biologiques[42]

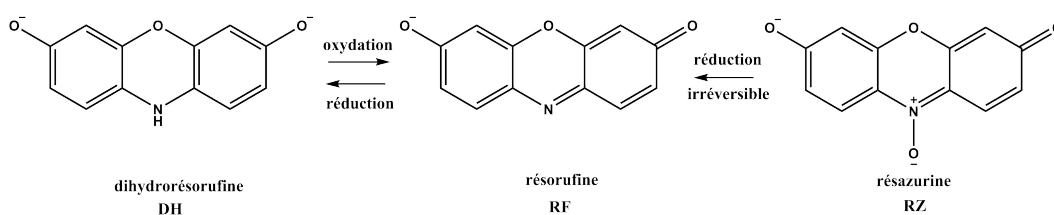


FIGURE 6.1 – Structure des molécules résazurine, résorufine et dihydrorésorufine

[79] [97] [57]. Elle est également électroactive. Le schéma de la Figure 6.1 résume les couples oxydant/réducteur dans lesquels elle est impliquée ainsi que la structure des différentes molécules.

La résorufine peut être formée électrochimiquement par réduction de la résazurine. Cette réaction est non réversible : il n'est pas possible de régénérer électrochimiquement la résazurine. La résazurine est une molécule bleue peu fluorescente. Elle est utilisée notamment comme indicateur coloré d'oxydo-réduction lors de tests permettant de déterminer si une cellule est aérobie ou anaérobie.

La résorufine peut elle-même être réduite en dihydrorésorufine. Il s'agit d'une réaction à deux électrons et deux protons. Cette réaction électrochimique est réversible : la dihydrorésorufine est réoxydable en résorufine.

6.2.1 Propriétés électrochimiques et photophysiques

Dans cette partie sont données les caractéristiques électrochimiques et photophysiques de la résazurine, de la résorufine et de la dihydrorésorufine. Elles sont le résultat d'une étude réalisée par T. Doneux et son équipe [27].

Propriétés électrochimiques

Thomas Doneux et son équipe ont caractérisé par voltamétrie cyclique les comportements électrochimiques de la résazurine et de la résorufine sur électrode d'or polycristalline. Chacune des sondes est étudiée dans un tampon carbonate à 0,05 M permettant de fixer le pH à 10. La vitesse de balayage est de 10 mV.s^{-1} .

Le voltamogramme cyclique de la résorufine, reporté en haut de la Figure 6.2, présente une paire de pics autour de $-0,48 \text{ V vs Ag/AgCl}$ avec une séparation entre les pics d'environ 50 mV. Le pic cathodique peut être attribué à la réduction à deux électrons de la résorufine en dihydrorésorufine, et le pic anodique au processus inverse.

Le voltamogramme cyclique de la résazurine, représenté en bas de la Figure 6.2, présente, quant à lui, deux pics en réduction. Le premier présente un maximum vers $-0,40 \text{ V vs Ag/AgCl}$ et a été attribué à la réduction à deux électrons de la résazurine en résorufine. L'absence de réponse anodique au cours du balayage retour confirme que la réaction n'est pas renversable. Le deuxième pic cathodique et le pic anodique retour correspondent, quant à eux, respectivement à la réduction de la résorufine intermédiairement formée en dihydrorésorufine et à sa régénération.

6.2. Le système résazurine-résorufine-dihydrorésorufine

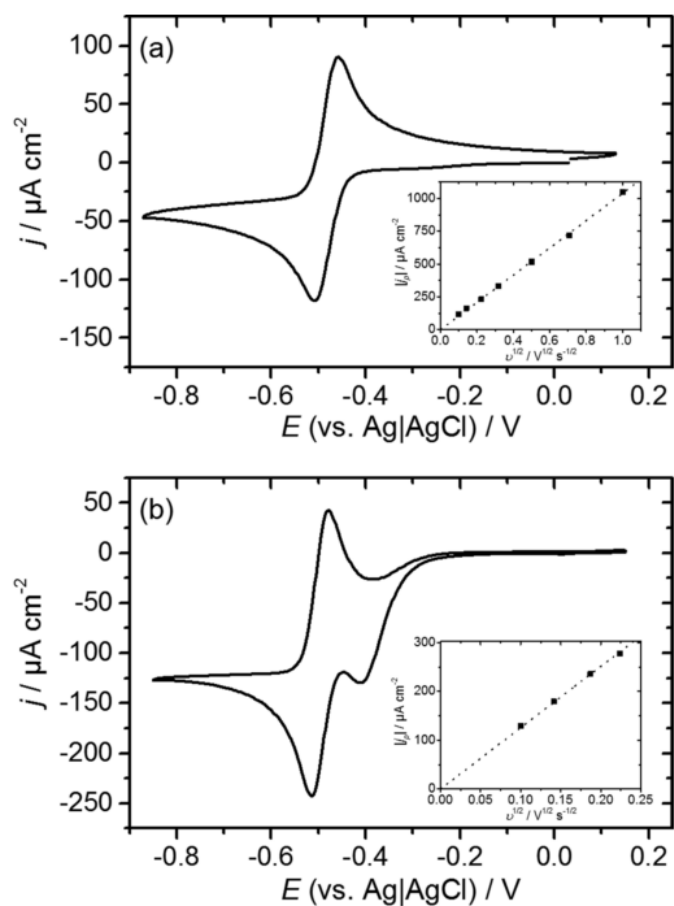


FIGURE 6.2 – Voltamétrie cyclique de (a) 1 mM de résorufine et (b) 1 mM de résazurine enregistrées sur électrode d'or polycristalline dans un tampon carbonate 0,05 M. Vitesse de balayage : 10 mV.s^{-1} . Les encarts montrent la dépendance du courant du pic de réduction à la vitesse de balayage.[27]

Propriétés photophysiques

Les trois molécules RZ, RF et DH présentent des caractéristiques spectrales très différentes.

Les propriétés d'absorption Le spectre d'absorption UV-visible de la résazurine présente en milieu aqueux basique une bande intense à 602 nm ($\epsilon = 42000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) associée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de la phénoxazin-3-one.

Le spectre d'absorption de la résorufine est caractérisé par une bande intense centré sur 572 nm ($\epsilon = 51000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) avec un épaulement à 535 nm. Pas de changements du spectre d'absorption n'est observé sur une gamme de pH comprise entre 7,5 et 11,5.

La dihydrorésorufine, quant à elle, n'absorbe pas dans le domaine du visible.

Les propriétés d'émission La résazurine présente une fluorescence due à un état singulet dont le maximum d'émission est localisé à 634 nm. Le rendement quantique est de 11 %, la durée de vie de 0,65 ns.

Quant à la résorufine, elle présente une intense fluorescence dont le maximum culmine à 583 ou 592 nm selon la source. Le rendement quantique est de 41 %, la durée de vie de 2,90 ns.

La dihydrorésorufine est par ailleurs non fluorescente.

Etudes spectroélectrochimiques in situ résolues en temps

Ces propriétés spectrales très différentes permettent le suivi par spectroélectrochimie in situ et résolue en temps pour confirmer l'interconversion électrochimique entre ces différentes espèces.

Spectroscopie d'absorption La Figure 6.3 (a) présente une série de spectres d'absorption dans le visible enregistrés lors de l'application d'un potentiel de -0,65 V par rapport à Ag|AgCl à l'électrode de travail de la cellule spectroélectrochimique contenant une solution de résorufine. Un spectre est enregistré toutes les 60 secondes. D'après la voltamétrie cyclique de la Figure 6.2, un tel potentiel doit permettre la réduction de la résorufine en dihydrorésorufine. Comme attendu, l'intensité des spectres diminue donc à toutes les longueurs d'onde au cours du temps, car la dihydrorésorufine n'absorbe pas dans le visible. Puis, l'application d'un potentiel de -0,35 V par rapport à Ag|AgCl conduit à une réaugmentation de l'absorbance confirmant que la dihydrorésorufine est reconvertie en résorufine.

Une expérience similaire est reconduite avec une solution de résazurine (voir Figure 6.3 (b)). Le potentiel est porté à -0,45 V pour convertir la molécule en résorufine. Le maximum observé initialement à 600 nm disparaît bien au profit d'un maximum à 570 nm caractéristique de la résorufine.

Spectroscopie d'émission En utilisant la même cellule spectroélectrochimique, des mesures de spectroélectrochimie de fluorescence in situ sont mises en oeuvre. La Figure 6.4 (a) montre l'évolution du spectre d'émission de la solution de résorufine lorsqu'elle est polarisée à -0,65 V par rapport à Ag|AgCl. Sous l'effet de l'électrochimie, le spectre d'émission, dont le maximum se situe à 592 nm, disparaît au cours du temps : la résorufine fluorescente est bien convertie en dihydrorésorufine non fluorescente.

6.2. Le système résazurine-résorufine-dihydrorésorufine

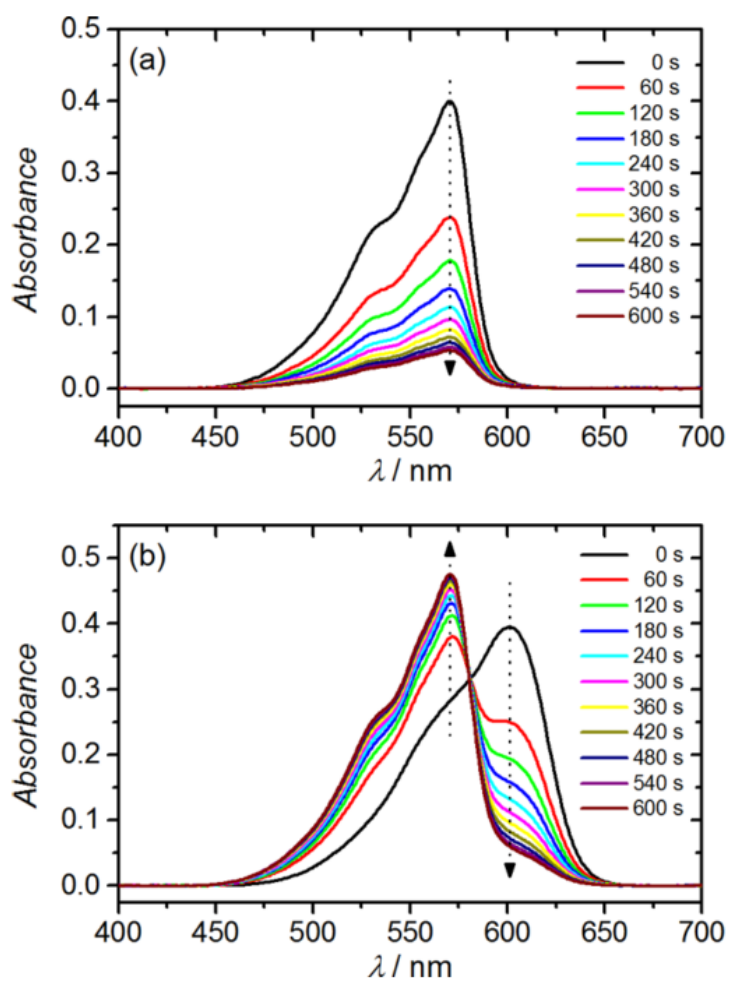


FIGURE 6.3 – Évolution au cours du temps des spectres d'absorption in situ (a) dans une solution à 1 mM de résorufine et (b) dans une solution à 1 mM de résazurine. Le potentiel de l'électrode est respectivement de -0,65 V par rapport à Ag | AgCl dans la partie (a) et de -0,45 V par rapport à Ag | AgCl dans la partie (b).[27]

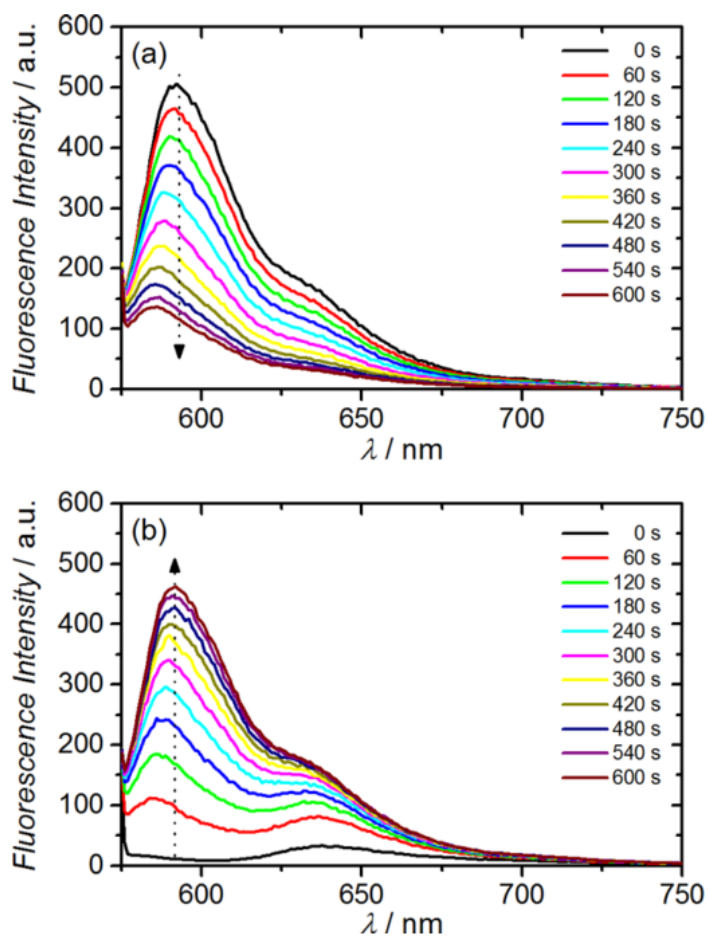


FIGURE 6.4 – Évolution au cours du temps des spectres d'émission in situ (a) dans une solution à 1 mM de résorufine et (b) dans une solution à 1 mM de résazurine. Le potentiel de l'électrode est respectivement de -0,65 V par rapport à Ag | AgCl dans la partie (a) et de -0,45 V par rapport à Ag | AgCl dans la partie (b). La longueur d'onde d'excitation est $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$. [27]

6.2. Le système résazurine-résorufine-dihydrorésorufine

Sur la Figure 6.4 (b) sont représentés les spectres enregistrés au cours du temps lors de l'application à une solution de résazurine un potentiel de -0,45 V par rapport à Ag | AgCl. Le maximum d'intensité de fluorescence est initialement situé à 630 nm. Sous l'effet de l'application du potentiel, un pic émerge peu à peu autour de 590 nm. Là encore, cette observation est cohérente avec la conversion de la résazurine en résorufine.

6.2.2 Exemples d'application du système résazurine-résorufine dans un couplage entre électrochimie et fluorescence

De part ces propriétés spectroélectrochimiques intéressantes, le système résazurine - résorufine - dihydrorésorufine a été utilisé à plusieurs reprises comme sonde dans des expériences couplant fluorescence – et plus particulièrement la microscopie de fluorescence – à l'électrochimie.

Comme vu dans la section 1.6.3, le couplage électrochimie-microscopie confocale a permis, par exemple, à l'équipe de Thomas Doneux d'imager en 3D la couche de diffusion générée par la réduction de la résazurine en résorufine au niveau d'une électrode d'or [27]. Pour cela, ils considèrent que la fluorescence émise localement par la résorufine générée à l'électrode est proportionnelle à la concentration locale de cette même espèce [27].

Avant eux, l'équipe de Zhang a utilisé à plusieurs reprises ce système dans la microscopie électrochimique permise par fluorescence (FEEM). Pour rappel, la FEEM a pour but de sonder une réaction électrochimique en transformant le signal électrochimique en signal optique au moyen d'une électrode bipolaire. En effet, à l'autre pôle de l'électrode a lieu une seconde réaction électrochimique impliquant un médiateur à la fois électroactif et dont la forme générée (oxydée ou réduite) est fluorescente. La fluorescence générée est imagée à l'aide d'un microscope de fluorescence. Dans la première "version" de la FEEM, c'est la résazurine qui est utilisée pour sonde redox. Sa réduction locale en résorufine fluorescente sur un réseau d'électrodes bipolaires permet "d'imager" une réaction d'oxydation à l'autre pôle [38]. Toutefois, dans cette première "version", la résolution temporelle et spatiale est limitée par la diffusion de la résorufine générée et sa fluorescence parasite.

Afin d'améliorer la résolution et de rendre possible l'étude de réactions de réduction, une nouvelle version est publiée qui utilise cette fois-ci le couple dihydrorésorufine - résorufine, la dihydrorésorufine non fluorescente étant préalablement en solution. À un pôle a lieu la réaction de réduction étudiée, à l'autre pôle l'oxydation de la dihydrorésorufine en résorufine fluorescente. De plus, la réversibilité de cette dernière réaction est judicieusement utilisée par l'ajout en solution de glucose déprotoné. Ce dernier permet la re-réduction de la résorufine électrogénérée à l'électrode bipolaire. Puisqu'il n'y a plus de fluorescence parasite, l'expérience devient quantitative et la résolution spatiale est grandement améliorée [78]. Il en va de même de la résolution temporelle puisqu'ils arrivent, dans un montage légèrement modifié, à imagier la couche de diffusion autour d'une ultramicroélectrode lors d'une voltamétrie cyclique. [77]

Enfin, c'est également le couple redox résorufine / dihydrorésorufine qui est utilisé par Sundaesan et ses collaborateurs pour évaluer la distance pointe-substrat dans une expérience couplant microscopie électrochimique à balayage et la microscopie optique super-résolution.[94] Dans cette expérience, le médiateur est présent en solution sous la forme dihydrorésorufine et la pointe SECM génère la résorufine fluorescente. La fluorescence de la résorufine est collectée par le microscope via une

optique, comme par exemple un modulateur de lumière spatial, qui induit une distorsion du point spread function. Cette distorsion dépend fortement de la position axiale de la sonde par rapport à la mise au point du microscope. Dans le travail de Sundaresan, c'est une double hélice lumineuse "tournante" qui est générée par l'optique. Et la valeur de l'angle sous laquelle apparaît cette double hélice est linéaire avec la distance entre la sonde fluorescente - la résorufine - et le plan de focalisation du microscope. En immobilisant un fluorophore sur le substrat et en générant une seconde double hélice à partir de ce signal lumineux, ils estiment également la distance substrat - plan focal. La distance pointe-substrat peut ainsi être déterminée avec une résolution de 25 nm, et cela grâce à la réversibilité de la réaction électrochimique, puisque du glucose se trouve en solution et réduit chimiquement la résorufine électrogénérée.

6.3 Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épi-fluorescence)

Dans cette partie, le système résorufine-dihydrorésorufine est utilisé en tant que sonde dans le couplage de la microscopie de fluorescence avec la microscopie électrochimique à balayage tel que décrit dans le chapitre 4.[36]

6.3.1 Le choix de la sonde

Comme vu dans la partie précédente, la réduction de la résazurine en résorufine est une réaction chimiquement irréversible. Le couple résazurine/résorufine utilisé dans le couplage électrochimie-microscopie confocale présente donc un intérêt limité dans celui impliquant SECM et microscopie en épifluorescence.

Le couple résorufine/dihydrorésorufine en revanche est plus intéressant, car finalement, il présente les mêmes caractéristiques spectroélectrochimiques que le couple tétrazine/radical anion précédemment étudié. En effet, l'oxydant du couple émet de la fluorescence alors que le réducteur non. De plus, il est possible de former électrochimiquement et réversiblement un membre du couple à partir de l'autre. Ainsi, le système possède théoriquement un état éteint et un état allumé dont le passage de l'un à l'autre peut se faire électrochimiquement.

6.3.2 Dispositif expérimental, caractérisation électrochimique de la sonde et procédure d'acquisition

Dispositif expérimental

La solution étudiée est une solution aqueuse de résorufine à la concentration de 1 mM, tamponnée à pH 10 à l'aide d'un mélange équimolaire de carbonate de sodium Na_2CO_3 et d'hydrogencarbonate de sodium NaHCO_3 (0,025 M chacun).

Le dispositif expérimental est le même que celui décrit dans le chapitre 4 couplant microscopie de fluorescence stationnaire et microscopie électrochimique à balayage, et représenté sur le schéma de la Figure 4.6 : une cellule électrochimique à trois électrodes, dont le substrat de fond est transparent et contenant la solution décrite ci-dessus, est posée sur la platine du microscope de fluorescence. L'excitation est assurée par la lampe blanche. La fluorescence est collectée soit avec la caméra

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

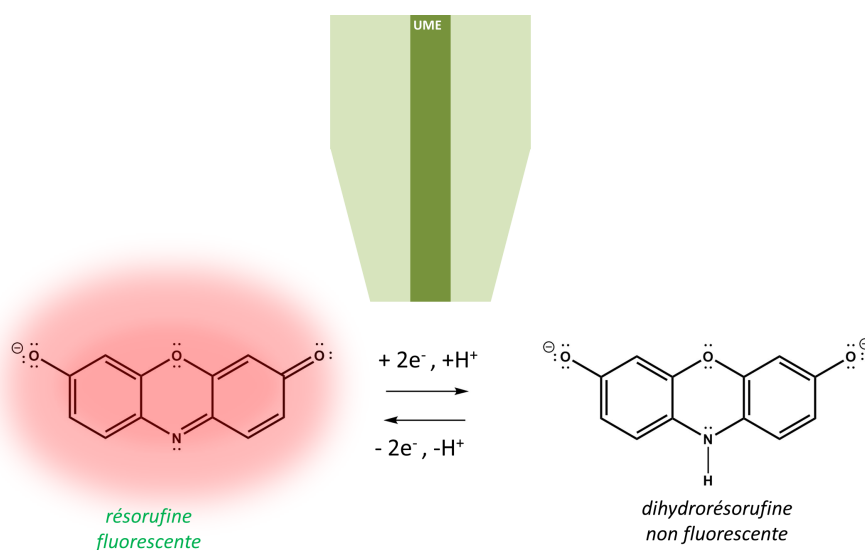


FIGURE 6.5 – Système électrofluorochrome basé sur la conversion réversible de la résorufine fluorescente en dihydrorésorufine non fluorescente en milieu tamponné.

CCD, soit avec le spectrophotomètre. La pointe SECM est toujours une microélectrode à disque en platine de diamètre 25 microns. Elle est immergée dans la solution. En mode feedback négatif, le substrat est une lame de verre. Dans les configurations feedback positif et génération-collecte, c'est une lame de verre recouverte d'une couche d'ITO.

Préalablement aux expériences, la solution est dégazée à l'argon. Le flux est maintenu au-dessus de la solution pendant toute la durée des expériences.

Caractérisation de la sonde par voltamétrie cyclique

Afin de déterminer les potentiels à appliquer à la microélectrode et au substrat pour réduire la résorufine en dihydrorésorufine, la résorufine en solution aqueuse à pH 10 est caractérisée par voltamétrie cyclique sur ces deux électrodes. Les voltammogrammes ainsi obtenus sont reportés sur la Figure 6.6.

Procédure d'acquisition

Dans le cadre du couplage SECM-microscopie de fluorescence en plein champ, la procédure d'acquisition est la même que celle décrite dans la partie 4.2.3, lors de l'utilisation de la chlorométhoxytétrazine comme sonde électrofluorochrome en solution dans l'acétonitrile. Dans un premier temps, la pointe est positionnée au contact du substrat manuellement (position $z = 0 \mu\text{m}$) et centrée dans le champ de la caméra. Puis, elle est remontée de $500 \mu\text{m}$ à l'aide du panneau de contrôle manuel du piezo. Une courbe d'approche est alors enregistrée, ce qui permet de préciser la position du contact.

La pointe est replacée au contact, dont la position a été déterminée comme décrit précédemment. Puis elle est relevée pas à pas depuis le panneau de contrôle (typiquement des pas de cinq microns). À chacune de ces positions, repérées sur la courbe d'approche, un même signal en potentiel est appliqué à l'UME (de même au substrat s'il est conducteur).

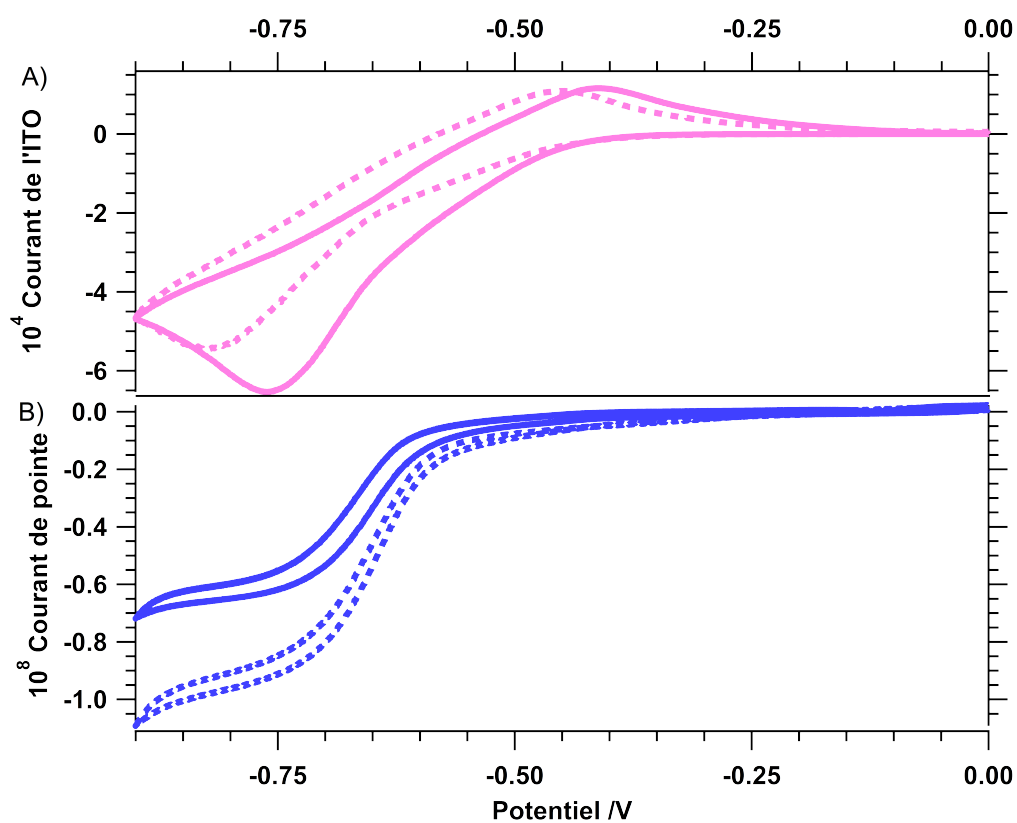


FIGURE 6.6 – A) Voltamétrie cyclique sur ITO B) Voltamétrie cyclique sur microélectrode à disque de platine de diamètre 25 microns. Contre électrode : fil de platine; électrode de référence : fil Ag | AgCl; vitesse de balayage : 100 mV/s.

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

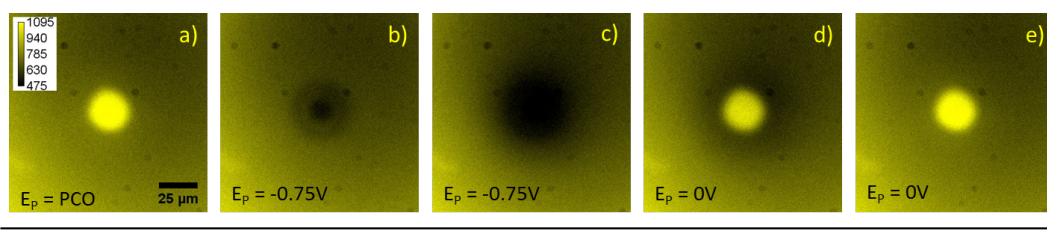


FIGURE 6.7 – Sélection d’images de la pointe enregistrées avec la caméra CCD quand son potentiel varie selon la séquence suivante : (pco) (10 s), 0 V (10 s), -0,75 V (30 s) et 0 V (20 s). Les images (a), (b), (c), (d) et (e) sont enregistrées respectivement à $t = 9, 23, 45, 52$ et 68 s. Distance pointe-substrat = $5 \mu\text{m}$.

Parallèlement à l’application du signal en potentiel, la caméra CCD enregistre les images de fluorescence centrées sur la pointe, la mise au point étant faite au substrat (interface substrat-solution).

Dans la suite, les résultats sont reportés dans trois configurations du microscope électrochimique : le mode feedback négatif, le mode feedback positif et le mode génération au substrat-collecte à la pointe.

6.3.3 Modulation de l’intensité de fluorescence en mode feedback négatif

Influence du potentiel de pointe sur l’intensité de fluorescence

En mode feedback négatif, seule la pointe peut être utilisée pour faire varier localement l’intensité de fluorescence. Ainsi, en la portant à un potentiel suffisamment négatif pour réduire localement la résorufine en dihydrorésorufine (typiquement $-0,75$ V par rapport à Ag/AgCl), il est attendu une chute de l’intensité de fluorescence localisée dans une zone centrée sur la pointe. Puis, l’application d’un potentiel suffisamment haut pour oxyder la dihydrorésorufine en résorufine (typiquement 0 V) doit conduire à la restauration de l’intensité de fluorescence initiale.

Suite à la procédure décrite dans le paragraphe précédent, la pointe est placée à 5 microns du substrat et centrée dans le champ de la caméra. Puis le potentiostat applique à la pointe la séquence en potentiel suivante : cette dernière est laissée à son potentiel de circuit ouvert pendant 10 secondes puis, elle est polarisée à 0 V pendant 10 secondes. Ensuite, son potentiel est porté à $-0,75$ V pendant 30 secondes de façon à réduire localement la résorufine en dihydrorésorufine. Enfin, le potentiostat impose un retour à 0 V pendant 20 secondes afin de permettre la réaction retour d’oxydation de la dihydrorésorufine en résorufine.

Sur la Figure 6.7 est reporté un extrait des images enregistrées par la caméra CCD lors de l’application de cette séquence de potentiel. Toutes les images (a à e) sont présentées avec un même réglage du contraste et de la luminosité. En l’absence de polarisation, la pointe se présente sous la forme d’un point brillant (image a) qui devient progressivement sombre sous l’effet de la polarisation de la microélectrode à $-0,75$ V (images b et c). Enfin, l’intensité de fluorescence est rétablie comme attendue lorsque le potentiel de la pointe est ramené à 0 V (images d et e).

Cette première expérience montre que, pour une distance pointe-substrat donnée, l’intensité de fluorescence émise par la sonde hydrosoluble peut bien être contrôlée localement via le potentiel appliqué à l’ultramicroélectrode. Dans la suite, cette

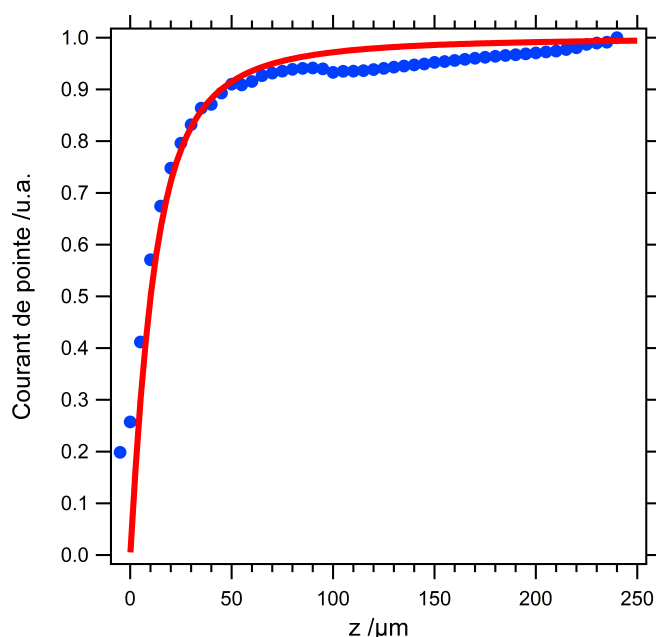


FIGURE 6.8 – Points bleus : courbe d’approche électrochimique enregistrée dans une solution de résorufine à la concentration 1 mM sur un substrat de verre. Trait rouge : expression analytique mise au point par Lefrou et son équipe avec les paramètres a et R_g fixés respectivement à 10 μm et 10.

même expérience est reproduite pour différentes positions de la microélectrode afin d’étudier l’influence du paramètre "distance pointe-substrat".

Influence de la distance pointe-substrat en mode "feedback" négatif

Courbe d’approche électrochimique La Figure 6.8 montre la courbe d’approche classiquement obtenue par électrochimie : on mesure le courant de réduction de la résorufine en dihydrorésorufine. Cette réduction est permise par la polarisation de la pointe à -0,75 V par rapport à Ag/AgCl (voir voltamétrie cyclique de la Figure 6.6).

Comme attendu en mode feedback négatif, le courant est sensiblement constant à grande distance pointe-substrat puis, il décroît rapidement vers 40 μm pour tendre vers 0 lorsque la pointe entre en contact avec le substrat.

Cette courbe d’approche expérimentale est bien corrélée avec celle obtenue théoriquement avec l’expression de Cornut et Lefrou. [23]

Courbe d’approche optique Le signal en potentiel imposé à la microélectrode par le potentiostat à chaque distance pointe-substrat est rappelé sur la Figure 6.10 C). Pour chaque position de la pointe, un film similaire à celui de la Figure 6.7 est enregistré. À partir de chacun de ces films est extrait un chronofluorogramme correspondant à l’intensité moyenne de fluorescence mesurée dans une région d’intérêt centrée autour de la pointe (carré rouge sur la figure 6.9) en fonction du temps écoulé.

Les chronofluorogrammes ainsi obtenus sont représentés en B) de la Figure 6.10. Chaque couleur correspond à une position différente de la pointe par rapport au substrat repérée sur la courbe d’approche en A) de la même Figure (points colorés sur

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

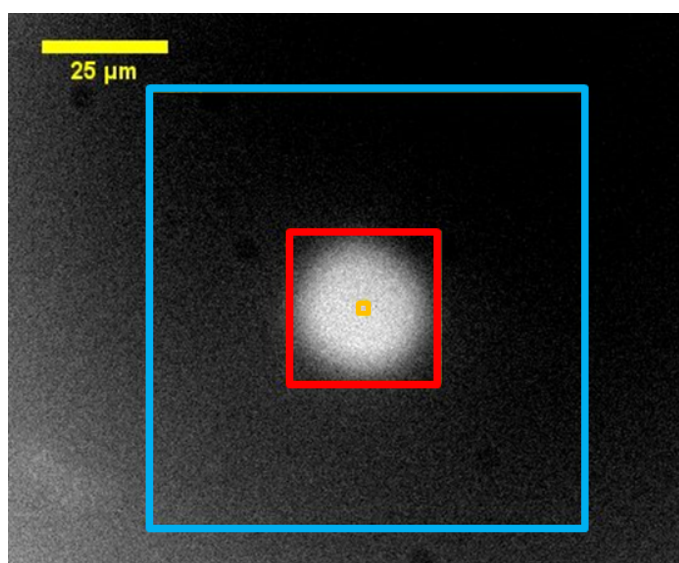


FIGURE 6.9 – Image de la pointe en réflexion. Les régions d'intérêt (ROI) utilisées dans ce chapitre sont délimitées par des carrés de couleur.

la courbe bleue). De la même façon que pour la tétrazine, la distance pointe-substrat influe sur l'allure des chronofluorogrammes à deux niveaux : la valeur de l'intensité de fluorescence initiale et l'amplitude de la modulation. En effet, si l'intensité de fluorescence initiale n'est pas sensible au passage circuit ouvert - 0 V, elle augmente largement avec la distance pointe substrat. Ceci s'explique par la pénétration de la pointe dans la profondeur de champ du microscope de fluorescence. Toutefois, cette augmentation ne semble pas linéaire avec la distance pointe-substrat. Puis, comme attendu, le passage à un potentiel de -0,75 V est marqué par une chute de l'intensité de fluorescence qui atteint rapidement un palier. L'amplitude de cette modulation dépend notablement de la position de la pointe : lorsque cette dernière s'éloigne, la baisse de l'intensité de fluorescence est de moins en moins perceptible. Enfin, le retour à 0 V se traduit par un retour à l'intensité de fluorescence initiale, quelle que soit la position de la pointe.

Afin de mieux visualiser l'influence de la position de la pointe sur l'intensité de fluorescence initiale, en l'absence de réaction électrochimique, une courbe de calibration est reportée sur la Figure 6.11. Alors que la linéarité était observée sur l'ensemble des distances étudiées dans le cas de la tétrazine (350 µm), elle n'est effectivement vérifiée que pour les distances les plus faibles pour la résorufine : une courbure apparaît dès 80 µm. Cela est probablement la conséquence du fort coefficient d'absorption de la résorufine. Ainsi, la lumière d'excitation serait très fortement absorbée par les premières couches de solution à proximité du substrat si bien que les molécules à proximité de la pointe (loin du substrat) ne seraient que faiblement excitées. Afin de confirmer cette hypothèse, des solutions plus diluées ont également été étudiées. Il se trouve qu'une concentration de 0,11 mM (donc diluée par dix) permet de retrouver la linéarité entre intensité de fluorescence dans la région d'intérêt et distance pointe-substrat ($r^2 = 0,99064$) sur l'ensemble des distances de travail considérées.

L'influence de la distance pointe-substrat sur l'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence est quant à elle évaluée de la même façon que précédemment décrit dans le cas de la tétrazine. Ainsi, pour une distance pointe-substrat z

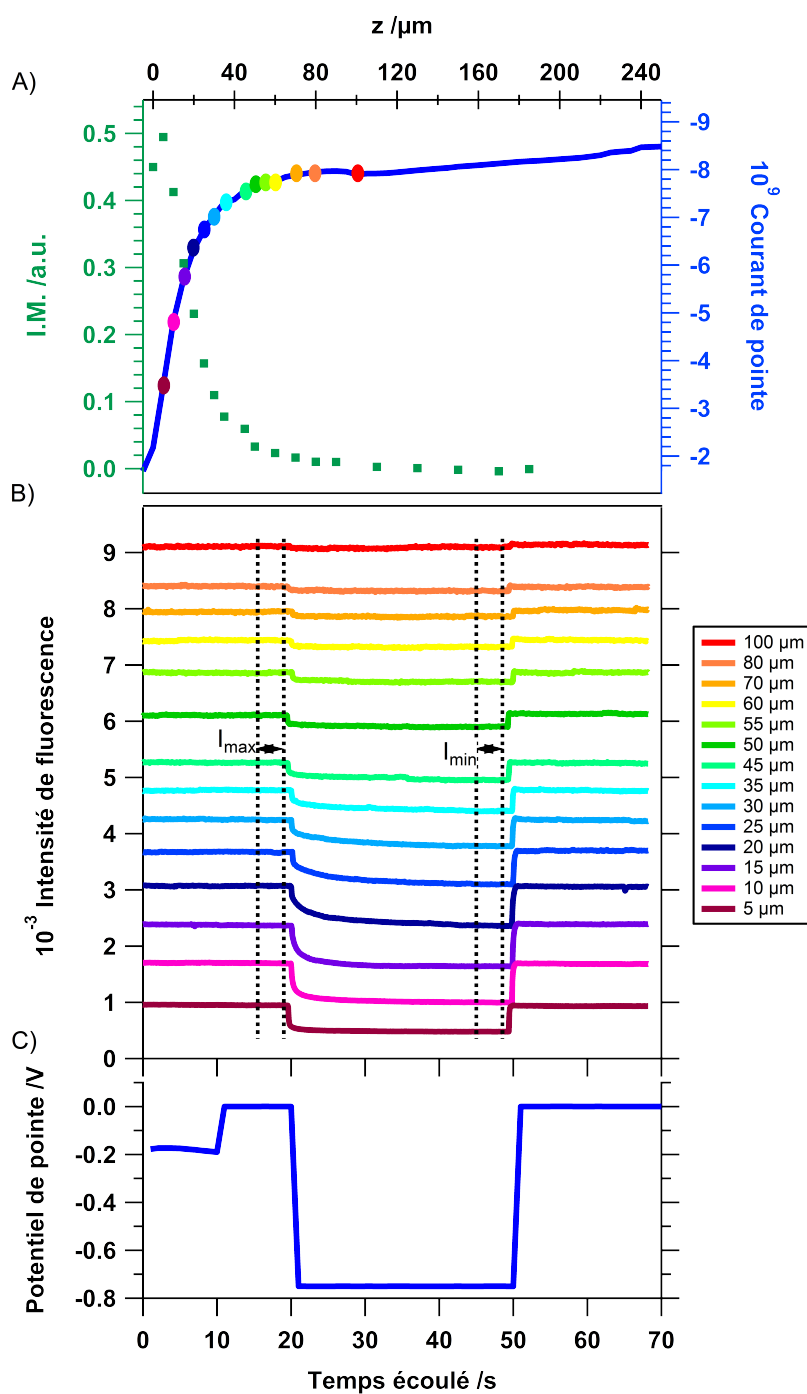


FIGURE 6.10 – Configuration feedback négatif. (A) En bleu, courbe d'approche. En vert, taux de modulation de l'intensité de fluorescence I.M. calculé à partir des chronofluorogrammes donnés en B) et représenté en fonction de la distance pointe-substrat (B) Évolution de l'intensité de fluorescence au cours de temps lorsque le signal en potentiel donné en C) est appliqué à la pointe, pour différentes positions de la pointe (repérées par un point de la même couleur sur la courbe d'approche en A) (C) Signal en potentiel appliqué à la pointe pour chaque distance pointe-substrat.

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

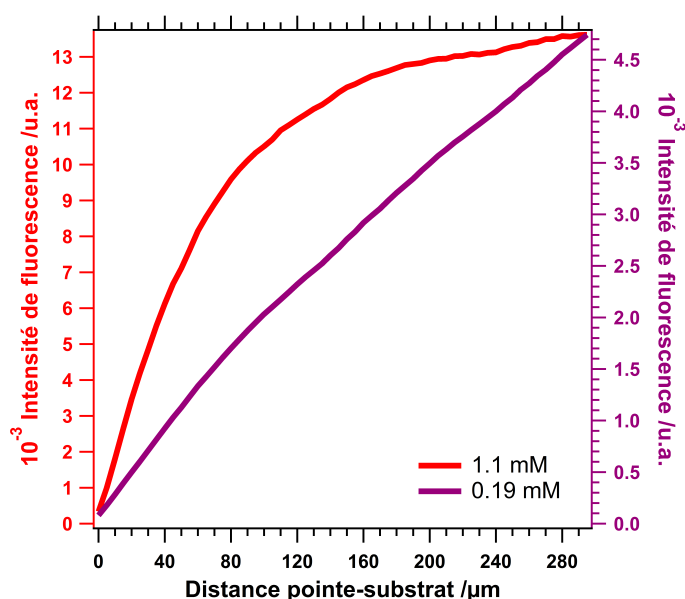


FIGURE 6.11 – Évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat en l'absence de réaction électrochimique pour deux concentrations différentes en résorufine

donnée, $I_{max}(z)$ et $I_{min}(z)$ sont définies comme les intensités de fluorescence respectivement en l'absence de réaction électrochimique et lorsque le potentiel imposé à l'UME est tel que la résorufine soit réduite localement en dihydrorésorufine (-0,75 V par rapport à Ag/AgCl). À cette distance z , le taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisé est calculé de la façon suivante :

$$I.M.(z) = \frac{I_{max}(z) - I_{min}(z)}{I_{max}(z)} \quad (6.1)$$

Au vu du graphe de $I.M.(z)$ superposé à la courbe d'approche sur la Figure 6.10 A), il apparaît clairement que l'amplitude de la modulation normalisée est effectivement sensible à la proximité de la pointe avec le substrat. En effet, nul à grande distance, le taux augmente brusquement lorsque la microélectrode se rapproche à moins de 60 μm de la lame de verre. Comme vu dans le cas de la tétrazine, cette augmentation est principalement due à la pénétration de la pointe dans la profondeur de champ de l'objectif.

En conclusion, il est également possible d'obtenir en milieu aqueux une courbe d'approche à partir d'un signal optique parallèlement à la courbe d'approche électrochimique.

Dans une certaine mesure, sa forme est plus proche de celle obtenue suite à la modélisation simple décrite dans le paragraphe 4.6 que ne l'est celle de la tétrazine, car la décroissance rapide à très courte distance n'est pas observée dans le cas de la résorufine. Étant donné la très faible variation d'indice de réfraction entre l'acétonitrile et l'eau, la différence de comportement ne peut être d'origine optique. Une autre explication résiderait dans le changement de la viscosité du milieu, l'eau étant un solvant plus visqueux.

La différence principale entre la modélisation du paragraphe 4.6 et les graphes $I.M.(z)$ de la résorufine et de la tétrazine réside dans la distance pointe-substrat

à partir de laquelle une modulation de l'intensité de fluorescence peut être détectée. En effet, alors que le taux de modulation à une distance pointe-substrat de 100 μm est de 20 % dans la modélisation, il est de 40 % dans le cas de la tétrazine et il est nul dans le cas de la résorufine. Ainsi, la courbe d'approche optique est plus sensible que la courbe électrochimique dans le cas de la tétrazine, ce qui n'est pas vrai avec la résorufine. Dans le chapitre 5, cette sensibilité accrue par l'utilisation de la tétrazine a été attribuée au caractère inhibiteur du radical anion électrogénéré. On peut donc supposer qu'une telle inhibition n'a pas lieu avec la dihydrorésorufine. De plus, l'observation selon laquelle la décroissance est plus rapide que celle de la modélisation est cohérente avec les commentaires précédents concernant le fort coefficient d'absorption de la résorufine. En effet, si les molécules à proximité de la pointe ne sont plus excitées lorsque cette dernière s'éloigne suffisamment du substrat, elles n'émettent pas de fluorescence lors de l'enregistrement de I_{max} et la différence $I_{max} - I_{min}$ tend rapidement vers 0.

Caractérisation spectrale de la modulation : visualisation des effets du potentiel et de la position de la pointe, comparaison avec la caméra

L'ensemble des signaux en fluorescence reportés jusqu'ici dans ce chapitre ont été enregistrés avec la caméra CCD qui collecte indifféremment tous les photons sur une large gamme de longueurs d'onde.

Afin de s'assurer que la modulation de l'intensité de fluorescence observée sous l'effet de la variation du potentiel de pointe est bien due à la réduction de la résorufine en dihydrorésorufine, des cinétiques de spectres d'émission ont été également enregistrées à l'aide du spectromètre. À une distance donnée, le signal en potentiel appliqué à la pointe est choisi identique à celui décrit dans le paragraphe précédent, à savoir : PCO (10 s), 0 V (10 s), -0,75 V (30 s) et 0 V (20 s). Cette même mesure est répétée à l'identique pour plusieurs positions de la pointe. La procédure d'acquisition est similaire à celle décrite dans le paragraphe 6.3.2.

Les cinétiques de spectres, obtenues pour quatre positions de la pointe, sont reportées sur la Figure 6.12. Il apparaît que, quelle que soit la distance pointe-substrat, le spectre enregistré présente un maximum vers 600 nm comme attendu pour la résorufine en solution aqueuse. De plus, une modulation de l'intensité de ce maximum est observée sous l'effet de la variation du potentiel, tandis que la forme des spectres reste inchangée au cours du temps. Cette modulation a lieu dans le sens escompté. Ainsi, lorsque le potentiel baisse de 0 V à -0,75 V, l'intensité du maximum baisse également, vraisemblablement car la concentration en résorufine diminue. Le passage du potentiel de -0,75 V à 0 V s'accompagne d'un retour à l'intensité initiale : la résorufine est régénérée. Ainsi, les cinétiques enregistrées à l'aide du spectromètre semblent prouver que la modulation de l'intensité de la fluorescence observée à la caméra sous l'effet du potentiel appliqué à la pointe est bien causée par la transformation de la résorufine. Toutefois, la modulation de l'intensité du maximum semble de plus faible amplitude qu'avec la caméra. Enfin, de la même façon qu'avec la caméra, il apparaît clairement une dépendance entre amplitude de la modulation et distance pointe-substrat.

Pour évaluer plus précisément l'amplitude de la modulation ainsi que sa dépendance avec la position de la pointe, des chronofluorogrammes peuvent également être obtenus par intégration des spectres au cours du temps, et cela pour chaque distance pointe-substrat étudiée. Puis, le taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisé $I.M_{spectres}(z)$ peut être évalué de la même façon que précédemment

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

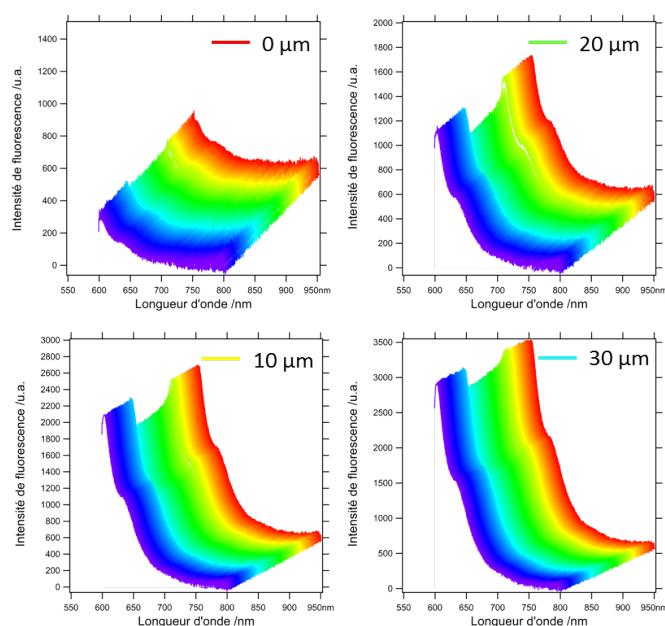


FIGURE 6.12 – Évolution des spectres d'émission au cours du temps lors de l'application à la pointe de la séquence en potentiel suivante : PCO (10 s), 0 V (10 s), -0,75 V (30 s) et 0 V (20 s).

décrit avec la caméra CCD et tracé en fonction de cette distance z . Les chronofluorogrammes ainsi obtenus sont reportés sur la Figure 6.13 B), les taux de modulation associés sur la Figure 6.13 A) (carrés vert clair). Pour comparaison, ceux obtenus avec la caméra leur sont superposés (carrés vert foncé). L'allure des deux courbes est globalement semblable : le taux de modulation augmente lorsque la pointe se rapproche du substrat (à des distances inférieures à $60 \mu\text{m}$). Toutefois, les taux de modulation sont environ deux fois plus faibles lorsqu'ils sont obtenus à partir des intensités calculées par intégration des spectres d'émission qu'à partir de celles issues de la caméra.

Afin de s'assurer que les valeurs des taux de modulation calculées avec la caméra sont bien uniquement dues à la seule conversion de la résorufine en dihydrorésorufine et d'expliquer la différence observée entre spectromètre et caméra, l'expérience faite avec la caméra est traitée en faisant varier la taille de la région d'intérêt centrée autour de la pointe.

Influence de la taille de la région d'intérêt

Comme vu précédemment, le graphe de la Figure 6.13 met en exergue des taux de modulation de l'intensité de fluorescence mesurée avec le spectromètre deux fois plus faibles que les taux de modulation de celle enregistrée avec la caméra. Un tel résultat peut s'expliquer par le fait que le spectromètre collecte la lumière au sein d'une région d'intérêt de taille fixe centrée sur la pointe environ trois fois plus grande que celle délimitée par le carré rouge utilisée jusqu'à présent pour traiter les données de la caméra (voir Figure 6.9).

Pour tester l'importance de la taille de la région d'intérêt sur l'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence normalisée, cette dernière est recalculée en fonction de la distance pointe-substrat pour deux régions d'intérêt supplémentaires,

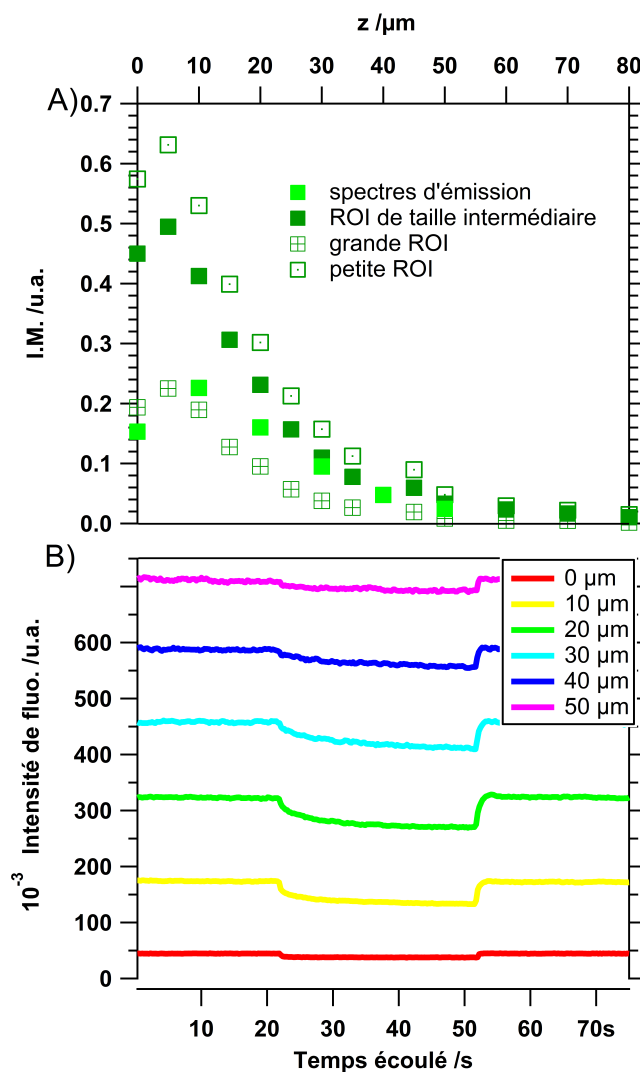


FIGURE 6.13 – A) Amplitude de modulation de l'intensité de fluorescence normalisée en fonction de la distance pointe-substrat avec le spectromètre et avec la caméra pour trois régions d'intérêt de taille différente B) Pour différentes positions de la pointe, chrono-fluorogrammes obtenus par intégration des spectres d'émission enregistrés au cours du temps

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

de tailles différentes, représentées sur la Figure 6.13 : une plus grande délimitée par le carré bleu et une plus petite délimitée par le carré orange.

Ces résultats mettent en évidence l'importance cruciale de la taille de la ROI sur la valeur du taux de modulation : plus la ROI est petite, plus le maximum du taux de modulation est grand. Ainsi, le maximum du taux de modulation est de l'ordre de trois fois plus grand au sein de la région d'intérêt délimitée par le carré orange qu'au sein de celle délimitée par le carré bleu. De plus, il est à noter la bonne superposition entre la courbe du taux de modulation extraite de la région d'intérêt délimitée par le carré bleu, supposée être plus ou moins la région de collecte du spectrophotomètre et celle issue des spectres d'émission. Il semble donc raisonnable d'attribuer la plus faible sensibilité du spectrophotomètre à la taille de sa région de collecte de la lumière.

Dans le cas de la tétrazine, l'importance de la taille de la région d'intérêt était beaucoup plus faible.

Conclusion partielle

Dans cette partie, il a été montré qu'il était possible de contrôler électrochimiquement l'émission de fluorescence de la résorufine, fluorophore électroactif soluble en milieu aqueux. Il a également été prouvé que cette modulation était sensible à la distance pointe-substrat et donc qu'elle pouvait permettre l'acquisition de courbes d'approche "optiques" dans l'eau. Seule la configuration "feedback négatif" du SECM a été étudiée. Dans la suite, on cherche à voir si, de la même façon que les courbes d'approche électrochimiques, les courbes d'approche "optiques" de la résorufine présentent, tout comme dans le cas de la tétrazine, une sensibilité à la nature du substrat. Ainsi, le mode feedback positif du SECM va être étudié.

6.3.4 Modulation de l'intensité de fluorescence en mode feedback positif

La lame de verre est remplacée dans cette configuration par une lame d'ITO. Dans le mode feedback positif, pointe et substrat peuvent tous les deux être polarisés indépendamment l'un de l'autre. Le potentiel du substrat apparaît donc comme un paramètre supplémentaire de contrôle de la modulation de fluorescence. Dans un premier temps, l'ITO est laissé à son potentiel de circuit ouvert.

Influence de la distance pointe-substrat en mode feedback positif

Courbe d'approche électrochimique Sur la Figure 6.14 A) est reportée en bleu la courbe d'approche enregistrée lorsque la pointe est polarisée à -0,75 V par rapport à Ag/AgCl et l'ITO laissé à son potentiel de circuit ouvert. Lorsque la pointe se trouve très proche du substrat, le courant augmente très fortement en valeur absolue : la rétroaction attendue de la part du substrat est donc bien observée dans le cas de la résorufine. La dihydrorésorufine formée à la pointe est réoxydée efficacement par l'ITO en résorufine.

Pour rappel, cette rétroaction n'est pas suffisamment importante dans le cas de la tétrazine lorsque le potentiel de l'ITO n'est pas contrôlé pour enregistrer la même tendance du courant de pointe. [75]

Courbe d'approche optique La procédure d'acquisition est identique à celle décrite dans le paragraphe 6.3.2. À chaque position de la pointe repérée sur la courbe

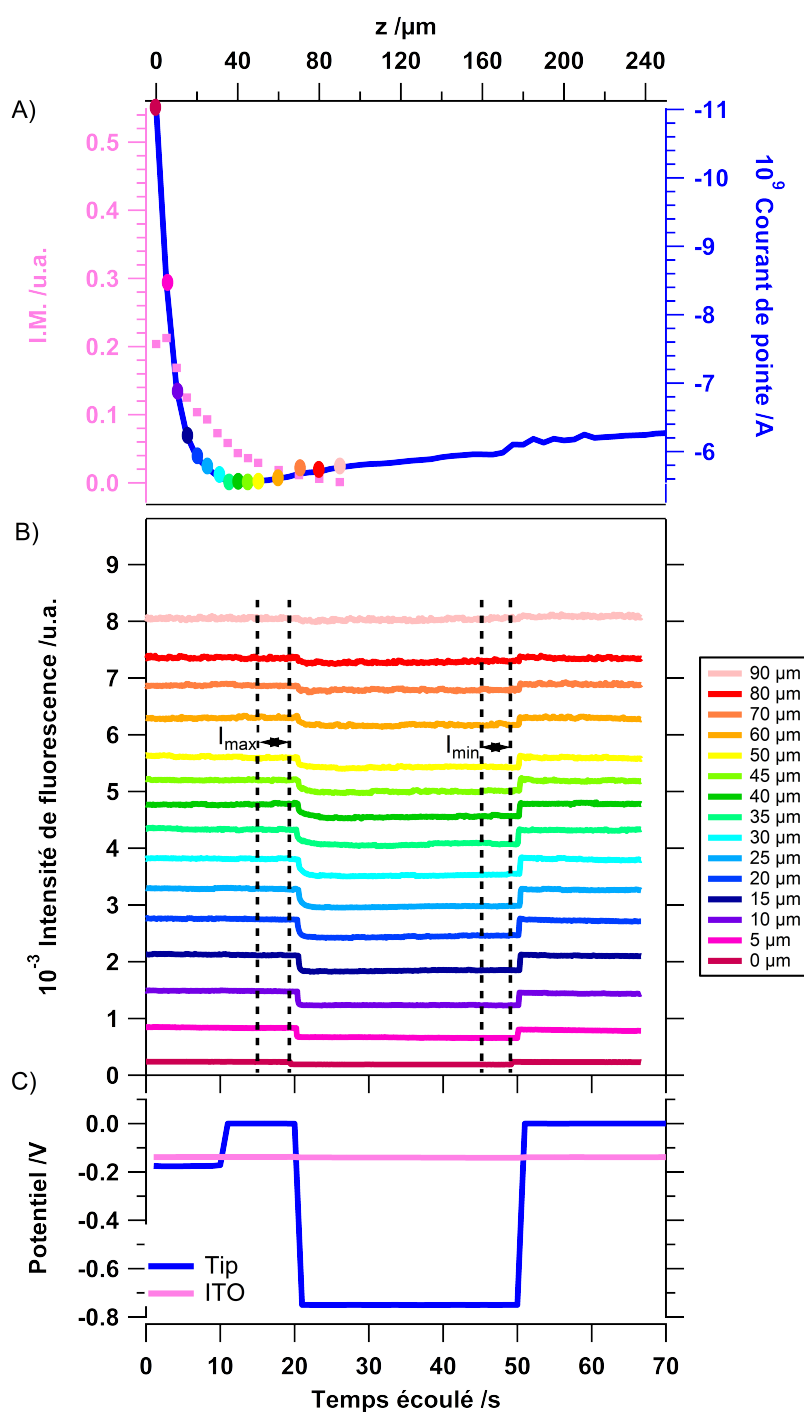


FIGURE 6.14 – Configuration feedback positif (substrat ITO PCO). (A) En bleu, courbe d’approche. En rose, taux de modulation de l’intensité de fluorescence I.M. calculé à partir des chronofluorogrammes donnés en B) et représenté en fonction de la distance pointe-substrat (B) Évolution de l’intensité de fluorescence au cours de temps lorsque le signal en potentiel donné en C) est appliqué à la pointe, pour différentes positions de la pointe (repérées par un point de la même couleur sur la courbe d’approche en A) (C) Signal en potentiel appliqué à la pointe pour chaque distance pointe-substrat.

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

d'approche électrochimique précédemment enregistrée, le même signal en potentiel qu'en mode feedback négatif est appliqué à la pointe : PCO (10 s), 0 V (10 s), -0,75 V (30 s) et 0 V (20 s). Cette séquence correspond à un cycle d'extinction - rallumage local de la fluorescence. Le substrat est quant à lui laissé à son potentiel de court-circuit. Parallèlement au travail du potentiostat, la caméra CCD enregistre l'évolution de l'intensité de fluorescence.

Un chronofluorogramme correspondant à l'évolution au cours du temps de l'intensité de fluorescence moyennée au sein de la région d'intérêt précédemment décrite (délimitée par le carré rouge sur la Figure 6.9) est donc obtenu pour chaque distance pointe-substrat étudiée et tracé sur la Figure 6.14. L'amplitude de la modulation de l'intensité de fluorescence normalisée est évaluée pour tous les chronofluorogrammes de la même façon qu'en mode feedback négatif et tracée en fonction de la distance pointe-substrat. Le graphe ainsi obtenu est superposé pour comparaison à la courbe d'approche électrochimique sur la Figure 6.14 A) (carrés roses).

Comme dans le cas feedback négatif, les différents chronofluorogrammes montrent que la fluorescence de la résorufine peut être éteinte localement au niveau de la pointe lorsque cette dernière est polarisée négativement, et qu'elle est restaurée quand le potentiel de la microélectrode est ramené à 0 V. De plus, l'amplitude de la modulation dépend également de la distance pointe-substrat. Cette impression est confirmée par la représentation graphique du taux de modulation de l'intensité de fluorescence normalisé.

L'allure de la courbe est similaire à celle obtenue en mode feedback négatif : nul à grande distance pointe-substrat, l'amplitude de la modulation augmente brusquement lorsque la pointe se rapproche du substrat jusqu'à atteindre un maximum. La principale différence entre les deux modes réside dans la valeur de ce maximum qui est environ deux fois plus faible sur ITO en circuit ouvert (0,2) que sur verre (0,5). Ce rapport entre les deux maxima est cohérent avec celui obtenu par la modélisation des modes feedback positif et négatif du couplage entre SECM et microscopie de fluorescence faite sur Comsol et décrite dans le paragraphe 4.6. Il s'explique par l'efficacité de la réaction de régénération de l'espèce émissive du couple, au niveau du substrat, à partir de l'espèce non émissive préalablement formée à la pointe (comme démontré avec la courbe d'approche électrochimique). Une telle hypothèse est cohérente avec la valeur de potentiel de circuit ouvert mesurée lors des expériences faites aux différentes distances pointe-substrat et reportées sur la Figure 6.15. Sa valeur, de l'ordre de -0,1 V, se situe effectivement après le pic de réoxydation de la dihydrorésorufine en résorufine (voir Figure 6.6). Pour une même distance pointe-substrat sur substrat isolant, cette rétroaction s'oppose donc à un état "off" fortement éteint.

Dans le cas de la tétrazine, la différence observée entre les maxima obtenus sur substrat verre et sur substrat ITO à son potentiel de circuit ouvert était également notable, mais cependant moins importante. Ce résultat est également en accord avec la courbe d'approche électrochimique enregistrée sur ITO en circuit ouvert. En effet, c'est un comportement feedback négatif qui est observé lorsque la tétrazine est utilisée comme sonde redox puisque le courant diminue (en valeur absolue) lorsque la pointe se retrouve à proximité du substrat. La rétroaction du substrat est donc peu efficace et s'oppose moins à l'extinction de fluorescence par la pointe. Une polarisation de l'ITO à 1 V permet par ailleurs de retrouver une courbe d'approche caractéristique d'un feedback positif et le maximum du taux de modulation est effectivement, dans ses conditions, deux fois plus faibles que sur substrat verre.

En conclusion, il a été démontré que, dans le cas de la résorufine également, il était possible d'établir des courbes d'approche "optiques" dans les configurations

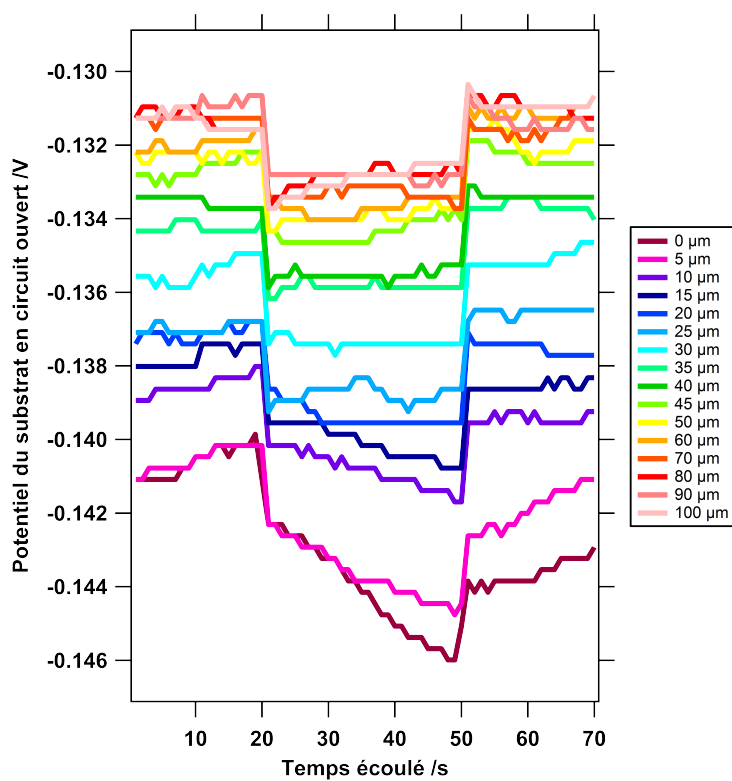


FIGURE 6.15 – Pour différentes positions de la pointe, potentiel de l’ITO mesuré en circuit ouvert lors de l’application de la séquence en potentiel appliquée à la pointe

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

feedback négatif et feedback positif et que ces courbes, de la même façon que les courbes d'approche électrochimiques, étaient sensibles à la nature du substrat. De plus, si la régénération de la résorufine au substrat est effectivement responsable du taux de modulation plus faible sur ITO en circuit ouvert que sur verre, il doit être possible de contrôler l'amplitude de la modulation, de la même façon que décrit dans le chapitre avec la tétrazine, par la polarisation du substrat ITO. Dans la suite, on étudie donc l'influence de ce paramètre supplémentaire qu'est le potentiel du substrat.

Influence du potentiel du substrat sur la modulation de l'intensité de fluorescence normalisée

Dans cette partie, le substrat est une lame d'ITO dont on contrôle le potentiel.

Courbe d'approche électrochimique Sur la Figure 6.16 A) est reportée la courbe d'approche électrochimique enregistrée lorsque la pointe est polarisée à $-0,75$ V par rapport à Ag/AgCl tandis que le potentiel de l'ITO est porté à $-0,5$ V. Pour comparaison, la même courbe d'approche obtenue lorsque l'ITO est laissé à son potentiel de circuit ouvert lui est superposée ainsi que celle obtenue sur substrat isolant.

Il apparaît clairement sur le graphe que, quand l'ITO est polarisé à $-0,5$ V par rapport à Ag/AgCl, le comportement observé change : alors qu'en circuit ouvert, la proximité de la pointe génère une augmentation drastique du courant à l'UME, ce dernier tend, dans ce cas, vers 0. La voltamétrie cyclique de la Figure 6.6 permet d'expliquer un tel comportement : le pic de courant anodique correspondant à l'oxydation de la dihydrorésorufine se situe à $-0,42$ V. Une polarisation de l'ITO à $-0,5$ V est donc suffisamment basse pour empêcher – ou au moins limiter fortement – la régénération de la résorufine au niveau du substrat. Il en résulte donc un feedback négatif similaire à celui observé sur verre.

Courbe d'approche optique Sur la Figure 6.16 B) est reportée la courbe d'approche "optique" calculée à partir des chronofluorogrammes enregistrés lorsque l'ITO est polarisé à $-0,5$ V par rapport à Ag/AgCl, tous les autres paramètres de l'acquisition restant inchangés par ailleurs (procédure d'acquisition telle que décrite dans le paragraphe 6.3.2, séquence en potentiel appliquée à la pointe décrite dans le paragraphe 6.3.3, etc.). Pour comparaison, les courbes d'approche "optiques" sur ITO à son potentiel de circuit ouvert et sur verre lui sont superposées.

Cette courbe d'approche "optique" obtenue sur ITO polarisé à $-0,5$ V semble cohérente avec celle, électrochimique, décrite précédemment. En effet, si le maximum de l'amplitude de modulation de l'intensité de fluorescence normalisée était de 0,2 sur ITO en circuit ouvert, il est proche de celui obtenu sur substrat isolant (environ 0,5) lorsque le potentiel de l'ITO est porté à $-0,5$ V. Ce dernier est à une valeur telle que la régénération de la résorufine émettrice de fluorescence est limitée : il est donc plus facile d'éteindre au niveau de la pointe. L'évolution au cours du temps des courants de réduction enregistrés à la pointe, parallèlement aux chronofluorogrammes, pour les différentes positions de la pointe dans les trois configurations (verre, ITO polarisé à $-0,5$ V et ITO PCO), est bien cohérente avec un feedback négatif pour les deux premiers cas et un feedback positif pour le dernier (voir Figure 6.17).

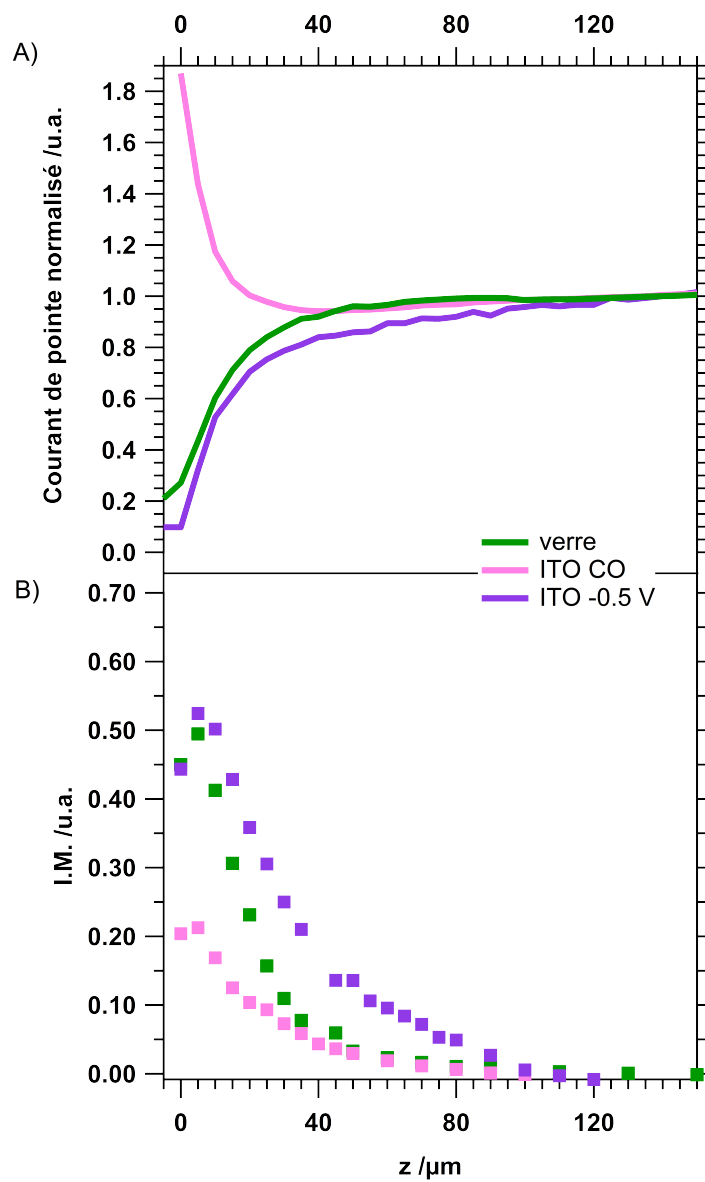


FIGURE 6.16 – Comparaison (A) des courants de pointe et (B) des taux de modulation de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance pointe-substrat sur trois types de substrat : verre, ITO au potentiel de circuit ouvert et ITO polarisé à -0,5 V

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

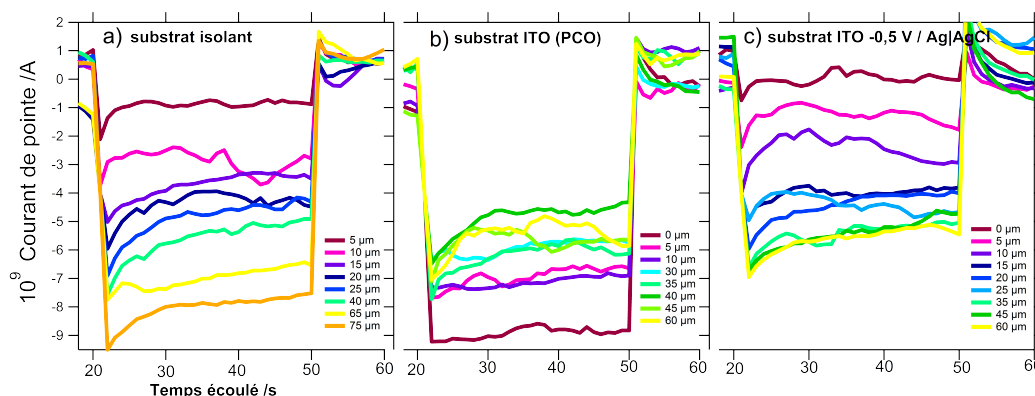


FIGURE 6.17 – Courants de pointe enregistrés pour différentes positions de la pointe lors qu'elle est polarisée à -0,7 V dans les trois configurations : a) substrat isolant, b) ITO à son potentiel de circuit ouvert, c) ITO polarisé à -0,5 V

Conclusion partielle

Il a été montré que, tout comme avec la tétrazine en solvant organique, il était possible de moduler électrochimiquement la fluorescence de la résorufine et que l'amplitude de cette modulation était sensible à la présence d'un substrat. Ainsi, des courbes d'approche "optiques" ont pu être obtenues en mode feedback négatif et en mode feedback positif. De la même façon que les courbes électrochimiques, elles s'avèrent sensibles à la nature du substrat ainsi qu'à son potentiel. En vue d'éventuelles applications, il est important de noter que la chute de fluorescence consécutive à la polarisation suffisamment négative de l'électrode pour "éteindre" est rapide. Le temps requis pour acquérir chaque chronofluorogramme peut donc tout à fait être réduit à quelques secondes.

Dans la suite, la configuration génération au substrat-collecte à la pointe, déjà étudiée avec la tétrazine, est également testée avec la résorufine.

6.3.5 Mode génération au substrat - collecte à la pointe et détection par fluorescence

Mise en évidence de la détection par fluorescence : influence des potentiels

La dernière configuration testée est le mode génération au substrat - collecte à la pointe. Comme précédemment décrit avec la tétrazine en tant que sonde redox, le substrat ITO peut être polarisé suffisamment négativement pour générer la forme réduite non fluorescente de la résorufine (la dihydrorésorufine), ce qui doit conduire à une extinction globale de la fluorescence. Puis, la pointe est utilisée pour collecter l'espèce ainsi formée au substrat. Par l'application d'un potentiel adéquat, elle doit réoxyder la dihydrorésorufine si celle-ci est présente dans sa demi-sphère de diffusion. Théoriquement, dans le cadre du couplage de microscopies décrit, le signal de détection devient double : la régénération de la résorufine permet d'enregistrer non seulement un courant d'oxydation à la pointe, mais également une augmentation locale de la fluorescence. Les expériences proposées par la suite vise à étudier cette double collecte.

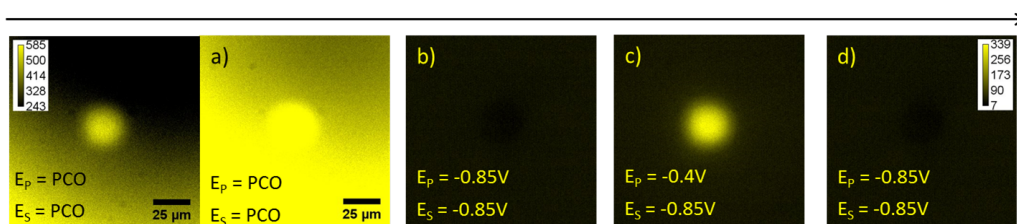


FIGURE 6.18 – Sélection d'images de la pointe enregistrées avec la caméra CCD quand son potentiel varie selon la séquence suivante : pco (10 s), -0,85 V (10 s), -0,4 V (30 s) et -0,85 V (20 s) et celui du substrat selon la séquence : pco (5 s), -0,85 V (55 s). Les images (a), (b), (c) et (d) sont enregistrées respectivement à $t = 4, 13, 45$ et 65 s. Distance pointe-substrat $< 5 \mu\text{m}$.

Les signaux en potentiel effectivement utilisés à la pointe et au substrat sont reportés sur la Figure 6.19 C). Ainsi, le substrat est laissé à son potentiel de court-circuit pendant 5 secondes. Puis il est polarisé à - 0.85 V par rapport à Ag/AgCl pendant 65 secondes. Quant à la pointe, elle passe de son potentiel de circuit ouvert à - 0.85 V au bout de 10 secondes. La collecte est assurée au bout de 10 secondes supplémentaires par une polarisation à - 0,4 V pendant 30 secondes. Enfin, son potentiel est ramené à - 0.85 V.

La Figure 6.18 montre une sélection des images de fluorescence enregistrées avec la caméra CCD parallèlement à l'application de cette série de potentiels pour une distance pointe-substrat inférieure à $5 \mu\text{m}$. Les deux premières images (notées a) correspondent à l'état allumé. Puis, substrat et pointe sont polarisés suffisamment négativement pour réduire la résorufine fluorescente en dihydrorésorufine : la fluorescence chute globalement comme espéré (image b). En portant le potentiel de la pointe à -0,4 V, il est attendu que la pointe détecte la présence de dihydrorésorufine en l'oxydant localement en résorufine fluorescente. L'image c) montre effectivement un point brillant localisé sous la microélectrode. Finalement, l'état éteint est retrouvé par le retour du potentiel de pointe à -0,85 V par rapport à Ag/AgCl. Ainsi, cette première expérience montre qu'il est possible de détecter la présence de dihydrorésorufine par un signal optique déclenché par la polarisation de la microélectrode. Il est à noter que le contraste enregistré sur l'image c) avec la résorufine semble meilleur que dans le cas de la tétrazine. Cela est probablement dû à la grande différence de coefficient d'extinction molaire des deux molécules.

Influence de la distance pointe-substrat sur le signal de collecte

Ces mêmes signaux en potentiel sont ensuite appliqués selon la procédure d'acquisition décrite dans le paragraphe 6.3.2 pour différentes distances pointe-substrat. En parallèle, la caméra CCD enregistre le chronofluorogramme associé à chacune de ces positions. Les signaux de collecte mesurés – à savoir le courant de pointe et l'intensité de fluorescence (moyennée dans la région d'intérêt limitée par le carré rouge) – sont donnés sur la même Figure 6.19 en A) et B). Les courbes de courant et de fluorescence de même couleur ont été enregistrées à la même distance pointe-substrat. Cette distance est indiquée sur la courbe d'approche (en encart sur la Figure 6.19) à l'aide d'un point de la même couleur.

6.3. Utilisation du couple résorufine-dihydrorésorufine dans un couplage entre SECM et microscopie de fluorescence (épifluorescence)

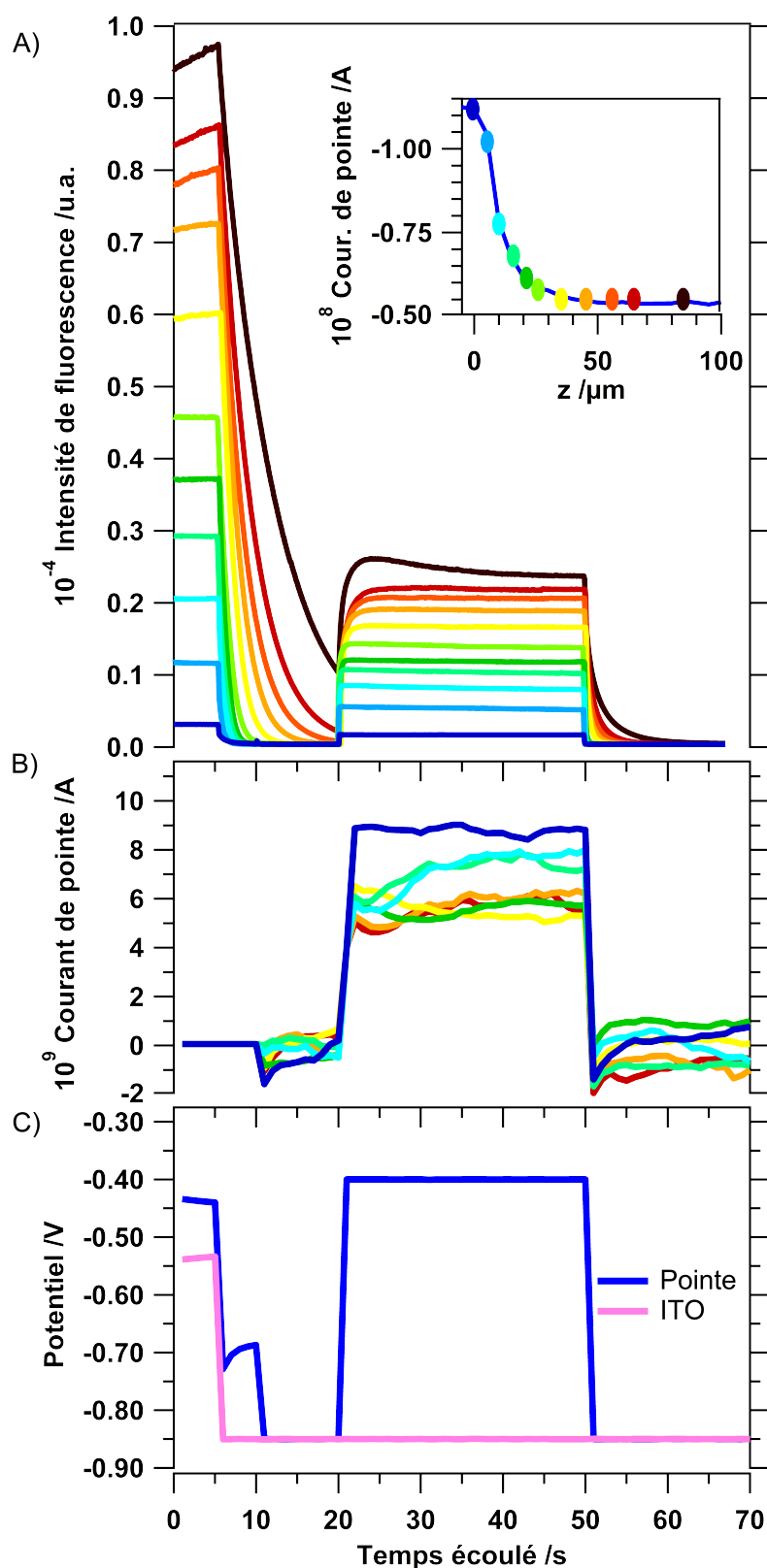


FIGURE 6.19 – Intensités de fluorescence (en A) et courants traversant l’Ultra-MicroElectrode (en B) enregistrés parallèlement à l’application des signaux en potentiel décrits en C, pour différentes positions de la pointe représentées par des points sur la courbe d’approche en encart. La couleur du point est celle des deux courbes enregistrées à cette distance pointe-substrat. (C) Signaux en potentiel appliqué à la pointe et au substrat pour chaque distance pointe-substrat.

Étude du signal de collecte électrochimique On constate que les courants de pointe sont globalement constants (Figure 6.19 B) : ils ne dépendent que très faiblement de la distance pointe-substrat. Ces résultats peuvent sembler en contradiction avec ceux reportés par d'autres équipes, notamment celle de Bard ... Toutefois, les temps considérés ici sont longs : la collecte à la pointe a lieu 15 secondes après le début de la polarisation du substrat déclenchant la génération de l'espèce sondée. Étant donné l'ordre de grandeur des distances pointe-substrat considérées, cette dernière a le temps de diffuser jusqu'à la pointe et au-delà. En effet, par l'utilisation de la formule $\sqrt{\pi Dt}$ avec D le coefficient de diffusion de la résorufine ($D = 2.10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$), l'épaisseur de la couche de diffusion au substrat est estimée de l'ordre de la centaine microns au bout de 15 secondes de polarisation. De plus, le diamètre de la pointe étant du même ordre de grandeur que les distances pointe-substrat considérées, il est peu probable d'avoir une bonne résolution sur les courants mesurés.

Étude du signal de collecte optique À l'inverse, l'étude des chronofluorogrammes de la partie A) de la Figure 6.19 montre une dépendance entre intensité de fluorescence mesurée et position de la pointe, et cela à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, de la même façon que pour les expériences en mode feedback, les intensités de fluorescence initiales (pendant les cinq premières secondes, en l'absence de réaction électrochimique) augmentent lorsque la pointe s'éloigne du substrat. La raison est identique à celle avancée précédemment : la pointe pénètre plus ou moins dans la profondeur de champ du microscope optique.

Puis, quelle que soit la position de la microélectrode, l'intensité de fluorescence chute au bout de 5 secondes avec la polarisation de l'ITO à - 0,85 V : l'extinction globale de la fluorescence résulte de la conversion au substrat de la résorufine fluorescente en dihydrorésorufine non fluorescente. Cependant, il est à noter que si cette chute débute bien au bout de 5 secondes pour toutes les distances pointe-substrat, la décroissance est d'autant plus lente que cette distance est grande : la valeur seuil de 310 u.a., par exemple, est atteinte dans l'intervalle 5-20 s au bout d'une durée d'autant plus longue que la pointe ne s'éloigne du substrat. Autrement dit, il faut de plus en plus de temps pour éteindre le volume de solution compris entre la pointe et le substrat. On visualise donc probablement ici le front de diffusion de la dihydrorésorufine formée à l'ITO. Cette hypothèse est vérifiée par la relativement bonne régression linéaire, représentée sur le graphe de la Figure 6.20, de la représentation graphique de la distance pointe-substrat en fonction de la racine carrée du temps au bout duquel, à cette distance, il y a extinction presque totale du volume de solution compris entre la pointe et le substrat (valeur arbitraire de l'intensité de fluorescence prise à 310 u.a.).

Enfin, la polarisation de la pointe à - 0,4 V, au bout de 20 secondes, se traduit par une augmentation locale de la fluorescence : la dihydrorésorufine, formée globalement au niveau du substrat, est collectée par la pointe qui la réoxyde en résorufine fluorescente. On peut envisager cette fluorescence comme un moyen de détection supplémentaire de l'espèce générée au substrat.

La période de collecte se caractérise par une intensité de fluorescence stable dont la valeur dépend directement de la position de la pointe : elle augmente lorsque la pointe s'éloigne. Une telle tendance s'explique par l'augmentation qui en découle du volume de solution sur lequel la pointe réalise la collecte. La sensibilité de la méthode est donc meilleure lorsque la distance pointe-substrat augmente. Ce raisonnement n'est valable que parce que l'épaisseur de la couche de diffusion est plus

6.4. Conclusion et perspectives

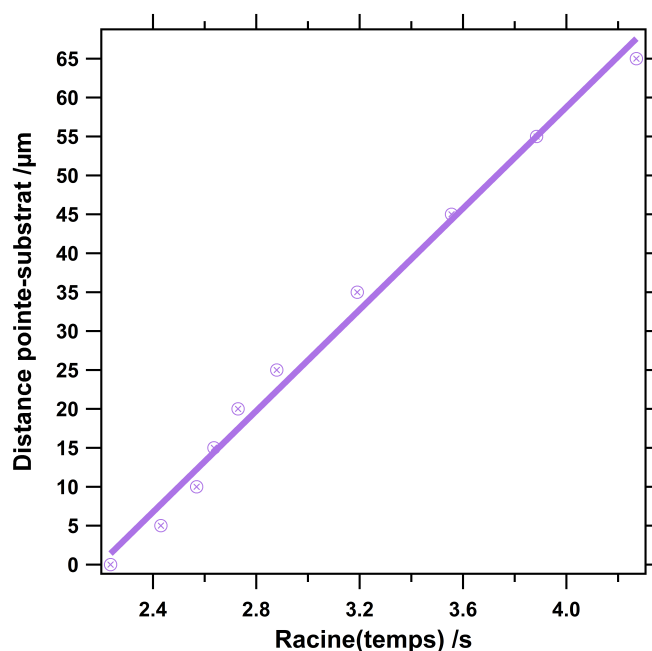


FIGURE 6.20 – Distance pointe-substrat en fonction de la racine carré du temps au bout duquel l'intensité de fluorescence chute et atteint la valeur de 310 u.a. dans la période 5 s -20 s en A) de la Figure 6.19 suite à la polarisation du substrat (à $t = 5$ s)

grande que les distances pointe-substrat considérées (sur un tel intervalle de temps, distances inférieures à une centaine de microns).

L'efficacité de la collecte peut, par exemple, être évaluée par le calcul du rapport $I_{collecte}/I_{max}$, I_{max} et $I_{collecte}$ étant respectivement l'intensité de fluorescence initiale et l'intensité de fluorescence mesurée pendant la période de collecte. La Figure 6.21 montre comment ce rapport évolue avec la distance pointe-substrat. Ainsi, alors que la valeur du courant électrochimique mesurée reste globalement identique à toutes les distances pointe-substrat considérées, le rapport $I_{collecte}/I_{max}$ augmente lorsque la pointe se rapproche du substrat. Dans ce cas également, la détection optique apporte des informations sur la distance pointe-substrat dans une zone où l'électrochimie n'est pas suffisamment sensible.

6.4 Conclusion et perspectives

En conclusion, il a été montré qu'il était possible d'utiliser le couplage SECM-microscopie de fluorescence en utilisant la résorufine en tant que sonde électrofluorochrome. Elle est fortement fluorescente et peut être réduite réversiblement en dihydrorésorufine qui est non émettrice. Ces caractéristiques permettent d'obtenir des résultats dans trois configurations du SECM : le mode feedback négatif, le mode feedback positif et le mode génération au substrat-collecte à la pointe. La sensibilité de la résorufine à la présence du substrat, en configuration feedback, est cependant

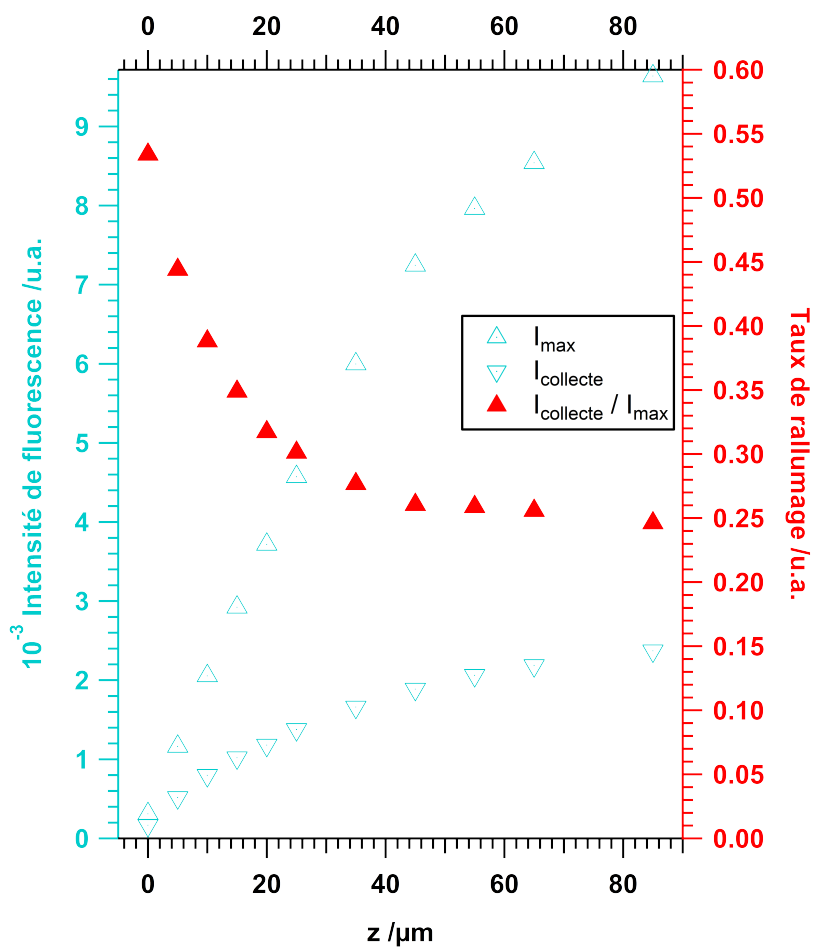


FIGURE 6.21 – Intensités de fluorescence enregistrées avant polarisation de l'ITO (triangles bleus, I_{max}) et pendant la période de collecte (triangles bleus, I_{collecte}) qui commence au bout de 20 secondes et se termine au bout de 50 secondes (voir Figure 6.19), ratio $I_{\text{collecte}}/I_{\text{max}}$ (triangles rouges) en fonction de la distance pointe-substrat

6.4. Conclusion et perspectives

moins que celle de la tétrazine, probablement car il n'y a pas d'inhibition de la fluorescence de la résorufine par la dihydrorésorufine électrogénérée.

L'utilisation d'une sonde soluble en milieu aqueux ouvre ainsi de nouvelles possibilités d'application de notre méthode de caractérisation, notamment pour l'étude de milieux biologiques. Dans une telle perspective, des études sont actuellement en cours pour rendre le dispositif sensible aux variations de pH. Pour ce faire, la flavine mononucléotide est utilisée en tant que sonde électrofluorochrome car l'intensité de l'émission de fluorescence de cette molécule dépend fortement du pH. Par ailleurs, cette molécule est d'un grand intérêt biologique.

Conclusion

Les travaux que nous avons relatés dans ce manuscrit ont été consacrés à étendre le champ de l'électrofluorochromisme en participant :

- au développement de l'électrofluorochromisme solide avec la préparation d'électrodes modifiées.
- au développement instrumental d'une technique couplant microscopie électrochimique à balayage et microscopie de fluorescence par l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome.

Ainsi, les chapitres 2 et 3 ont décrit la préparation d'électrodes transparentes fonctionnalisées respectivement par des films de polymères incorporant des tétrazines comme groupe pendant et par des monocouches de tétrazines siloxanes. Dans les deux cas, l'objectif était d'obtenir des électrodes fluorescentes dont il est possible de moduler les propriétés d'émission grâce au potentiel qui leur est appliqué. L'électrofluorochromisme de ces électrodes a pu être mis en évidence dans un montage déjà présent au laboratoire couplant cellule électrochimique à trois électrodes et microscope de fluorescence en utilisant l'électrode modifiée en tant qu'électrode de travail. Dans le cas des polymères, un contrôle croisé de la luminescence de la chaîne et de celle des unités tétrazines a été observé. Toutefois, le contraste de la modulation reste faible probablement du fait d'effets de suroxydation de la chaîne. Dans le cas de la monocouche, la modulation de sa fluorescence a également pu être mise en évidence et sa corrélation avec le signal électrochimique est attestée par la variations de plusieurs paramètres sur le signal en potentiel : valeur à la réduction, durée des cycles, etc.

Dans les chapitres 4, 5 et 6 a été décrit le couplage entre un microscope de fluorescence et un microscope électrochimique à balayage grâce à l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome. La preuve de concept est rapportée dans le chapitre 4 avec la chlorométhoxytétrazine en tant que sonde, dans les configurations feedback et génération-collecte classiques du microscope électrochimique. Ainsi, il a été montré qu'il était possible de construire des courbes d'approche optiques à partir de l'amplitude de la modulation du signal de la fluorescence de la sonde, sous l'action de la polarisation de la pointe. En effet, cette amplitude, tout comme le courant électrochimique, varie avec la distance pointe-substrat, la nature du substrat ou encore la valeur du potentiel de ce dernier s'il est conducteur. La courbe obtenue est même plus sensible que celle construite à partir du courant de pointe dans la mesure où elle "détecte" le substrat pour des distances pointe-substrat plus grandes. Dans le mode génération-collecte, il a été montré que la fluorescence pouvait être utilisée comme un signal de détection de l'espèce générée au substrat et que, dans certaines conditions, elle était une fois encore plus sensible que le courant de pointe. Dans le chapitre 5, il est décrit comment ce montage peut être adapté pour des mesures de fluorescence résolues en temps. La durée de vie τ est présentée comme une source d'information supplémentaire. À titre d'exemple, elle est utilisée pour élucider le mécanisme d'inhibition de la fluorescence de la sonde par l'espèce électrogénérée.

Enfin, une modélisation par éléments finis de l'expérience de couplage des deux microscopies est proposée. Elle met en évidence le rôle de l'inhibition sur l'information délivrée par cette technique. Elle offre notamment une explication plausible à la sensibilité supérieure des courbes d'approche optiques.

Une suite logiquement envisagée pour ces travaux est la réunion des deux aspects, électrodes modifiées et couplage des microscopies. En effet, le dispositif couplant les microscopies électrochimique et de fluorescence mis au point pourrait être utilisé pour adresser localement le degré d'oxydation de molécules électrofluorochromes immobilisées cette fois-ci sur un substrat transparent isolant à l'aide de l'ultramicroélectrode. Le bon adressage serait attesté directement par la modulation locale de la fluorescence visualisée à l'aide de la caméra. Quelques essais ont déjà été effectués dans ce sens. Ainsi, des lames de verre ont été fonctionnalisées par la monocouche de tétrazines selon le même protocole que précédemment utilisé avec les substrats d'ITO. La présence de la monocouche a été attestée par des mesures de spectroscopie infra-rouge. L'étude de ces substrats sur le dispositif couplant microscopie électrochimique à balayage et microscopie de fluorescence est en cours. Deux stratégies sont envisagées : l'une utilisant un médiateur redox entre la pointe et la monocouche, l'autre basée sur la proximité pointe-monocouche et l'effet tunnel. La difficulté de la première stratégie consiste à trouver un médiateur redox non fluorescent ou, au moins, dont l'amplitude de la modulation de la fluorescence sous l'effet du potentiel est négligeable devant celle de la monocouche. La difficulté de la seconde réside dans la mise en œuvre pratique de l'expérience du fait du blanchiment rapide des espèces émettrices. Elle a cependant déjà permis d'observer à la caméra l'extinction locale de la fluorescence de la monocouche sous l'effet de la polarisation de la pointe du microscope électrochimique. Des essais ultérieurs devraient permettre d'étudier, par exemple, si cette réaction est réversible ou non, ou encore s'il est possible de balayer avec la pointe et donc d'"écrire" sur la surface. Enfin, après extinction locale, nous pourrions utiliser une pointe de plus petit diamètre pour ensuite balayer la zone ainsi réduite tout en polarisant la pointe pour comparer l'image optique de la fluorescence et l'image électrochimique.

Outre l'application aux électrodes modifiées, et plus généralement au surface, d'autres perspectives sont envisageables pour la technique de couplage entre la microscopie de fluorescence et la microscopie électrochimique à balayage. Ce couplage permet de contrôler et d'observer les inhomogénéités spatiales de la fluorescence et de l'électrochimie. Dans la suite, l'objectif serait d'améliorer cette double résolution spatiale d'une part par l'utilisation de microélectrodes de diamètre plus faible (par exemple de l'ordre du micron), d'autre part par l'application des configurations décrites dans le premier chapitre, à savoir les configurations confocale et TIRF. A cet effet, une adaptation du montage est actuellement envisagée avec l'utilisation de deux axicônes pour obtenir la réflexion totale à travers un objectif de grande ouverture numérique.

Dans le dernier chapitre, nous avons appliqué la méthode de couplage entre la microscopie de fluorescence et la microscopie électrochimique à balayage au milieu aqueux. Nous avons utilisé pour cela la résorufine en tant que sonde électrofluorochrome pour d'éventuelles applications aux milieux biologiques. Dans la suite de cette idée, l'étude de l'influence du pH sur l'amplitude de la modulation de fluorescence est également envisagée. Il s'agirait donc de reproduire ces résultats en faisant varier le pH de la solution soit avec la résorufine, soit avec la flavine mononucléotide, puisque l'intensité de l'émission de cette sonde électrofluorochrome est déjà connue comme fortement dépendante du pH.

Conclusion

D'autres perspectives, enfin, concernent plus particulièrement les électrodes modifiées et leurs éventuelles applications. Dans la continuité des travaux effectués sur les monocouches, une configuration similaire est envisagée pour étudier l'influence d'éventuels effets plasmoniques sur la modulation électrochimique de la fluorescence. Pour cela, des nanobatonnets d'or ont été déposés sur des substrats d'ITO. Les substrats ainsi obtenus ont été fonctionnalisés par la tétrazine siloxane selon le même protocole que celui décrit dans le chapitre 3. D'après les études en voltamétrie cyclique de tels échantillons, il semblerait que la tétrazine soit immobilisée comme attendue suite au traitement. De plus, l'étude de ces échantillons sur le couplage cellule électrochimique à trois électrodes - microscopie de fluorescence révèle qu'il est également possible de moduler la fluorescence de la monocouche par le contrôle électrochimique du potentiel appliqué au substrat. Des études sont en cours pour tester l'influence des plasmons sur cette modulation. Pour cela une modification du montage par l'utilisation de deux sources d'excitation (une pour le fluorophore et une pour le plasmon) est envisagée. Une autre possibilité serait de moduler la fluorescence des tétrazines par la génération d'électrons chauds.

Bibliographie

- [1] Hanan AL-KUTUBI et al. « Electrofluorochromic systems : Molecules and materials exhibiting redox-switchable fluorescence ». In : *European Polymer Journal* 83 (2016), p. 478–498. ISSN : 0014-3057. DOI : [10.1016/j.eurpolymj.2016.04.033](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.04.033). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.04.033>.
- [2] Christian AMATORE, Stéphane ARBAULT et Yong CHEN. « Coupling of Electrochemistry and Fluorescence Microscopy at Indium Tin Oxide Microelectrodes for the Analysis of Single Exocytotic Events ». In : *Angewandte Chemie* 45 (2006), p. 4000–4003. DOI : [10.1002/anie.200600510](https://doi.org/10.1002/anie.200600510).
- [3] P AUDEBERT et F MIOMANDRE. « Electrofluorochromism : from molecular systems to set-up and display ». In : *Chemical Science* 4 (2013), p. 575–584. DOI : [10.1039/c2sc21503a](https://doi.org/10.1039/c2sc21503a).
- [4] Pierre AUDEBERT, Fabien MIOMANDRE et Gilles CLAVIER. « First example of an electroactive polymer issued from an oligothiophene substituted tetrazine ». In : *Electrochemistry Communications* 6 (2004), p. 144–147. DOI : [10.1016/j.elecom.2003.11.001](https://doi.org/10.1016/j.elecom.2003.11.001).
- [5] Pierre AUDEBERT et al. « Synthesis and Properties of New Tetrazines Substituted by Heteroatoms : Towards the World s Smallest Organic Fluorophores ». In : *Chemistry : a European Journal* 11 (2005), p. 5667–5673. DOI : [10.1002/chem.200401252](https://doi.org/10.1002/chem.200401252).
- [6] Amy AUSTIN et al. « A Density Functional with Spherical Atom Dispersion Terms ». In : *Journal of Chemical Theory and Computation* 8 (2012), p. 4989–5007. DOI : [10.1021/ct300778e](https://doi.org/10.1021/ct300778e).
- [7] Allen J BARD et al. « Scanning Electrochemical Microscopy . 12 . Theory and Experiment of the Feedback Mode with Finite Heterogeneous Electron-Transfer Kinetics and Arbitrary Substrate Size C0-1 ». In : *Journal of Physical Chemistry* 14 (1992), p. 1861–1868. DOI : [10.1021/j100183a064](https://doi.org/10.1021/j100183a064).
- [8] Fethi BEDOUI, Sophie GRIVEAU et Alain PAILLERET. « Microscopie électrochimique ». In : *Techniques de l'ingénieur* 4 (2009), P2 132.
- [9] Andrew C. BENNISTON et al. « Redox-Controlled Fluorescence Modulation in a BODIPY-Quinone Dyad ». In : *European Journal of Organic Chemistry* (2008), p. 2705–2713. DOI : [10.1002/ejoc.200800191](https://doi.org/10.1002/ejoc.200800191).
- [10] Sihame BKHACH et al. « Thienylene vinylene dimerization : from solution to self-assembled monolayer on gold ». In : *Nanoscale* 10 (2018), p. 1613–1616. DOI : [10.1039/c7nr07238d](https://doi.org/10.1039/c7nr07238d).
- [11] Frank-mario BOLDT et al. « Real-Time pH Microscopy down to the Molecular Level by Combined Scanning Electrochemical Microscopy / Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy microscopy (SECM) and single-molecule fluorescence ». In : *Analytical Chemistry* 76.13 (2016), p. 3473–3481. DOI : [10.1021/ac049635x](https://doi.org/10.1021/ac049635x).

- [12] Laurent BOUFFIER et Thomas DONEUX. « Coupling electrochemistry with in situ fluorescence (confocal) microscopy ». In : *Current Opinion in Electrochemistry* 6.1 (2017), p. 31–37. ISSN : 2451-9103. DOI : [10.1016/j.coelec.2017.06.015](https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.06.015). URL : <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.06.015>.
- [13] Walter J BOWYER et al. « Fluorescence Imaging of the Heterogeneous Reduction of Oxygen ». In : *Analytical Chemistry* 68.13 (2009), p. 2005–2009. DOI : [10.1021/ac9512259](https://doi.org/10.1021/ac9512259).
- [14] Jannu R CASANOVA-MORENO et Dan BIZZOTTO. « What Happens to the Thiolates Created by Reductively Desorbing SAMs? An in Situ Study Using Fluorescence Microscopy and Electrochemistry ». In : *Langmuir* 29 (2013), p. 2065–2074. DOI : [10.1021/la305170c](https://doi.org/10.1021/la305170c).
- [15] Jeng-da CHAI et Martin HEAD-GORDON. « Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom – atom dispersion corrections w ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 10 (2008), p. 6615–6620. DOI : [10.1039/b810189b](https://doi.org/10.1039/b810189b).
- [16] Shun-wen CHENG et al. « Polymer Chemistry based on aromatic polyamides with AIE-active ». In : *Polymer Chemistry* 9 (2018), p. 4364–4373. DOI : [10.1039/c8py00809d](https://doi.org/10.1039/c8py00809d).
- [17] Martina CISKOVA et al. « Electrochemical switching fluorescence emission in rhodamine derivatives ». In : *Electrochimica Acta* 260 (2018), p. 589–597.
- [18] Gilles CLAVIER et Pierre AUDEBERT. « s -Tetrazines as Building Blocks for New Functional Molecules and Molecular Materials ». In : *Chemical Reviews* 110 (2010), p. 3299–3314.
- [19] « Combined Scanning Electrochemical and fluorescence microscopies using a tetrazine as a single redox and luminescent (electrofluorochromic) probe ». In : *Chemical Science* 9 (2018), p. 5897–5905.
- [20] Richard G COMPTON, Adrian C FISHER et R Geoffrey WELLINGTON. « A Thin-Layer Electrode Cell for Fluorescence Measurements on Electrogenerated Intermediates ». In : *Electroanalysis* 3 (1991), p. 27–29.
- [21] Richard G COMPTON et R Geoffrey WELLINGTON. « Spectrofluorimetric Hydrodynamic Voltammetry : The Investigation of Electrode Reaction Mechanisms ». In : (1994), p. 270–273. DOI : [10.1021/j100052a045](https://doi.org/10.1021/j100052a045).
- [22] R CORNUT et C LEFROU. « A unified new analytical approximation for negative feedback currents with a microdisk SECM tip ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 608 (2007), p. 59–66.
- [23] R CORNUT et C LEFROU. « New analytical approximation of feedback approach curves with a micordisk SECM tip and irreversible kinetic reaction at the substrate ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 621 (2008), p. 178–184.
- [24] R CORNUT et C LEFROU. « New analytical approximations for negative feedback currents with a microdisk SECM tip ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 604 (2007), p. 91–100. DOI : [10.1016/j.jelechem.2007.02.029](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.02.029).
- [25] Sante COSPITO et al. « ionic liquid crystals ». In : *Nature Communications* 5 (2014), p. 1–8. DOI : [10.1038/ncomms4105](https://doi.org/10.1038/ncomms4105). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4105>.

BIBLIOGRAPHIE

- [26] Marylène DIAS et al. « Electrochemistry coupled to fluorescence spectroscopy : a new versatile approach ». In : *Electrochemistry Communications* 6 (2004), p. 325–330.
- [27] Thomas DONEUX et al. « Coupling Electrochemistry with Fluorescence Confocal Microscopy to Investigate Electrochemical Reactivity : A Case Study with the Resazurin-Resorufin Fluorogenic Couple ». In : *Analytical Chemistry* 88.12 (2016), p. 6292–6300. ISSN : 15206882. DOI : [10.1021/acs.analchem.6b00477](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00477).
- [28] Benjamin DOPAGNE et al. « Electrofluorochromism at the single-molecule level ». In : *Science* 255.July (2018), p. 251–255.
- [29] David A. EATON. « Recommended methods for fluorescence decay analysis ». In : *Pure and Applied Chemistry* 62 (1990), p. 1631–1648.
- [30] Amanda L ECKERMANN et al. « Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers ». In : *Coordination Chemistry Reviews* 254.15-16 (2010), p. 1769–1802. ISSN : 0010-8545. DOI : [10.1016/j.ccr.2009.12.023](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023>.
- [31] Fu-ren F FAN, David CLIFFEL et Allen J BARD. « Scanning Electrochemical Microscopy . 37 . Light Emission by Electrogenenerated Chemiluminescence at SECM Tips and Their Application to Scanning Optical Microscopy ». In : *Analytical Chemistry* 70.14 (1998), p. 2941–2948. DOI : [10.1021/ac980107t](https://doi.org/10.1021/ac980107t).
- [32] Fu-Ren F; FAN et al. *Handbook of Electrochemistry, Scanning Electrochemical Microscopy*. Sous la dir. d'ELSEVIER. 2007.
- [33] Robert J. FORSTER et Tia E. KEYES. *Handbook of Electrochemistry, UltraMicroElectrodes*. Sous la dir. d'ELSEVIER. 2007.
- [34] V L FURER. « Calculation of the IR spectra of toluene-2 , 4-bis (methyl) carbamate ». In : *Journal of molecular structure* 476.July 1998 (1999), p. 215–222.
- [35] L. GUERRET et al. « Investigation of Photophysical and Electrofluorochromic Properties of Gold Nanoparticles Functionalized by a Luminescent Electroactive Complex ». In : *Journal of Physical Chemistry C* 120.4 (2016), p. 2411–2418. ISSN : 19327455. DOI : [10.1021/acs.jpcc.5b09865](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09865).
- [36] Laetitia GUERRET-LEGRAS et al. « Combined SECM-fluorescence microscopy using a water-soluble electrofluorochromic dye as the redox mediator ». In : *Electrochimica Acta* 305 (2019), p. 370–377.
- [37] Laetitia GUERRET-LEGRAS et al. « New TBT based conducting polymers functionalized with redox-active tetrazines ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 840.October 2018 (2019), p. 60–66. ISSN : 1572-6657. DOI : [10.1016/j.jelechem.2019.03.029](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.029). URL : <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.029>.
- [38] Joshua P GUERRETTE, Stephen J PERCIVAL et Bo ZHANG. « Fluorescence Coupling for Direct Imaging of Electrocatalytic Heterogeneity ». In : *Fluorescence coupling for direct imaging of electrocatalytic heterogeneity* 135 (2013), p. 855–861. DOI : [10.1021/ja310401b](https://doi.org/10.1021/ja310401b).
- [39] John Y GUI et al. « Surface chemistry of five-membered heteroaromatics at Pt (111) electrodes studied by EELS , LEED , Auger spectroscopy and electrochemistry : furan , pyrrole and thiophene ». In : *Journal or Electroanalytical Chemistry* 305 (1991), p. 37–55.

- [40] R.A. ILLOS et al. « N-Dansyl-carbazoloquinone; a chemical and electrochemical fluorescent switch ». In : *Tetrahedron Letters* 47 (2006), p. 5543–5546. DOI : [10.1016/j.tetlet.2006.05.139](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.05.139).
- [41] Swarna JAISWAL et al. « Protective properties of functionalised tetrazine on an aerospace aluminium alloy (AA 2024-T3) ». In : *Materials Chemistry and Physics* 163 (2015), p. 190–200. ISSN : 0254-0584. DOI : [10.1016/j.matchemphys.2015.07.029](https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.07.029). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.07.029>.
- [42] A Toby A JENKINS et al. « Methoxy-resorufin ether as an electrochemically active biological probe for cytochrome P 450 O-demethylation ». In : 68 (2006), p. 67–71. DOI : [10.1016/j.bioelechem.2005.04.002](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.04.002).
- [43] Kenji KANAZAWA, Kazuki NAKAMURA et Norihisa KOBAYASHI. « Electroswitching of Emission and coloration with Quick Response and High Reversibility in an Electrochemical Cell ». In : *Chemistry a asian journal* 7 (2012), p. 2551–2554. DOI : [10.1002/asia.201200731](https://doi.org/10.1002/asia.201200731).
- [44] Jiyeon KIM et al. « Ion Permeability of the Nuclear Pore Complex and Ion-Induced Macromolecular Permeation as Studied by Scanning Electrochemical and Fluorescence Microscopy ». In : *Analytical Chemistry* 86 (2014), p. 2090–2098. DOI : [10.1021/ac403607s](https://doi.org/10.1021/ac403607s).
- [45] Yuna KIM, Eunkyong KIM et Pierre AUDEBERT. « New tetrazine-based fluoro-electrochromic window; modulation of the fluorescence through applied potential ». In : *Chemical Communications* 2 (2006), p. 3612–3614. DOI : [10.1039/b608312a](https://doi.org/10.1039/b608312a).
- [46] Yuna KIM et al. « Tetrazine-based electrofluorochromic windows : Modulation of the fluorescence through applied potential ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 632.1-2 (2009), p. 201–205. ISSN : 0022-0728. DOI : [10.1016/j.jelechem.2008.07.022](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.07.022). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.07.022>.
- [47] Sung-Yu KU, Ken-Tsung WONG et Allen J. BARD. « Surface Patterning with Fluorescent Molecules Using Click Chemistry Directed by Scanning Electrochemical Microscopy ». In : *Journal of the American Chemical Society* 130.8 (2008), p. 2392–2393. ISSN : 0002-7863. DOI : [10.1021/ja078183d](https://doi.org/10.1021/ja078183d). URL : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja078183d>.
- [48] Juhyouon KWAK et Allen J BARD. « Scanning Electrochemical Microscopy . Theory of the Feedback Mode ». In : *Analytical Chemistry* 1227.11 (1989), p. 1221–1227. DOI : [10.1021/ac00186a009](https://doi.org/10.1021/ac00186a009).
- [49] Youngmi LEE et Allen J BARD. « Fabrication and Characterization of Probes for Combined Scanning Electrochemical / Optical Microscopy Experiments microscopy (SECM) and optical microscopy (OM) was ». In : *Analytical Chemistry* 74.15 (2002), p. 3626–3633. DOI : [10.1021/ac015705d](https://doi.org/10.1021/ac015705d).
- [50] Youngmi LEE, Zhifeng DING et Allen J BARD. « Combined Scanning Electrochemical / Optical Microscopy with Shear Force and Current Feedback ». In : *Analytical Chemistry* 74.15 (2002), p. 3634–3643. DOI : [10.1021/ac015713u](https://doi.org/10.1021/ac015713u).
- [51] Chenghong LEI, Dehong HU et Eric ACKERMAN. « Clay Nanoparticle-Supported Single-Molecule Fluorescence Spectroelectrochemistry ». In : *Nano Letters* 9 (2009), p. 28–31.

BIBLIOGRAPHIE

- [52] Sébastien LHENRY, Yann R. LEROUX et Philippe HAPIOT. « Use of Catechol as Selective Redox Mediator in Scanning Electrochemical Investigations ». In : *Analytical Chemistry* 84 (2012), p. 7518–7524. DOI : [10.1021/ac301634s](https://doi.org/10.1021/ac301634s).
- [53] Chenghua LI et al. « Reversible Three-State Switching of Multicolor Fluorescence Emission by Multiple Stimuli Modulated FRET Processes within Thermoresponsive Polymeric Micelles ». In : *Angewandte Chemica* 49 (2010), p. 5120–5124. DOI : [10.1002/anie.201002203](https://doi.org/10.1002/anie.201002203).
- [54] Hui LI et al. « New conducting polymers functionalized with redox-active tetrazines ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 668 (2012), p. 26–29. ISSN : 1572-6657. DOI : [10.1016/j.jelechem.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.12.001). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.12.001>.
- [55] Yuan LI et al. « Versatile Approach toward Covalent Bridges between Graphene ». In : *Chemistry of Materials* (2015), p. 4298–4310. DOI : [10.1021/acs.chemmater.5b00672](https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b00672).
- [56] Xiaoqing LIU et al. « Spectroscopic Methods A Dual Functional Electroactive and Fluorescent Probe for Coupled Measurements of Vesicular Exocytosis with High Spatial and Temporal Resolution ». In : *Angewandte Chemie* 56 (2017), p. 2366–2370. DOI : [10.1002/anie.201611145](https://doi.org/10.1002/anie.201611145).
- [57] Hatsuo MAEDA et al. « Resorufin as an electron acceptor in glucose oxidase-catalysed oxydation of glucose ». In : *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 7.48 (2000), p. 897–902.
- [58] Jeremy MALINGE et al. « Preparation , Photophysical , Electrochemical , and Sensing Properties of Luminescent Tetrazine-Doped Silica Nanoparticles ». In : *Chemistry of Materials* 23 (2011), p. 4599–4605. DOI : [10.1021/cm202223w](https://doi.org/10.1021/cm202223w).
- [59] Jeremy MALINGE et al. « White Fluorescence from Core – Shell Silica Nanoparticles ». In : *Angewandte Chemie* 51 (2012), p. 8534–8537. DOI : [10.1002/anie.201203374](https://doi.org/10.1002/anie.201203374).
- [60] Jérémy MALINGE. *Design de matériaux organiques électro-photomodulables*.
- [61] Rosario MARTINEZ et al. « A simple and robust reversible redox-fluorescence molecular switch based on a 1,4-disubstituted azine with ferrocene and pyrene units ». In : *Chemical Communication* (2006), p. 3809–3811. DOI : [10.1039/b608264e](https://doi.org/10.1039/b608264e).
- [62] R. MEMMING. *Semiconductor Electrochemistry, second ed.* Sous la dir. de Weinheim WILEY. 2015.
- [63] Anne MEUNIER et al. « Coupling Amperometry and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy at ITO Surfaces for Monitoring Exocytosis of Single Vesicles ». In : *Angewandte Chemie* 50 (2011), p. 5081–5084. DOI : [10.1002/anie.201101148](https://doi.org/10.1002/anie.201101148).
- [64] Anne MEUNIER et al. « In Situ Fluorescence Microscopy Study of the Interfacial Inhomogeneity of DNA Mixed Self-Assembled Monolayers at Gold Electrodes ». In : *ChemElectroChem* 2 (2015), p. 434–442. DOI : [10.1002/celec.201402273](https://doi.org/10.1002/celec.201402273).
- [65] F MIOMANDRE et al. « Electrochemical Monitoring of the Fluorescence Emission of Tetrazine and Bodipy Dyes Using Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy Coupled to Electrochemistry ». In : *Applied Materials and Interfaces* 3 (2011), p. 690–696. DOI : [10.1021/am100980u](https://doi.org/10.1021/am100980u).

- [66] F. MIOMANDRE et al. « Electrofluorochromism of a ruthenium complex investigated by time resolved TIRF microscopy coupled to an electrochemical cell ». In : *Electrochemistry Communications* 20.1 (2012), p. 83–87. ISSN : 13882481. DOI : [10.1016/j.elecom.2012.03.030](https://doi.org/10.1016/j.elecom.2012.03.030). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2012.03.030>.
- [67] Fabien MIOMANDRE et al. « Coupling thin layer electrochemistry with epifluorescence microscopy : An expedient way of investigating electrofluorochromism of organic dyes ». In : *Electrochemistry Communications* 13.6 (2011), p. 574–577. ISSN : 13882481. DOI : [10.1016/j.elecom.2011.03.013](https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.03.013).
- [68] Fabien MIOMANDRE et al. *Electrochimie. Des concepts aux applications*. Sous la dir. de DUNOD.
- [69] Fabien MIOMANDRE et al. « Fluorescence microscopy coupled to electrochemistry : a powerful tool for the controlled electrochemical switch of fluorescent molecules ». In : *Chemical Communications* (2008), p. 1913–1915. DOI : [10.1039/b718899d](https://doi.org/10.1039/b718899d).
- [70] Fabien MIOMANDRE et al. « Gold and Silver Nanoparticles Functionalized by Luminescent Iridium Complexes : Synthesis and Photophysical and Electrofluorochromic Properties ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 117.24 (2013), p. 12806–12814. ISSN : 1932-7447. DOI : [10.1021/jp312625x](https://doi.org/10.1021/jp312625x). URL : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp312625x>.
- [71] F MONTILLA et R MALLAVIA. « In situ Electrochemical Fluorescence Studies of PPV ». In : *Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006), p. 25791–25796. DOI : [10.1021/jp065070s](https://doi.org/10.1021/jp065070s).
- [72] F MONTILLA et al. « Fluorescence Emission Anisotropy Coupled to an Electrochemical System : Study of Exciton Dynamics in Conjugated Polymers ». In : *Journal of Physical Chemistry C* 49 (2007), p. 18405–18410. DOI : [10.1021/jp075587j](https://doi.org/10.1021/jp075587j).
- [73] Jeffrey N MURPHY et al. « On the Nature of DNA Self-Assembled Monolayers on Au : Measuring Surface Heterogeneity with Electrochemical in Situ Fluorescence Microscopy ». In : *Journal of the American Chemical Society* 131.14 (2009), p. 4042–4050.
- [74] Kazuki NAKAMURA, Kenji KANAZAWA et Norihisa KOBAYASHI. « Electrochemically controllable emission and coloration by using europium(III) complex and viologen derivatives ». In : *Chemical Communication* 47 (2011), p. 10064–10066. DOI : [10.1039/c1cc13855c](https://doi.org/10.1039/c1cc13855c).
- [75] A K NEUFELD et A P O MULLANE. « Effect of the mediator in feedback mode-based SECM interrogation of indium tin-oxide and boron-doped diamond electrodes ». In : *Journal of Solid State Electrochemistry* (2006), p. 808–816. DOI : [10.1007/s10008-006-0180-5](https://doi.org/10.1007/s10008-006-0180-5).
- [76] Lucie NOREL et al. « Redox-driven porphyrin based systems for new luminescent molecular switches ». In : *Dalton Transactions* 47 (2018), p. 8364–8374.
- [77] Stephen M OJA et Bo ZHANG. « Imaging Transient Formation of Diffusion Layers with Fluorescence- Enabled Electrochemical Microscopy ». In : *Analytical Chemistry* 86 (2014), p. 12299–12307. DOI : [10.1021/ac5035715](https://doi.org/10.1021/ac5035715).
- [78] Stephen M OJA et al. « Fluorescence-Enabled Electrochemical Microscopy with Dihydroresoru fi n as a Fluorogenic Indicator ». In : 86 (2014), p. 6040–6048. DOI : [10.1021/ac501194j](https://doi.org/10.1021/ac501194j).

BIBLIOGRAPHIE

- [79] Yong QIAN et al. « A resorufin-based colorimetric and fluorescent probe for live-cell monitoring of hydrazine ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 58 (2014), p. 282–286. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2014.02.059](https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.059). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.059>.
- [80] Zhou QING et al. « Tetrazines with hindered or electron withdrawing substituents : Synthesis , electrochemical and fluorescence properties ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 632.1-2 (2009), p. 39–44. ISSN : 0022-0728. DOI : [10.1016/j.jelechem.2009.03.021](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.03.021). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.03.021>.
- [81] Christophe RENAULT et al. « Observation of Nanometer-Sized Electro-Active Defects in Insulating Layers by Fluorescence Microscopy and Electrochemistry ». In : *Analytical Chemistry* 87 (2015), p. 5730–5737. DOI : [10.1021/acs.analchem.5b00898](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00898).
- [82] Joel RIVERA-GANDÍA, Rosina M GEORGIADIS et Carlos R CABRERA. « In-situ fluorescence spectroscopy of self-assembled monolayers of under cyclic voltammetric conditions ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 621.1 (2008), p. 75–82. ISSN : 0022-0728. DOI : [10.1016/j.jelechem.2008.04.028](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.04.028). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.04.028>.
- [83] Nicola C RUDD et al. « Fluorescence Confocal Laser Scanning Microscopy as a Probe of pH Gradients in Electrode Reactions and Surface Activity microscopy (CLSM) to quantify three-dimensional pH ». In : *Analytical Chemistry* 77.19 (2005), p. 6205–6217. DOI : [10.1021/ac050800y](https://doi.org/10.1021/ac050800y).
- [84] Yoshimitsu SAGARA et Takashi KATO. « Brightly Tricolored Mechanochromic Luminescence from a Single- Luminophore Liquid Crystal : Reversible Writing and Erasing of Images ». In : *Angewandte Chemica* 50 (2011), p. 9128–9132. DOI : [10.1039/c2sc21503a](https://doi.org/10.1039/c2sc21503a).
- [85] S Ehsan SALAMIFAR et Rebecca Y LAI. « Use of Combined Scanning Electrochemical and Fluorescence Microscopy for Detection of Reactive Oxygen Species in Prostate Cancer Cells ». In : 2 (2013), p. 9417–9421.
- [86] Jante M SALVERDA et al. « Fluorescent Cyclic Voltammetry of Immobilized Azurin : Direct Observation of Thermodynamic and Kinetic Heterogeneity ». In : *Angewandte Chemie Cv* (2010), p. 5912–5915. DOI : [10.1002/ange.201001298](https://doi.org/10.1002/ange.201001298).
- [87] Seogjae SEO et al. « Electrofluorescence switching of tetrazine-modified TiO₂ nanoparticles ». In : (2013), p. 7321–7327. DOI : [10.1039/c3nr01648j](https://doi.org/10.1039/c3nr01648j).
- [88] Jeff L SHEPHERD et al. « Selective Reductive Desorption of a SAM-Coated Gold Electrode Revealed Using Fluorescence Microscopy ». In : *Journal of the American Chemical Society* 126.20 (2004), p. 8329–8335. DOI : [10.1021/ja0494095](https://doi.org/10.1021/ja0494095).
- [89] Abdusalom A SULEYMANOV et al. « Highly Substituted D 3 -1 , 2 , 3-Triazolines : Solid-State Emitters with Electrofluorochromic Behavior ». In : *Chemistry A European Journal* 25 (2019), p. 6718–6721. DOI : [10.1002/chem.201901345](https://doi.org/10.1002/chem.201901345).
- [90] Jian-Ke SUN et al. « Reversible luminescence switch in a photochromic metal–organic framework ». In : *Chemical Communication* 47 (2011), p. 6870–6872.
- [91] Jingwei SUN, Yani CHEN et Ziqi LIANG. « Electroluminochromic Materials and Devices ». In : *Advanced functionnal materials* 26 (2016), p. 2783–2799. DOI : [10.1002/adfm.201505013](https://doi.org/10.1002/adfm.201505013).

- [92] Ningwei SUN et al. « AIE-Active Polyamide Containing Diphenylamine-TPE Moiety with Superior Electrochromic Performance ». In : *Applied Materials and Interfaces* 10 (2018), p. 16105–16112. DOI : [10.1021/acsami.8b01624](https://doi.org/10.1021/acsami.8b01624).
- [93] Ningwei SUN et al. « High-contrast electrochromic and electrofluorescent dual-switching materials based on 2-diphenylamine-(9,9-diphenylfluorene)-functionalized semi-aromatic polymers ». In : *RSC Advances* 68 (2016), p. 66288–66296. DOI : [10.1039/c6ra12174h](https://doi.org/10.1039/c6ra12174h).
- [94] Vignesh SUNDARESAN et al. « Visualizing and Calculating Tip-Substrate Distance in Nanoscale Scanning Electrochemical Microscopy Using 3-Dimensional Super-Resolution Optical Imaging ». In : *Analytical Chemistry* 89.1 (2017), p. 922–928. ISSN : 15206882. DOI : [10.1021/acs.analchem.6b04073](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04073).
- [95] Sabine SZUNERITS et al. « New Approach to Writing and Simultaneous Reading of Micropatterns : Combining Surface Plasmon Resonance Imaging with Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) ». In : *Langmuir* 13.9 (2004), p. 9236–9241. DOI : [10.1021/la0492557](https://doi.org/10.1021/la0492557).
- [96] Bernard VALEUR. *Molecular fluorescence principles and applications*. Sous la dir. de WILEY-VCH.
- [97] Fangyuan WANG et al. « A facile method for detection of alkaline phosphatase activity based on the turn-on fluorescence of resorufin ». In : *Analytical Methods* 6 (2014), p. 6105–6109. DOI : [10.1039/c4ay00634h](https://doi.org/10.1039/c4ay00634h).
- [98] Linxiao XU et al. « Study on effects of tungstophosphate structures on electrochemically induced luminescence switching behaviors of the composite films consisting of tris(1,10-phenanthroline) ruthenium ». In : *Journal of Materials Chemistry C* 3 (2015), p. 1732–1737. DOI : [10.1039/C4TC02774D](https://doi.org/10.1039/C4TC02774D).
- [99] Yi-Xian YUAN et al. « Redox responsive luminescent switch based on a ruthenium(II) complex [Ru(bpy)₂(PAIDH)]²⁺ ». In : *Inorganic Chemistry Communications* 11 (2008), p. 1048–1050.
- [100] Ruili ZHANG et al. « Effects of Photoinduced Electron Transfer on the Rational Design of Molecular Fluorescence Switch ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 113 (2009), p. 2594–2602. DOI : [10.1021/jp809135j](https://doi.org/10.1021/jp809135j).

Annexe

1. Sources lumineuses, types et modes d'illumination :

1.1. Source blanche continue haute pression à vapeur de mercure :

- Modèle : C-HGFI -Intensilight, *Nikon*.
- Gamme spectrale : 330nm-790nm
- Intensité réglable manuellement par un jeu de densité neutre : 1,1/2,...,1/32

Cette source est fibrée et mise en forme à l'aide d'un bras d'illumination. Elle permet l'excitation en épi-fluorescence plein champ ou en réflexion totale interne (TIRF) de l'échantillon selon une ou plusieurs bandes passantes spectrales selon le jeu de filtre(s) d'excitation choisi.

1.2. Diode laser pulsée :

- Modèle : LDH-P-C-470, *Picoquant*
- Gamme spectrale : 470nm +/- 5nm
- Largeur temporelle à mi-hauteur de l'impulsion : 30ps
- Fréquence de répétition : 2.5MHz-40MHz

Cette source est fibrée et collimatée. Elle est ensuite mise en forme afin de permettre l'excitation en épi-fluorescence plein champ ou en réflexion totale interne (TIRF) de l'échantillon. L'intensité lumineuse est réglable à l'aide d'un contrôleur (PDL 800-B, *Picoquant*). Dans le contexte des mesures résolues en temps, la fréquence de répétition de la diode peut être sélectionnée et mise en forme en un train de pulses électriques à l'aide du même contrôleur (signal de synchronisation SYNC).

2. Microscope et optiques :

2.1. Microscope inversé pour l'épi-fluorescence :

- Modèle : Eclipse Ti -E, *Nikon*

Ce microscope est équipé d'un bras d'illumination TI-SFL, *Nikon*. Le bras d'illumination permet l'excitation plein champ ou TIRF de l'échantillon. Ce bras a été modifié afin de pouvoir être utilisé avec le mode d'illumination continue ou pulsé dans un même montage.

2.1.1. Objectifs de microscope :

Le microscope est équipé des deux objectifs suivants :

- CFI Apochromat 100x TIRF, immersion : huile, O.N. 1.49, *Nikon*
- CFI Plan Fluor 40x, O.N. 0.75, DT 0.66 mm, *Nikon*

2.1.2. Ensemble de filtres utilisés pour l'épi-fluorescence :

Echantillons	Excitation / nm	Filtre Excitation/ nm	Filtre Dichroïque fc /nm	Filtre d'Emission /nm
TZ	488	F01-482//35FWHM	FF506-Di03	AELP520 +LP500
RESORUFINE	467	ZT450-473	FF506-Di03	AELP520 +LP500
TBT	385	FF01-377/50FWHM	FF409-Di03	LP 410
	488	F01-482//35FWHM	FF506-Di03	AELP520 +LP500

2.2. Microscope électrochimique à sonde locale résolue spatialement de type SECM :

- Modèle : VersaSCAN™ SECM, *AMETEK Princeton Applied Research*
- Type de déplacement : moteurs piézo-électriques, résolution 50nm, pas de déplacement minimal 1µm@1µm/s, course maximale 100mm.
- Type de sonde locale : UME (Ultra Micro Electrode)
- Conditionnement et polarisation des signaux : Bi-potentiostatique à électrodes de référence et contre électrode communes, avec au moins une masse flottante.
- Potentiostats : VersaSTAT 3F et VersaSTAT 4, *AMETEK SI*, respectivement pour la sonde et le substrat.

Le microscope électrochimique permet de conditionner, de sonder et de cartographier les signaux électriques d'intérêts à la surface d'un substrat (conducteur, fonctionnalisé, isolant, etc.) ou dans un micro-volume au-dessus de ce dernier.

Couplé à la microscopie optique et plus particulièrement à la fluorescence de molécules électrofluorochromes il permet de suivre et de compléter la compréhension des cinétiques et mécanismes d'échange mis en jeux aux interfaces.

Selon le scénario du mode d'acquisition, SECM ou électrochimie classique ; la synchronisation, le positionnement, le conditionnement et l'acquisition des signaux électrochimiques sont pilotés par les logiciels VersaSCAN, ou VersaStudio (AMETEK SI).

2.2.1. Caractéristiques des électrodes :

Electrodes	Ag /AgCl	Pt	ITO/Verre	Au/verre ^(*)	Verre	UME (Pt)	UME (Au)
Type	Electrode de référence (RE)	Contre Electrode (CE)	Electrode de travail (WE)	Electrode de travail (WE)	Isolant	Electrode de travail (WE)	Electrode de travail (WE)
Fournisseur			Solem		VWR	AMETEK SI	EKA, AMETEK SI
Dimension	25mm Dia.250µm	50mm Dia.800µm	25x25mm e. <1mm	25x25mm e. <1mm	25x25mm e. <1mm	25µm	1µm
Surface de contact avec la solution	4mm ²	50mm ²	325 mm ²		325 mm ²		

^(*) dépôt d'or : EMITECH K650 sputter coater. Sous atmosphère Argon (0.1 mbar), 60 mA appliqué pendant 4 min.

3. Détecteurs photonique :

3.1. Détection stationnaire :

3.1.1. En imagerie :

- Modèle : PCO.PixelFly, *PCO AG*
- Type du capteur : CCD (Charge Coupled Device) monochrome
- Gamme spectrale : 290nm – 1100nm

Sensor Type	Sony ICX285AL Scientific Interline CCD (Monochrome)
CCD Array	1392 x 1040
Full Well Capacity	>16,000e ⁻ single pixel (>24,000e ⁻ with on-chip binning)
Digital Output	14 bit
Digitization Rate USB2	12 - 24 MHz high frame rate
Dark noise	<1e ⁻ /pixel.s (RMS) @25°C
Read Noise (typical)	<6e ⁻ .s (RMS) @12MHz
Peak Quantum Efficiency	up to 62 % at 500nm
Pixel Size	6.45µm x 6.45µm
Frame Rate	up to 40 fps
Exposure Time Range	5µs to 60s

3.1.2. En spectrométrie d'émission :

- Modèle : SD2000, *Ocean Optics*
- Résolution : 5nm
- Gamme spectrale : 200nm -1100nm
- Fibré : P400 UV-VIS, O.N. 0.22, 400µm, *Ocean Optics* et collimateur SMA, f=11mm
- Détection : filtrage spatial au plan image du microscope

Sensor Type	Sony ILX511 CCD (Monochrome)
CCD Array element	2048
Full Well Capacity	160,000 photons @ 600nm
Sensitivity	86 photons/count @ 600nm Experimental sensitivity is known with all instrumental chain included

Digital Output A/D converter	12 bit ,500kHz
Grating	Type #2 , blaze @ 600nm
Exposure Time Range	4ms to 60s

L'imagerie en intensité de fluorescence permet d'imager la modulation du signal lumineux au plan de l'échantillon sous forme de séquence d'images en fonction de la modulation électrochimique appliquée au substrat et/ou à l'UME, en mode SECM ou classique. L'acquisition des images est pilotée avec le logiciel - open-source - Micro-Manager (*ImageJ*). Les images sont ensuite traitées sous Fiji (*ImageJ*) à l'aide d'une macro permettant d'extraire les profils en intensité selon une région d'intérêt (ROI).

De la même manière le spectromètre permet l'acquisition séquentielle de spectres stationnaires d'émission de fluorescence. L'acquisition des spectres est pilotée à l'aide du logiciel SpectraSuite, *Ocean Optics*. Les spectres sont ensuite traités et analysés avec des macros dédiées écrites avec le logiciel Igor *Wavemetrics*. Ils sont corrigés de la sensibilité de la chaîne instrumentale et/ou de l'excitation résiduelle obtenues dans les mêmes conditions que l'expérience.

3.2. Détection résolue en temps de type TCSPC (Time-Correlated-Single-Photon-Counting)

3.2.1. Photodiode à avalanche :

- Modèle : MPD-CCTC, *Picoquant*
- Type de capteur : SPAD (Single Photon Avalanche Diodes)
- Fibré : multimode GRIN 62.5µm et collimateur FC, f=11mm
- Gamme spectrale : 375nm - 1000nm
- Détection : filtrage spatial au plan image du microscope

General	
Single Photon Timing Resolution (NIM output)	50ps(FWHM)
Jitter	<50 ps
Dark Counts	<150
Detection Efficiency	up to 49% @ 550nm
After-pulsing probability	min 0.1% - max 3%
Dead time	77ns
Maximal count rate	12×10^6 counts/sec

3.2.2. Carte de comptage :

- Modèle : Timeharp 260 NANO SINGLE CHANNEL, *Picoquant*
- Interface : PCIe

General	
Number of detector channels	1channel, 1 SYNC
Time to Digital Conversion (TDC)	
Electrical time resolution	< 250 ps (rms)
Time resolution	< 1ns FWHM
Maximal count rate	40×10^6 counts/sec
Dead time	< 2 ns
Maximum sync rate	100 MHz
Time bin width (adjustable)	250 ps, 500 ps, 1 ns, [...], 524.2 μ s
Electrical resolution	< 6ps FWHM
Maximum number of time bins	32768
TTTR Engine Using T3 mode	
T3 mode resolution	250 ps, 500 ps, 1 ns, [...], 524.2 μ s
Arrival Time Resolution	<1ns 2.5MHz
Calculated IRF with all instrumental chain included	<1ns

La détection de photon unique corrélé en temps dans le mode TTTR-T3 (Time-Tagged Time-Resolved) permet l'enregistrement individuel de chaque photon avec son délai à la fluorescence (dt) respectivement au pulse d'excitation, et son temps d'arrivé absolue (aat), et ce, tout en appliquant un potentiel au substrat et/ou à l'Ultra Micro Electrode. Une macro dédiée écrite avec le logiciel Igor *Wavemetrics* permet de reconstituer la cinétique en intensité de fluorescence stationnaire au cours du temps, la durée de vie moyenne au cours de cette même séquence, et enfin de reconstituer la cinétique des déclins sur des frontières temporelles afin de la corrélées aux signaux de potentiels.

4. Modélisation numérique par méthode d'éléments finis : Logiciel : COMSOL®

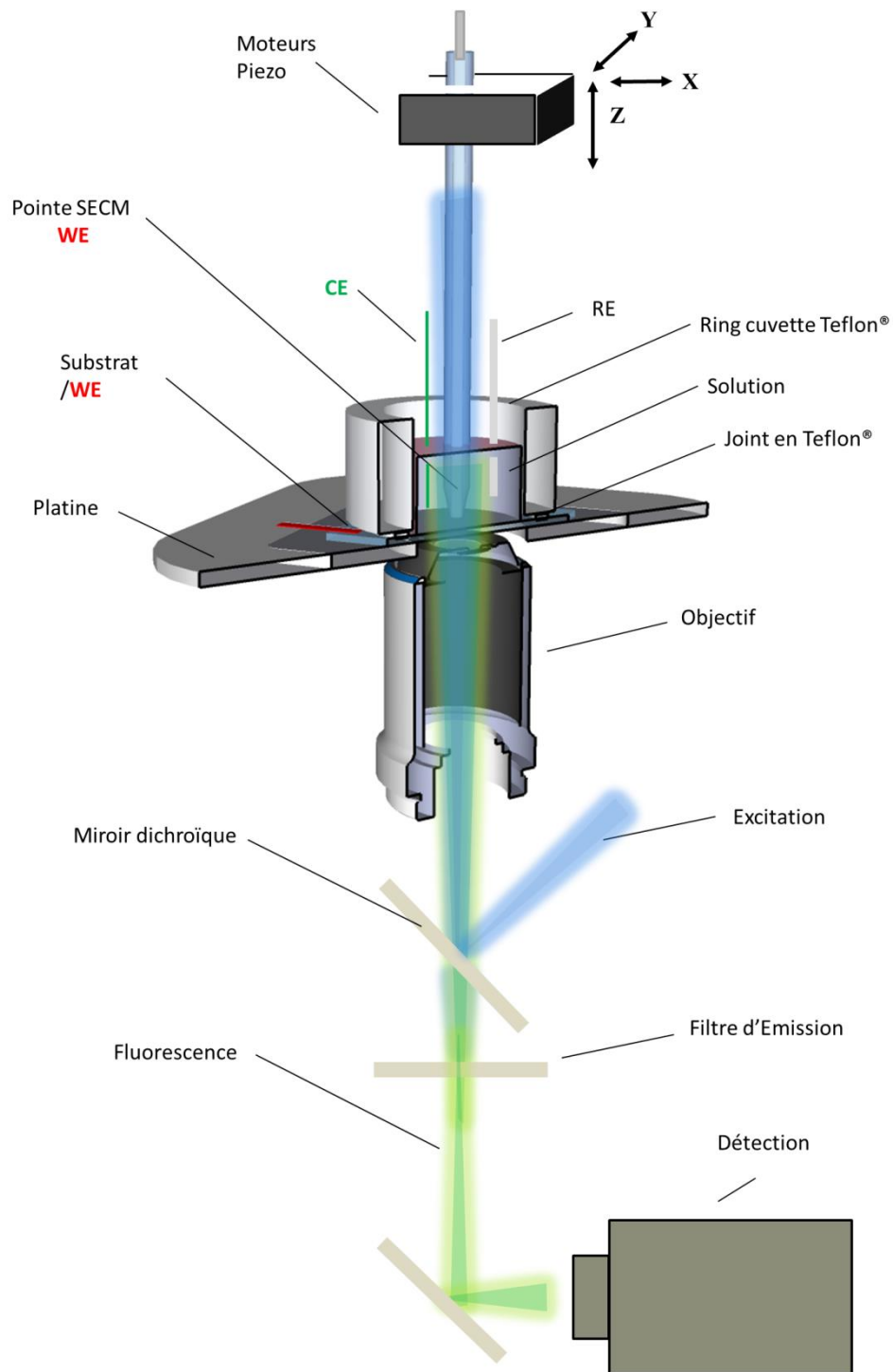


Schéma de principe

Titre : Couplage de la microscopie de fluorescence à la microscopie électrochimique : des solutions aux surfaces

Mots clés : microscopie de fluorescence, microscopie électrochimique, surface, électrofluorochromisme

Résumé : L'électrofluorochromisme est l'étude de la modulation de la fluorescence d'un fluorophore par le contrôle électrochimique du degré d'oxydation d'une entité électroactive. Fluorophore et entité électroactive peuvent être confondus. C'est le cas par exemple pour les tétrazines puisque ces fluorophores peuvent être réduits réversiblement en radicaux anions non fluorescents. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse visent à étudier l'électrofluorochromisme sous deux aspects :

- un aspect design d'électrodes modifiées pour le développement de l'électrofluorochromisme solide. Dans cette optique, ont été développés d'une part des films de polymères conducteurs

incorporant des unités tétrazines, d'autre part des électrodes transparentes fonctionnalisées par des tétrazines siloxanes.

- un aspect instrumental puisqu'un couplage entre microscopie de fluorescence résolue en temps et microscopie électrochimique à balayage est proposé au moyen de l'utilisation d'une sonde électrofluorochrome. Le principe du couplage est démontré avec la chlorométhoxytétrazine. Une extension de la méthode aux milieux aqueux est ensuite proposée grâce au remplacement de cette dernière par la résorufine.

Title : Combining fluorescence microscopy with electrochemical microscopy: from solutions to surfaces

Keywords : fluorescence microscopy, electrochemical microscopy, surface, electrofluorochromism

Abstract : Electrofluorochromism is the study of the fluorescence emission modulation of a fluorophore by electrochemical control of the oxydation state of an electroactive moiety. Fluorophore and electroactive moiety can be the same, as for example in the case of tetrazines. Indeed these fluorophores can be reversibly reduced into non fluorescent radical anions. This work aims at studying electrofluorochromism under two different aspects :

- the design of modified electrodes for the development of solid electrofluorochromism. With this in mind, films of conducting poly-

mers incorporating tetrazines units and transparent electrodes functionalized by tetrazines siloxanes have been developed.

- the development of a coupling between time-resolved fluorescence microscopy and scanning electrochemical microscopy has been carried out by the use of an electrofluorochromic probe. The concept of this coupling is demonstrated by using chloromethoxytetrazine as the probe. Then an extension of the methodology to aqueous media is proposed by replacement of tetrazine by resorufine.

