



HAL
open science

Nouvelles stratégies instrumentales pour la mesure de courants électrochimiques ultra-faibles

Rabia Djoumer

► **To cite this version:**

Rabia Djoumer. Nouvelles stratégies instrumentales pour la mesure de courants électrochimiques ultra-faibles. Instrumentations et Détecteurs [physics.ins-det]. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP7323 . tel-04527118

HAL Id: tel-04527118

<https://theses.hal.science/tel-04527118>

Submitted on 29 Mar 2024

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.

Université Paris Cité

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie analytique de Paris-centre (ED 388)

Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire/ Equipe BIONANO

Nouvelles Stratégies Instrumentales Pour La Mesure De Courants Electrochimiques Ultra-Faibles

Par Rabia DJOUMER

Thèse de doctorat en Chimie Physique

Dirigée par Christophe DEMAILLE, et par Corinne DEJOURS

Présentée et soutenue publiquement le 17 Juin 2022

Devant le jury composé de :

Rapporteur	KUSSENER Edith	PhD, HDR, Université d'Aix Marseille
Rapporteur	DONEUX Thomas	Chargé de cours, Université Libre de Bruxelles
Examinateur	SOJIC Neso	PR, Université de Bordeaux
Examinatrice	LEBEGUE Estelle	MCU, Université de Nantes
Co-encadrant	CHOVIN Arnaud	MCU, Université Paris Cité
Co-directrice de thèse	DEJOURS Corinne	PR, Université de Bordeaux
Directeur de thèse	DEMAILLE Christophe	DR CNRS, Université Paris Cité

Titre : Nouvelles stratégies instrumentales pour la mesure de courants électrochimiques ultra-faibles.

Résumé : La mesure des courants faradiques associés à la détection d'un très faible nombre de molécules, voire d'une molécule unique, reste un défi instrumental majeur en nanoélectrochimie. Ces courants, de l'ordre du fA, sont à ce jour mesurés exclusivement par des appareils électroniques spécialisés dans cette tâche. La précision des mesures réalisées est inévitablement limitée par le bruit électronique de l'appareillage, qu'il est possible de réduire sensiblement en améliorant le schéma électronique de mesure. C'est ce que nous démontrons en développant un montage transimpédance à contre-réaction capacitive dont les performances en sensibilité et en bande passante sont, dans la gamme du fA, meilleures que celles des mesureurs de courant transimpédance à contre-réaction résistive classiquement utilisés en électrochimie.

Cependant, le saut quantitatif que représente la mesure de courants notablement *inférieurs* au fA ne saurait être réalisé sans proposer des stratégies de mesure radicalement nouvelles. Aussi, dans le cadre de cette thèse, une alternative à la mesure 'directe' de courants faradiques par des appareils électroniques est-elle proposée. Elle consiste en la conversion du courant électrochimique en une émission lumineuse, par un système de couplage original basé sur le montage potentiostatique classique. Une réaction redox quelconque, générant un courant faradique d'intérêt à l'électrode de travail du montage, est couplée quantitativement à une réaction redox inverse, générant de la lumière à la contre-électrode via la production d'une espèce luminescente (fluorescente ou électrochimiluminescente). Nous apportons la preuve de principe de ce schéma de conversion courant/lumière, discutons et améliorons sa sensibilité et sa bande passante et l'appliquons à la détection de la collision de nanoparticules de platine avec une ultramicroélectrode de carbone. Il s'agit à notre connaissance du premier couplage réalisé entre collision de nanoparticules et émission lumineuse, en montage potentiostatique.

Mots clés : électrochimie, courants faradiques, courants faibles, instrumentation, fluorescence, électrochimiluminescence.

Title: New instrumental strategies for ultra-low electrochemical currents measurement.

Abstract: The measurement of faradic currents associated with the detection of a very small number of molecules, or even a single molecule, remains a major instrumental challenge in nanoelectrochemistry. These currents, of the order of fA, are to date measured exclusively by electronic devices specialized in this task. The accuracy of the measurements is inevitably limited by the electronic noise of the apparatus, which can be significantly reduced by improving the electronic measurement scheme. This is what we demonstrate by developing a capacitive feedback transimpedance circuit whose sensitivity and bandwidth performances are, in the fA range, significantly better than those of the resistive feedback transimpedance current meters conventionally used in electrochemistry.

However, the quantitative leap represented by the measurement of currents significantly lower than fA cannot be achieved without proposing radically new measurement strategies. Therefore, in this thesis, an alternative to the 'direct' measurement of faradic currents by electronic devices is proposed. It consists in the conversion of the electrochemical current into a light emission, by an original coupling system based on the classical potentiostatic setup. Any redox reaction, generating a faradic current of interest at the working electrode of the setup, is quantitatively coupled to a reverse redox reaction, generating light at the counter electrode via the production of a luminescent species (fluorescent or electrochemiluminescent). We bring the proof of principle of this current/light conversion scheme, discuss and improve its sensitivity and bandwidth and apply it to the detection of the collision of platinum nanoparticles with a carbon ultramicroelectrode. To our knowledge, this is the first coupling between nanoparticle collision and light emission in a potentiostatic setup.

Keywords: electrochemistry, faradic currents, weak currents, instrumentation, fluorescence, electrochemiluminescence.

Remerciements

Je tenais absolument à faire une thèse, malgré que je travaillais déjà comme électronicien au laboratoire depuis quatre ans à ce moment-là et que mes souvenirs d'études commençaient à s'éloigner tout doucement. A l'arrivée, je suis ravi d'avoir pris cette décision et je remercie donc tous les membres permanents du laboratoire de m'avoir permis d'effectuer cette thèse à temps partiel, à l'unanimité.

Je remercie évidemment tous mes encadrants. Christophe qui m'a proposé ce sujet de thèse et qui sur toute la longueur a répondu à toutes les difficultés et questions auxquelles j'ai été confronté, à aucun moment je ne me suis senti livré à moi-même grâce à lui. Arnaud, pour ses réponses à mes questions de novice en électrochimie mais aussi pour son aide à l'élaboration de dispositifs techniques toujours avec enthousiasme et pour ses conseils en général. Corinne qui malgré la distance m'a permis de réaliser les appareils électroniques et a aussi répondu à mes difficultés et questions avec beaucoup d'enthousiasme. Mais aussi Hamida et Jean-Luc qui m'ont aidé à la réalisation de mon potentiostat et plus encore. Sans oublier Agnès pour ses encouragements et ses remarques et propositions très pertinentes.

Je remercie tous les membres du laboratoire qu'ils soient permanents ou de passage, et tous ceux qui de près ou de loin ont participé à cette thèse, pour chaque aide ponctuelle qu'ils m'ont apporté tout au long, ou simplement pour leur soutien et encouragements. Je remercie en particulier tous les membres du corps technique du LEM dont je fais partie.

Enfin, je remercie tous mes amis, mes parents, mes frères et sœurs et toute ma famille pour leur aide, leur soutien et leurs encouragements. Et une petite pensée pour ma grand-mère.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE -----	1
REFERENCES DE L'INTRODUCTION GENERALE -----	3
CHAPITRE I -----	5
INTRODUCTION A L'ELECTROCHIMIE POUR LE LECTEUR ELECTRONICIEN	
1. INTRODUCTION-----	7
2. CELLULE ET COURANTS ELECTROCHIMIQUES. -----	7
3. LE MONTAGE POTENTIOSTATIQUE-----	11
4. ELECTROCHIMIE A UNE ELECTRODE : LES COURBES INTENSITE-POTENTIEL -----	13
5. LA VOLTAMMETRIE CYCLIQUE TRANSITOIRE -----	15
6. LA CHRONOAMPEROMETRIE-----	20
7. VOLTAMMETRIE CYCLIQUE AUX ULTRAMICROELECTRODES -----	21
8. L'ELECTROCHIMIE BIPOLAIRE-----	24
9. CONCLUSIONS -----	27
REFERENCES DU CHAPITRE-----	28
CHAPITRE II -----	31
LA MESURE DE PETITS COURANTS EN NANO-ELECTROCHIMIE D'ENTITES UNIQUES	
1. INTRODUCTION-----	33
2. LE CYCLAGE REDOX POUR L'ADRESSAGE ELECTROCHIMIQUE D'ENTITES INDIVIDUELLES -----	34
3. L'ELECTROCHIMIE DE NANO-IMPACTS POUR LA DETECTION D'ENTITES UNIQUES-----	46
4. PERTINENCE SCIENTIFIQUE D'ACCROITRE ENCORE LA SENSIBILITE ET/OU LA BANDE PASSANTE DE LA MESURE DE FAIBLES COURANTS-----	51
5. CONCLUSIONS -----	52
REFERENCES DU CHAPITRE-----	53
CHAPITRE III -----	59
IDENTIFIER ET REPOUSSER LES LIMITES INSTRUMENTALES DE LA MESURE DES PETITS COURANTS ELECTROCHIMIQUES	
1. INTRODUCTION-----	61
2. LES DIFFERENTES SOURCES DE BRUIT SUR LA MESURE DE COURANT -----	61
3. LE BRUIT DE GRENAILLE : LA LIMITE ULTIME POUR LA MESURE DE COURANT FARADIQUE ? --	62
4. CONVERTIR UN FLUX D'ELECTRONS EN FLUX DE PHOTONS : QUELS BENEFICES ?-----	64
5. AU-DELA DE LA MESURE DE FLUX : VERS LE COMPTAGE D'ELECTRONS-----	68
6. CONCLUSIONS -----	69
REFERENCES DU CHAPITRE-----	70
CHAPITRE IV -----	73
CONVERTIR UN COURANT FARADIQUE GENERE A UNE ELECTRODE SOUS CONTROLE POTENTIOSTATIQUE EN EMISSION DE FLUORESCENCE	
1. INTRODUCTION-----	75
2. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU CONVERTISSEUR COURANT-FLUORESCENCE QUE NOUS PROPOSONS -----	76

3.	ELECTROCHIMIE ET FLUORESCENCE DE LA RESAZURINE, FLUOROGENE MODELE -----	78
4.	ANALYSE MECANISTIQUE DE LA REDUCTION DE LA RESAZURINE PAR VOLTAMETRIE ET VOLTFLUOROMETRIE COUPLEES -----	79
5.	VOLTAMMETRIE ET VOLTFLUORMETRIE STATIONNAIRE DE LA RESAZURINE A UNE ULTRAMICROELECTRODE -----	86
6.	CONVERSION D'UN COURANT FARADIQUE GENERE A UNE ELECTRODE SOUS CONTROLE POTENTIOSTATIQUE EN EMISSION DE FLUORESCENCE – PREUVE DE PRINCIPE -----	90
7.	CARACTERISTIQUES DE LA REPOSE DU MONTAGE CONVERTISSEUR COURANT FLUORESCENCE : AMELIORATIONS, SENSIBILITE, ET TEMPS DE REPOSE -----	93
8.	CONCLUSIONS -----	94
	REFERENCES DU CHAPITRE -----	96
	ANNEXE DU CHAPITRE IV -----	100
	REFERENCES DE L'ANNEXE -----	105
CHAPITRE V -----		107
GENERALISATION DE LA CONVERSION COURANT/FLUORESCENCE ET AMELIORATION DU SYSTEME DE COUPLAGE		
1.	INTRODUCTION -----	109
2.	ETUDE EN VOLTAMMETRIE ET VOLTFLUOROMETRIE CYCLIQUE DU SYSTEME FLUOROGENIQUE HPTS/BQ -----	109
3.	CONVERSION D'UNE REACTION ELECTROCHIMIQUE OXYDATIVE GENERIQUE EN EMISSION DE FLUORESCENCE PAR LE SYSTEME HPTS/BQ OPTIMISE -----	117
4.	CONVERSION D'UNE REACTION ELECTROCHIMIQUE REDUCTIVE GENERIQUE EN FLUORESCENCE EN UTILISANT L'AMPLEX RED COMME RAPPORTEUR -----	120
5.	UN COURANT CAPACITIF PEUT-IL AUSSI ETRE CONVERTI EN FLUORESCENCE ? -----	122
6.	CONCLUSIONS -----	125
	REFERENCES DU CHAPITRE -----	128
	ANNEXE DU CHAPITRE V -----	130
CHAPITRE VI -----		135
CONVERTIR UN COURANT FARADIQUE GENERE A UNE ELECTRODE SOUS CONTROLE POTENTIOSTATIQUE EN UNE EMISSION LUMINEUSE PAR ELECTROCHIMILUMINESCENCE (ECL)		
1.	INTRODUCTION -----	137
2.	SUIVI DE L'ECL PRODUITE A UNE UME PAR LE SYSTEME $[Ru(BPY)_3]^{2+}/TPRA$ -----	138
3.	SUIVI DE L'ECL PRODUITE A UNE UME PAR LE SYSTEME L-012/H ₂ O ₂ -----	141
4.	COUPLAGE DE COLLISIONS DE NANOPARTICULES DE PLATINE A UNE UME POLARISEE AVEC UNE EMISSION ECL INDEPENDANTE PAR LE SYSTEME L-012/H ₂ O ₂ . -----	144
5.	CONCLUSIONS -----	146
	REFERENCES DU CHAPITRE -----	148
	ANNEXE DU CHAPITRE VI -----	150
CHAPITRE VII -----		153
APPROCHE PUREMENT ELECTRONIQUE POUR LA MESURE DE COURANTS ULTRA- FAIBLES : AMPLIFICATEUR TRANSIMPEDANCE A CONTRE-REACTION CAPACITIVE		
1.	INTRODUCTION -----	154
2.	FONCTIONNEMENT DE L'ATI-C IDEAL -----	157

3. L'AMPLIFICATEUR TRANSIMPEDANCE A CONTRE-REACTION CAPACITIVE PROPOSE -----	159
4. CARACTERISATION EXPERIMENTALE DE L'APPAREIL REALISE -----	163
5. CONCLUSIONS -----	168
REFERENCES DU CHAPITRE-----	170
ANNEXE DU CHAPITRE VII -----	172
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES-----	179
PARTIE EXPERIMENTALE-----	183

Introduction générale

Le développement de la nanoélectrochimie a engendré le besoin de mesure de courants faradiques plus faibles que jamais. La mesure de tels courants, associés à la détection d'un très petit nombre de molécules, voire d'une molécule unique, reste un défi instrumental majeur en électrochimie. A ce jour, seuls des dispositifs avancés basés sur le cyclage redox de molécules électroactives entre 2 électrodes, un processus qui constitue un puissant mécanisme d'amplification du courant faradique, ont permis de relever ce challenge technologique. Dans cette configuration dite à « nano-gap » la détection d'une molécule individuelle se traduit, pour les dispositifs à visée analytique, par un courant de l'ordre de quelques fA. La mesure d'un courant électrochimique de cette intensité est particulièrement délicate, elle n'a d'ailleurs été accomplie que par une poignée d'équipes de recherche, pionnières dans la nanofluidique appliquée à l'électrochimie [1], [2], ou en nano-SECM [3]–[5]. La détection de protéines individuelles par microscopie AFM-SECM, récemment rapportée par notre équipe (Bionano du LEM) [6], repose elle aussi sur le principe du cyclage redox dans un nano-gap sonde-substrat. Elle nécessite également la mesure de courants de l'ordre de quelques fA, rendue possible par l'emploi d'un montage amplificateur transimpédance à contre-réaction résistive de très haute sensibilité. L'équipe Bionano du LEM fait donc d'ores et déjà partie du club très fermé des groupes de recherches capables de sonder des phénomènes électrochimiques se traduisant par des « femto-courants ». Cela dit, atteindre une sensibilité en courant encore plus grande est nécessaire, par exemple pour la caractérisation de l'activité d'une molécule d'enzyme individuelle, ou de nanocatalyseurs artificiels à faible « turnover », c'est-à-dire catalysant des réactions lentes, pour lesquelles un seuil de détection de ~ 1 fA est insuffisant. En effet un courant de 1 fA correspond à un flux de quelques dizaines de milliers d'électrons par seconde, ce qui est bien au-delà des turnovers des enzymes « classiques », qui se situent souvent entre 100 et 1000 s^{-1} . Il serait donc souhaitable, pour cette application, de gagner un facteur 10 voire 100 en sensibilité.

Nous croyons que ce saut quantitatif ne pourra être réalisé que si de nouvelles stratégies de détection d'événements faradiques, ne reposant pas sur la mesure *directe* du courant, sont proposées.

Se pose également en nanoelectrochimie le problème instrumental de l'amélioration de la bande passante de la mesure de « petits courants », de l'ordre du pA. C'est par exemple le cas

lorsqu'on cherche à étudier la dynamique de la collision de nanoparticules avec une microélectrode.

Nous détaillerons en Chapitre II un certain nombre de travaux de la littérature illustrant plus avant les besoins de mesure de très faibles courants en nanoélectrochimie et/ou d'amélioration de la bande passante. Au Chapitre III nous discutons des limitations instrumentales actuelles pour ces mesures et proposerons différentes stratégies expérimentales pour les dépasser.

Dans un premier temps nous proposerons une approche originale et prometteuse, à peine explorée dans la littérature, et qui consiste à transformer la mesure du courant faradique en celle d'un signal lumineux [7], [8], bien plus aisée. Pour s'en convaincre il suffit de se rappeler que la détection de photons individuels est réalisée de façon assez courante aujourd'hui, alors que la détection d'électrons individuels en électrochimie reste inaccessible. Convertir un événement électrochimique, c'est-à-dire le transfert d'un, ou de quelques électrons en un événement « lumineux » constitue donc un mécanisme d'amplification intrinsèque, en ce sens que le dit événement devient à priori détectable. Aux chapitres IV et V nous présenterons un schéma de mesure inédit permettant de convertir de faibles courants électrochimiques en une émission de *fluorescence* analogue. Au chapitre VI nous dévoilerons des résultats expérimentaux préliminaires visant à remplacer la fluorescence par l'électrochimiluminescence (ECL) comme mécanisme de transduction courant/lumière. Dans ce même chapitre nous présenterons l'application de notre dispositif de conversion à la détection de la collision de nanoparticules avec une ultramicroélectrode.

Dans une seconde partie de ce travail de thèse (Chapitre VII), nous étudierons une approche purement électronique de la mesure de petits courants, via la mise au point d'un montage intégrateur, aussi appelé montage transimpédance à contre-réaction capacitive, à base d'amplificateurs opérationnels. Il s'agira de comparer les performances de ce montage avec celles d'un amplificateur transimpédance à contre-réaction résistive, utilisé plus classiquement pour la mesure de courants faibles en électrochimie. Notre montage doit permettre un gain en sensibilité modeste, mais suffisant pour améliorer de façon appréciable la mesure de courants de l'ordre de 1 fA.

Mais en tout premier lieu, il nous a paru important de rappeler les rudiments de l'électrochimie au lecteur électronicien, c'est l'objectif du Chapitre I.

Références de l'introduction générale

- [1] M. A. G. Zevenbergen, P. S. Singh, E. D. Goluch, B. L. Wolfrum, and S. G. Lemay, "Stochastic Sensing of Single Molecules in a Nanofluidic Electrochemical Device," *Nano Lett.*, vol. 11, no. 7, pp. 2881–2886, 2011, doi: 10.1021/nl2013423.
- [2] S. Kang, A. F. Nieuwenhuis, K. Mathwig, D. Mampallil, and S. G. Lemay, "Electrochemical single-molecule detection in aqueous solution using self-aligned nanogap transducers," *ACS Nano*, vol. 7, no. 12, pp. 10931–10937, 2013, doi: 10.1021/nn404440v.
- [3] F.-R. F. Fan, J. Kwak, and A. J. Bard, "Single Molecule Electrochemistry," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 40, pp. 9669–9675, 1996, doi: 10.1021/ja9610794.
- [4] J. C. Byers, B. Paulose Nadappuram, D. Perry, K. McKelvey, A. W. Colburn, and P. R. Unwin, "Single Molecule Electrochemical Detection in Aqueous Solutions and Ionic Liquids," *Anal. Chem.*, vol. 87, pp. 10450–10456, 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02569.
- [5] L. Nault *et al.*, "Electrochemical atomic force microscopy imaging of redox-immunomarked proteins on native potyviruses: From subparticle to single-protein resolution," *ACS Nano*, vol. 9, pp. 4911–4924, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b00952.
- [6] K. Chennit *et al.*, "Electrochemical Imaging of Dense Molecular Nanoarrays," *Anal. Chem.*, vol. 89, pp. 11061–11069, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03111.
- [7] K. Mathwig, T. J. Aartsma, G. W. Canters, and S. G. Lemay, "Nanoscale Methods for Single-Molecule Electrochemistry," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 7, pp. 383–404, 2014, doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092557.
- [8] Y. Fan, T. J. Anderson, and B. Zhang, "Single-molecule electrochemistry: From redox cycling to single redox events," *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 7, pp. 81–86, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.11.002>.
- [9] E. Voulgari, M. Noy, F. Anghinolfi, D. Perrin, F. Krummenacher, and M. Kayal, "A front-end ASIC for ionising radiation monitoring with femto-amp capabilities," *J. Instrum.*, vol. 11, no. 2, 2016, doi: 10.1088/1748-0221/11/02/C02071.

Chapitre I

**Introduction à l'électrochimie pour le lecteur
électronicien**

Introduction à l'électrochimie pour le lecteur électronique

1. Introduction

La bonne compréhension du travail présenté dans cette thèse nécessite pour le lecteur une bonne maîtrise de l'électrochimie mais aussi de l'électronique. Si dans leur formation les électrochimistes ont souvent acquis des bases en électronique, il n'en va pas forcément de même pour des lecteurs électroniciens, souvent peu familiarisés à l'électrochimie durant leur cursus. C'est pourquoi il est nécessaire de présenter ici les notions de bases de l'électrochimie, en se limitant à celles directement utiles à l'interprétation des résultats expérimentaux rapportés plus loin.

2. Cellule et courants électrochimiques.

(a) – La cellule électrochimique

Une cellule électrochimique élémentaire consiste en deux électrodes métalliques immergées dans un solvant contenant des espèces ioniques (Figure I.1). Lorsqu'une différence de potentiel suffisante est appliquée entre les deux électrodes, un courant traverse la cellule. Ce courant, circule depuis l'électrode connectée au pôle (+) du générateur, l'anode, vers l'électrode connectée au pôle (-), la cathode, *en traversant la solution*.

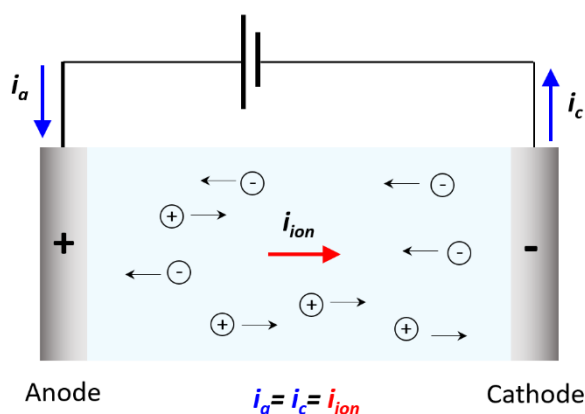


Figure I.1. Schéma d'une cellule électrochimique élémentaire comprenant deux électrodes séparées par une solution ionique (électrolyte). Un potentiel est appliqué entre les deux électrodes, générant un courant qui circule à travers la solution.

Une première spécificité de l'électrochimie apparaît : la nature des porteurs de charge varie le long du parcours du courant. Un courant *électronique* traverse les électrodes alors

qu'un courant *ionique*, c'est-à-dire dû uniquement au mouvement net des ions, traverse la solution. C'est pour permettre le passage de ce courant qu'on introduit typiquement en solution une forte concentration en électrolyte support, constitué d'un sel se dissociant en ions. Ces ions sont choisis afin d'être inertes du point de vue électrochimique. Leur concentration détermine la résistance de la solution, R_s , qui dépend également de leur mobilité (liée à leur taille, leur charge) mais également de la nature du solvant. Ici, nous travaillerons en milieu aqueux, avec une concentration en électrolyte support, souvent un tampon, telle que R_s sera de l'ordre de 100 Ω .

Une autre contrainte est évidente en Figure I.1 : l'intensité des courants traversant l'anode, la cathode et la solution doit être la même, pour des raisons d'électroneutralité.

L'électrochimie qui nous concerne ici s'intéresse aux processus ayant lieu à l'interface entre les électrodes et la solution. Ce sont ces processus qui assurent la conversion du courant électronique vers un courant ionique, ils peuvent être de deux natures bien distinctes : capacitifs ou Faradiques.

(b) Génération d'un courant capacitif

Lorsqu'une électrode est introduite dans une solution électrolytique, et qu'un potentiel lui est appliqué, sa charge surfacique, constituée d'un « excès » ou d'un « défaut » d'électrons suivant la valeur du potentiel, est nécessairement compensée par l'ordonnement d'ions du côté solution, maintenant ainsi l'électroneutralité locale (Figure I.2) [1].

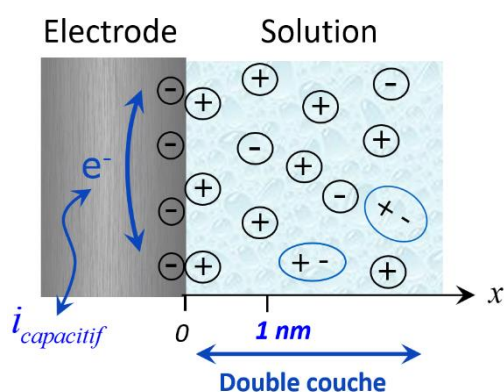


Figure I.2. Représentation de l'interface électrochimique à l'échelle du nanomètre, montrant l'arrangement des ions de la solution au voisinage immédiat de la surface de l'électrode, pour former la « double couche électrochimique » qui permet de maintenir l'électroneutralité locale.

Ces ions sont ceux de l'électrolyte support, ils se disposent pour partie en une première couche dite « compacte » au plus près de l'électrode et forment, pour une autre partie, une couche dite « diffuse » qui s'étend à partir de la surface de l'électrode vers la solution. L'étendue de cette « double couche électrochimique » est typiquement de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres, en fonction de la concentration totale en électrolyte (Figure I.2). Ainsi l'interface électrode / électrolyte peut être vu comme une capacité dont l'une des armatures est métallique et l'autre électrochimique. Ceci s'applique naturellement à la fois à l'anode et la cathode. Schématiquement on peut donc voir à ce stade la cellule électrochimique montrée en Figure I.1 comme équivalente à deux capacités séparées par une résistance R_s . On comprend donc que tout changement transitoire de potentiel appliqué aux électrodes se traduira par la génération d'un courant, dit *capacitif*, traduisant le réarrangement des charges de part et d'autre des interfaces électrode/solution.

(c) Génération d'un courant faradique

Un courant aux interfaces d'une tout autre nature, présentant bien plus d'intérêt ici, est celui dit faradique. Ce courant, correspond à un transfert d'électrons *effectif* depuis une électrode vers une espèce en solution ou vice-versa. Dans le premier cas on parle de réduction, et dans le second cas d'oxydation, comme schématisé en Figure I.3 [1].

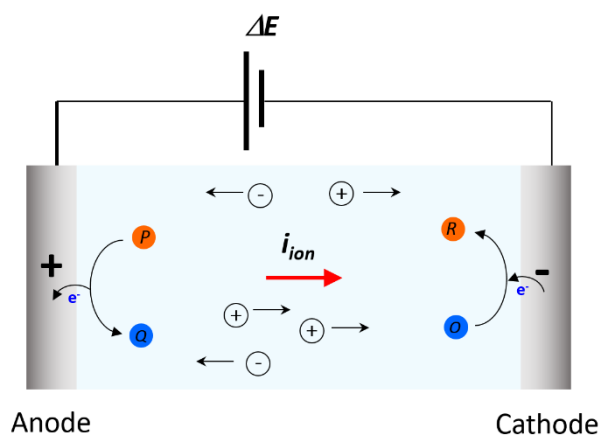


Figure I.3. Génération de courants faradiques circulant à travers une cellule électrochimique. L'oxydation de l'espèce P à l'anode est couplée à la réduction de l'espèce O à la cathode.

Le passage du courant faradique nécessite bien sûr la présence en solution d'espèces capables d'accepter ou de céder des électrons à l'électrode, qu'on qualifera d'espèces électroactives ou redox, typiquement des molécules organiques pour nous (P et R en Figure I.3). Ces transferts d'électrons ne peuvent avoir lieu que vers ou depuis les niveaux

d'énergie discrets des orbitales moléculaires, qui doivent pour cela être respectivement vides ou occupées. En réduction le transfert a lieu depuis le niveau de Fermi du matériau d'électrode vers l'orbitale moléculaire « vide » de plus basse énergie (LUMO) de l'espèce redox, en oxydation le transfert a lieu depuis l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO) vers le niveau de Fermi, Figure I.4.

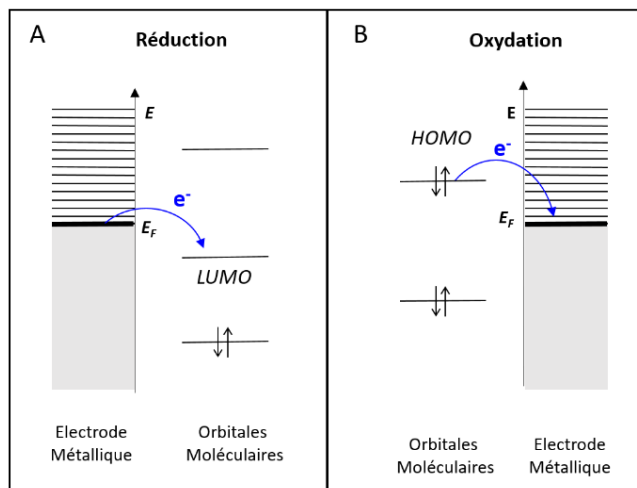


Figure I.4. Diagramme énergétique des processus de transfert d'électronique associés à la réduction (A) et à l'oxydation (B) d'une espèce redox à une électrode métallique, à laquelle on applique un potentiel E . E_F est le niveau de Fermi des électrons. LUMO = Lowest unoccupied molecular orbital. HOMO = Highest occupied molecular orbital.

On voit que le courant ne peut circuler que s'y il y a « correspondance » entre les niveaux d'énergie des électrons dans l'électrode et les orbitales moléculaires. Une réduction nécessitera un potentiel suffisamment négatif, en dessous duquel aucun courant ne pourra circuler, alors qu'une oxydation nécessitera au contraire un potentiel suffisamment positif. Cette contrainte étant à décliner simultanément pour l'anode et la cathode, le passage (ou le non passage) du courant pour une valeur de potentiel appliqué à la cellule est donc lié de manière intriquée aux processus se déroulant aux 2 électrodes. Ainsi il apparaît que si l'on veut, comme c'est le but en électrochimie moléculaire, comprendre les phénomènes de transfert d'électron aux électrodes (et réactions associées), la simple cellule à 2 électrodes est insuffisante.

Ces études nécessitent de pouvoir contrôler sélectivement le potentiel à *une seule des électrodes*, afin d'étudier spécifiquement les réactions électrochimiques qui y sont déclenchées. C'est ce que permet le montage potentiostatique.

3. Le montage potentiostatique

Proposé dès 1942 par Hicklings, et largement amélioré depuis, ce montage électronique est présenté dans sa version moderne en Figure I.5.

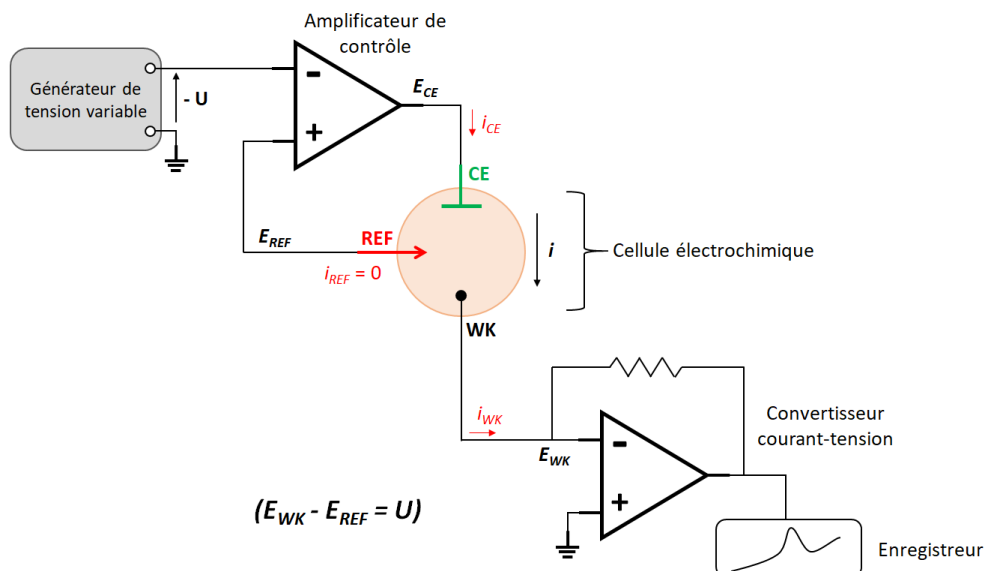


Figure I.5. Schéma général d'un montage potentiostatique connecté à une cellule électrochimique. Le montage impose une différence de potentiel $E_{WK} - E_{REF} = U$. Le convertisseur courant-tension fournit une tension mesurable proportionnelle au courant généré.

Du point de vu de l'électrochimiste il a l'immense mérite de permettre de contrôler le potentiel d'une des électrodes, qui prend le nom d'électrode de travail (WK), par rapport à une troisième électrode introduite en solution, dite électrode de référence (REF), dont le potentiel reste fixe et est parfaitement défini thermodynamiquement. Le courant circule toujours depuis/vers l'électrode de travail à travers la solution vers/depus la seconde électrode, qui est alors dite contre-électrode (ou CE).

Du point de vu de l'électronicien son mode de fonctionnement est vu comme suit :

Le montage impose une différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence $E_{WK} - E_{REF} = U$ qu'on peut contrôler par un générateur de tension variable. En plus de fournir une tension mesurable proportionnelle au courant traversant la cellule électrochimique, le convertisseur courant-tension, maintient le potentiel de la WK à la masse fictive. L'amplificateur de contrôle connecte la contre-électrode à la REF à travers la résistance de la solution contenue dans la cellule électrochimique et impose $E_{REF} = -U$.

L'impédance d'entrée de l'amplificateur étant théoriquement infinie, aucun courant ne traverse la REF et aucune réaction électrochimique ne vient détériorer l'électrode plongée dans la solution et son potentiel reste stable à tout moment, c'est ce point-là qui fait que ce montage « à trois électrodes » est beaucoup plus fiable qu'un montage « à deux électrodes », comme présenté par exemple en Figure I.3, pour les études en électrochimie.

L'électrochimiste quant à lui se représente le fonctionnement du montage sur la base de courbes intensité-potentiel génériques, caractérisant les processus ayant lieu à l'électrode de travail (WK) et à la contre-électrode (CE) (Figure I.6).

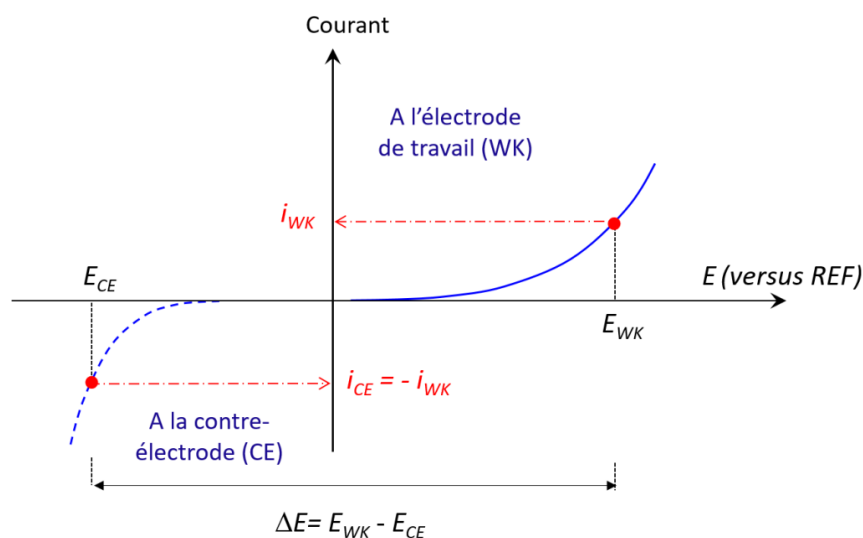


Figure I.6. Courbes intensité-potentiel modèles, représentant la génération de courants faradiques aux électrodes de travail (WK) et à la contre-électrode (CE), d'un montage à 3 électrodes. Un potentiel E_{WK} est appliqué à la WK. La contrainte d'égalité (en valeur absolue) des intensités traversant la WK et la CE fixe le potentiel appliqué à la CE par le potentiostat, à la valeur E_{CE} .

Sur ces courbes modèles, le courant circulant à travers la WK, i_{WK} , et la CE, i_{CE} , sont portés en fonction des potentiels respectifs de ces électrodes, *exprimés par rapport à celui de l'électrode de référence (REF)*. On voit que, pour un courant i_{WK} donné, résultant de l'application d'un potentiel E_{WK} à l'électrode de travail, la condition nécessaire $i_{WK} = -i_{CE}$ fixe la valeur du potentiel de la contre-électrode, E_{CE} : ce potentiel correspond au point de la courbe intensité-potentiel i_{CE} vs. E_{CE} tel que les courants circulants à travers la contre-électrode et l'électrode de travail soient d'une intensité égale en valeur absolue mais de signes opposés. Cependant, la nature de la réaction électrochimique générant le courant à la contre-électrode n'est en général pas connue, ni d'intérêt. Il peut s'agir de la réduction ou de l'oxydation du solvant, des processus que l'application de potentiels suffisamment cathodiques ou anodiques peuvent toujours déclencher. Ainsi, en milieu aqueux un potentiel

suffisamment anodique provoquera l'oxydation de l'eau pour former de l'oxygène et un potentiel suffisamment anodique réduira l'eau (les protons H^+), pour former de l'hydrogène. La réduction de l'oxygène naturellement dissout dans l'eau fournit également une réaction de réduction possible à la contre-électrode. La valeur de E_{CE} effectivement appliquée correspond à la « première » réaction de réduction ou d'oxydation rencontrée permettant le passage du courant.

Au final, dans la vision de l'électrochimiste, le potentiostat ajuste la différence de potentiel $\Delta E = E_{WK} - E_{CE}$ pour maintenir le système à son point de fonctionnement, quel que soit la valeur du potentiel d'électrode de travail, qu'il peut librement choisir. Le montage potentiostatique rend donc possible de faire abstraction des processus se déroulant à la contre-électrode, pour se focaliser spécifiquement sur ceux ayant lieu à l'électrode de travail. On peut ainsi mesurer sans contrainte le courant résultant de l'application du potentiel choisi à la WK, et construire des *courbes intensité-potentiel*, bien réelles celles-là. Ces courbes permettent d'identifier les réactions en jeu, sur la base de leur potentiel d'occurrence, le courant fournissant quant à lui des informations sur leur cinétique.

4. Electrochimie à une électrode : les courbes intensité-potentiel

Afin d'établir des courbes intensité-potentiel, le courant traversant l'électrode (de travail), i , est porté en fonction de son potentiel, E , qui peut être varié continument ou point par point. Pour interpréter ces courbes $i-E$, il est nécessaire de considérer en détails les processus associés à la génération du courant faradique, comme montré en Figure I.7.

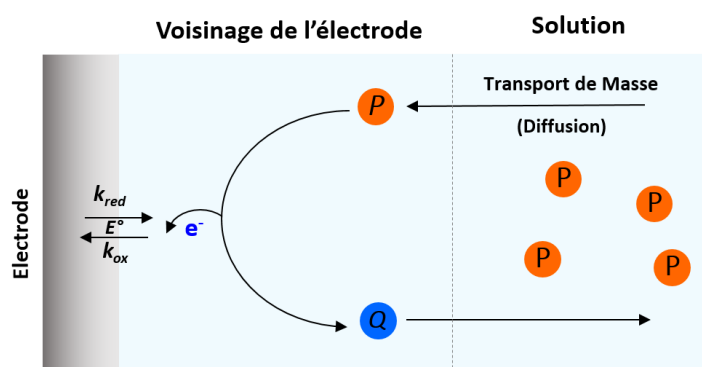


Figure I.7. Schématisation des processus gouvernant la réaction (l'oxydation ici) d'une espèce redox P en solution à une électrode, pour former l'espèce Q . Les étapes de transport de masse depuis la solution et de transfert d'électron sont représentées, elles peuvent conjointement contrôler la génération du courant électrochimique faradique.

La forme réduite P d'un couple redox d'intérêt P/Q , est introduite en solution et un potentiel E suffisamment « positif » pour provoquer l'oxydation de P en Q est appliqué à l'électrode de travail. La thermodynamique de ce transfert d'électron est caractérisée par E° , le potentiel standard du couple P/Q . E° dépend, comme expliqué plus haut, de l'énergie des électrons occupant le niveau d'énergie de l'HOMO, mais également de l'énergie de solvation des espèces P et Q . Schématiquement, si E est supérieur à E° , le transfert d'électron représenté en Figure I.7 est thermodynamiquement favorable, et l'oxydation de P en Q a lieu. Le courant traversant l'électrode est alors dit anodique. A l'inverse si $E < E^\circ$ c'est la réduction de Q à l'électrode qui est favorisée. On parle alors d'un courant cathodique.

Les vitesses des transferts d'électron en réduction et en oxydation sont caractérisées par les constantes cinétiques hétérogènes de premier ordre k_{red} et k_{ox} , elles même reliées au potentiel de l'électrode. Suivant le modèle le plus simple, empirique, dit de Butler-Volmer, on a :[2]

$$k_{red} = k_s \exp\left[-\alpha nF \left(\frac{E - E^\circ}{RT}\right)\right] \quad k_{ox} = k_s \exp\left[(1 - \alpha) nF \left(\frac{E - E^\circ}{RT}\right)\right]$$

Avec α le coefficient de transfert, tel que $\alpha = 0.5$ pour un transfert d'électron simple, dit « sphère externe ».

$k_s = k_{ox}[E = E^\circ] = k_{red}[E = E^\circ]$ est la constante de vitesse standard de transfert d'électron hétérogène de l'espèce considérée, en cm/s.

Toutefois, comme schématisé en Figure I.7 le courant n'est pas contrôlé uniquement par la cinétique du transfert d'électron, mais aussi par la vitesse à laquelle les espèces arrivent à l'électrode, qui peut par exemple dépendre de leur simple diffusion, mais aussi de leur migration dans le champ de l'électrode, ou de l'agitation de la solution. Cependant, on peut montrer que les ions de l'électrolyte support, dès lors qu'ils sont en fort excès par rapport à l'espèce redox d'intérêt, transportent l'intégralité du courant ionique, et rendent ainsi négligeable la migration de l'espèce interrogée à l'électrode.

Ainsi pour une solution non agitée le seul phénomène de transport à prendre en compte pour le contrôle du courant est la simple diffusion de l'espèce redox, aisément modélisée par les lois de Fick.

Enfin la forme des courbes intensité-potentiel dépendra également de la façon dont le potentiel de l'électrode est varié, ce qui définit d'ailleurs la technique d'analyse électrochimique employée. Parmi les nombreuses techniques qui existent nous présenterons les plus simples, celles que nous avons utilisées dans ce travail, à savoir la voltammétrie cyclique et la chronoampérométrie. Notons que, quel que soit la technique employée, le courant est toujours proportionnel à la concentration de l'espèce redox en solution, ce qui fait des méthodes électrochimiques des techniques analytiques prisées.

5. La voltammétrie cyclique transitoire

La voltammétrie cyclique a été introduite dans les années 1960 [3], et le fondateur du LEM, le professeur Jean-Michel Savéant, a largement contribué à développer son usage en électrochimie moléculaire depuis [4]. Cette branche de l'électrochimie, dans laquelle s'inscrit ce travail, s'intéresse au processus de transfert d'électron des molécules organiques aux électrodes et aux réactions chimiques qu'il déclenche.

La voltammétrie cyclique, ou cyclic voltammetry en anglais (CV), consiste à balayer linéairement le potentiel de l'électrode, avec une vitesse v en V/s, depuis un potentiel où « rien ne se passe », vers une zone de potentiel où le transfert d'électron d'intérêt devient thermodynamiquement possible, Figure I.8A.

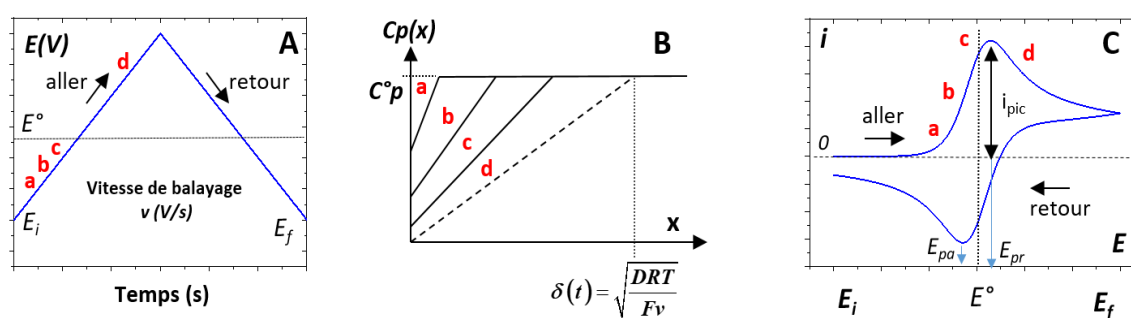


Figure I.8. (A) Balayage en potentiel (rampe) appliqué à l'électrode de travail en voltammétrie cyclique, pour déclencher le processus d'oxydation montré en Figure I.7. (B) Schématisation du profil de diffusion de l'espèce réagissant à l'électrode, P , montrant sa consommation en fonction de l'avancement du balayage (repères a, b, c, d). (C) Courbe intensité – potentiel, ou voltammogramme, mesuré durant l'application de la rampe en potentiel montrée en A.

Dans cette zone, située au-delà ou en deçà du E° , suivant qu'il s'agisse d'une réaction d'oxydation ou de réduction, le transfert d'électron a lieu. L'espèce réagissant avec l'électrode, P , est consommée à l'électrode et sa concentration locale, initialement égale à

celle introduite en solution, $C^{\circ}P$, s'appauvrit au sein d'une couche de diffusion, dont l'étendue croît avec le temps, pour atteindre 1-10 μm . (Figure I.8B). L'évolution du profil de concentration de P avec le temps est donnée par la seconde loi de Fick. Pour des électrodes suffisamment grandes (en pratique d'une taille de l'ordre du millimètre) seule la diffusion *perpendiculaire* à la surface de l'électrode est à prendre en compte (les « effets de bords » sont négligés). Dans ce régime, dit de diffusion plane, la seconde loi de Fick se résume à :

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2}$$

Où C_p est la concentration en espèce P à la position x mesurée à partir du plan de l'électrode, au temps t .

D est le coefficient de diffusion (supposé identique) des espèces P et Q .

Le courant correspond au flux purement diffusif de P vers l'électrode, il est donné par la première loi de Fick:

$$i = FSD \left(\frac{\partial C_p}{\partial x} \right)_{x=0}$$

Où F est la constante de Faraday et S la surface de l'électrode

Le courant correspond donc à la dérivée du profil de concentration à l'électrode schématisé en Figure I.8B.

Dans le cas particulièrement simple où la vitesse de transfert d'électrons est rapide par rapport à la diffusion, cas dit « Nernstien », le signal à pic représenté en Figure I.8C (vague « aller ») est obtenu. Il est caractérisé par l'apparition d'un pic, dû à l'épuisement de P à l'électrode, dont on peut commodément mesurer l'intensité, i_{pic} , et la position en potentiel, E_{pa} . Une fois ce pic passé, le sens de balayage en potentiel est inversé (cf. Figure I.8A) et un signal « retour » est enregistré. Il correspond à la détection à l'électrode des espèces Q produites durant le balayage aller, et présente donc un pic en courant de signe opposé à celui enregistré à l'aller. Ainsi le signal est dit 'réversible'. Là aussi on mesure le potentiel de ce pic retour, E_{pr} .

Les caractéristiques quantitatives d'un tel voltammogramme Nernstien sont les suivantes. L'intensité du courant de pic de la vague aller est donnée par :

$$i_{pic} = 0.446FSC_p^0\sqrt{DF\nu/RT} \quad (I.1)$$

Notons que i_{pic} croît avec la racine carrée de la vitesse de balayage, ce qui constitue une signature de la voltammétrie cyclique en régime de diffusion plane. Cela marque aussi la dépendance temporelle du signal, d'où le nom de voltammétrie transitoire. La mesure du courant de pic permet de déterminer le coefficient de diffusion de l'espèce d'intérêt et/ou sa concentration.

L'analyse du CV permet également la détermination du E° de l'espèce en question, car :

$$E^\circ = (E_{pa} + E_{pr})/2$$

L'écart entre les pics du voltammogramme, $E_{pa} - E_{pr}$ est de 60 mV. Cette valeur constitue la signature bien connue d'un transfert rapide (Nernstien) en CV transitoire.

D'une façon générale, l'intérêt de la voltammétrie cyclique transitoire, par rapport aux autres techniques électrochimiques, est la dépendance frappante de l'aspect des signaux en fonction des phénomènes cinétiques qui contrôlent, ou suivent, le transfert d'électron.

Ainsi, par exemple, lorsque le transfert d'électron devient cinétiquement déterminant, c.-à-d. devient lent par rapport à la diffusion, la forme du CV change de façon notable (Figure I.9A). De plus, les potentiels des pics aller et retour se décalent dans des directions opposées, si bien que l'écart entre les pics augmente par rapport à un signal « Nernstien ». L'analyse de la dépendance de cet écart avec la vitesse de balayage permet la détermination de la constante de vitesse standard de transfert d'électron hétérogène k_s [4].

De même, si une réaction chimique suit le transfert d'électron, c'est-à-dire si l'espèce Q est consommée par un processus quelconque, le voltammogramme perd sa réversibilité, c'est à dire qu'il ne comporte plus de pic au retour (Figure I.9B). Cette perte de réversibilité n'est complète que si la réaction chimique consommant Q a lieu dans un temps plus court que l'enregistrement du voltammogramme. De plus le potentiel de pic aller devient dépendant de la vitesse de balayage. Ainsi en faisant varier ν il est possible de quantifier la cinétique de la réaction chimique : à basse vitesse le CV est irréversible (c.-à-d. ne présente

plus de pic retour) et peut redevenir réversible à haute vitesse, une fois le processus chimique « rattrapé ».

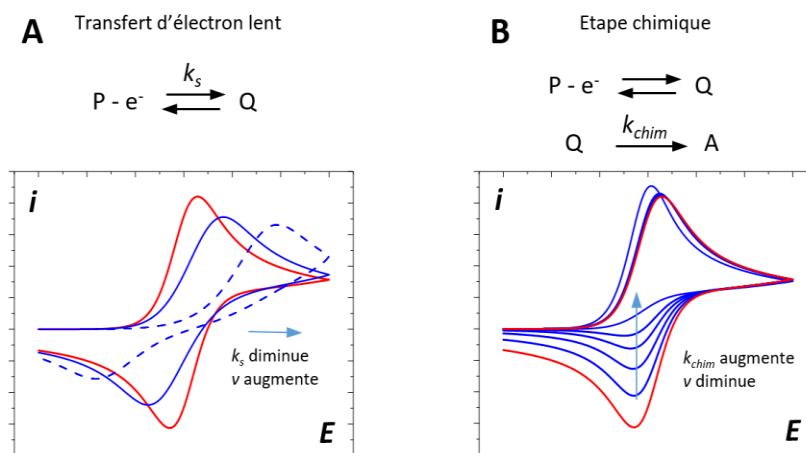


Figure I.9. (A) Influence de la vitesse du transfert d'électron sur l'apparence du voltammogramme. Le signal en rouge correspond à une vitesse de transfert d'électron rapide par rapport à la diffusion, CV dit Nernstien. Les signaux en bleus correspondent au cas où la vitesse du transfert d'électron est suffisamment lente pour contribuer au contrôle cinétique du courant. (B) Influence sur le CV d'une réaction chimique de premier ordre consommant l'espèce formée à l'électrode. En rouge le CV en l'absence de la réaction.

Au-delà de cette présentation rapide, il faut retenir ici que la voltammétrie cyclique transitoire est une technique puissante et particulièrement bien adaptée pour l'analyse du mécanisme des réactions déclenchées par le transfert d'électron. Il est nécessaire de s'appuyer pour cela, lorsque c'est possible, sur le formalisme largement développé au LEM par J.M. Savéant et ses collaborateurs au fil des années. A défaut, ou en complément, il faut avoir recours à la simulation numérique des signaux de CV à l'aide de logiciels commerciaux tels que DigiElch, dont nous ferons bon usage dans ce travail.

Enfin, pour en venir à des considérations instrumentales, il est intéressant de calculer l'intensité des courants typiquement mesurés par voltammétrie cyclique transitoire dans les conditions définies ci-dessus. Il faut pour cela prendre en compte qu'en électrochimie moléculaire, on s'adresse typiquement à des molécules organiques redox, ayant un coefficient de diffusion d'environ $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, présentes à une concentration de $\sim 1 \text{ mM}$ et interrogées à l'aide d'électrodes en forme de disque de 3 mm de diamètre, avec une vitesse de balayage de 0.1-100 V/s (à 25°C). On peut ainsi calculer, grâce à l'Equation (I.1), que les courants de pics, i_{pic} , des CV sont de l'ordre de quelques dizaines voire centaines de μA , aisément mesurés par l'instrumentation classique. Pour ce qui est de la bande passante nécessaire à la bonne mesure des courants de CV, il faut que celle-ci soit suffisamment

grande par rapport à l'inverse du temps caractéristique de la CV, qu'on peut définir comme $\tau_{cv} = RT/Fv$. Ainsi une bande passante de ~ 10 kHz, courante pour les appareils commerciaux capables de mesurer des μA , sera suffisante pour la CV transitoire, jusqu'à 100 V/s.

Génération de courants capacitifs en voltammétrie cyclique.

Nous l'avons vu plus haut, l'interface électrode/électrolyte se comporte comme une capacité. Il en résulte que le balayage linéaire en potentiel appliqué à l'électrode en voltammétrie cyclique se traduit par la génération d'un courant capacitif d'une intensité $i_{capa} = C_d v$ pour le balayage aller et $-i_{capa}$ pour le balayage retour, où C_d est la capacité de la double couche. La génération du courant capacitif n'interfère pas avec celle du courant faradique car l'étendue de la double couche et celle de la couche de diffusion des espèces redox différent de plusieurs ordres de grandeur. Ainsi le courant capacitif ne fera que s'ajouter algébriquement au courant faradique, « déformant » quelque peu le voltammogramme comme montré en Figure I.10.

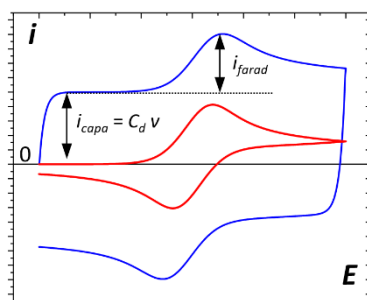


Figure I.10. Influence du courant capacitif sur le signal en voltammétrie cyclique. En rouge : voltammogramme transitoire simulé sans prendre en compte le courant capacitif. En bleu : Signal simulé en introduisant une composante capacitive. On montre comment ce dernier CV peut être corrigé de la composante capacitive pour déterminer le courant purement faradique.

On voit que la mesure précise du courant faradique reste néanmoins possible après correction d'une ligne de base reproduisant « l'offset » en courant dû au courant capacitif. Il s'agit là de données simulées et cette correction est parfois plus difficile à faire, compte tenue de la nature « non-idéale » des courants capacitifs réels. Cette non idéalité provient du fait que la capacité électrochimique de l'électrode peut en réalité varier avec le potentiel, ou refléter des réactions faradiques parasites d'espèces adsorbées en surface. Ajoutons enfin que la charge de la double couche ayant lieu à travers la résistance de la solution, R_s , en résulte un temps caractéristique de la cellule $R_s C_d$ qui limite la bande passante de la mesure en courant. Fort heureusement, comme dans l'exemple simulé en Figure I.10, nous

travaillerons ici en milieu aqueux très peu résistif et ce temps caractéristique sera trop bref pour impacter nos mesures. En effet R_s sera de l'ordre de 100Ω , et, pour une électrode à disque de 3 mm de diamètre, C_d vaudra environ $2 \mu\text{F}$, si bien qu'un temps de cellule $R_s C_d = 200 \mu\text{s}$ est attendu. C_d étant proportionnel la surface de l'électrode, et R_s inversement proportionnel à son diamètre, des temps caractéristiques de cellule encore plus faibles seront obtenus pour des électrodes plus petites [5], [6].

6. La Chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une technique que nous emploierons également par la suite et qu'il convient donc de décrire brièvement. Elle consiste à appliquer à l'électrode un saut de potentiel instantané, depuis une zone de potentiel où aucune réaction faradique n'a lieu, vers un potentiel suffisamment au-delà (pour une oxydation) ou en deçà (pour une réduction) de E° , pour déclencher le transfert d'électron, et faire en sorte qu'il soit rapide, Figure I.11A. Ainsi le signal en courant collecté, montré en Figure I.11B, traduit uniquement la diffusion de l'espèce redox vers l'électrode [7].

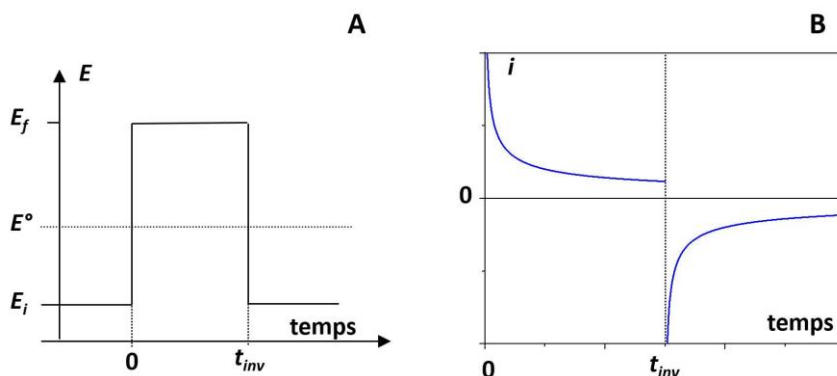


Figure I.11. Principe de la chronoampérométrie à double saut potentiostatique. (A) Double saut en potentiel appliqué à l'électrode de travail. (B) Réponse en courant : un chronoampérogramme.

Il s'agit donc d'une technique privilégiée pour mesurer le coefficient de diffusion D des espèces à partir de l'expression analytique du courant, dite équation de Cottrell:

$$i_{cotrl} = nFSC_P^0 \sqrt{D/\pi t}$$

Un raffinement de cette technique consiste à effectuer un saut « retour » vers le potentiel initial, après un temps d'attente programmable (t_{inv} en Figure I.11). Le courant traduit alors la collection de l'espèce Q formée à l'électrode durant le temps d'attente, sauf bien sûr si celle-ci a été consommée par une réaction chimique dans l'intervalle. Ajoutons enfin que,

comme expliqué plus haut, ces changements de potentiels génèrent des courants capacitifs instantanés, décroissant en $\exp(-t/R_s C_d)$, en parallèle du courant faradique. Typiquement il est possible de différencier ces deux courants de par la décroissance bien plus lente du courant faradique, en $1/\sqrt{t}$, qui domine le signal au-delà de quelques dizaines de μs après le saut en potentiel.

7. Voltammétrie cyclique aux ultramicroélectrodes

A partir des années 1980 les électrochimistes ont commencé à s'intéresser à l'emploi d'électrodes d'une taille micrométrique, typiquement de 1-50 μm , dites "ultramicroélectrodes" (ou UME ou parfois juste « microélectrodes ») [8], [9]. Explorer les nombreuses perspectives ouvertes par la voltammétrie aux microélectrodes a occupé cette communauté durant les quelques dizaines d'années qui ont suivi les travaux initiaux [5], [6].

Schématiquement, les propriétés particulières des microélectrodes en voltammétrie cyclique proviennent du fait que l'épaisseur de la couche de diffusion δ qui s'y développe devient comparable à leur taille physique (rayon ou diamètre). Le champ de diffusion à prendre en compte n'est alors plus plan mais sphérique, Figure I.12B.

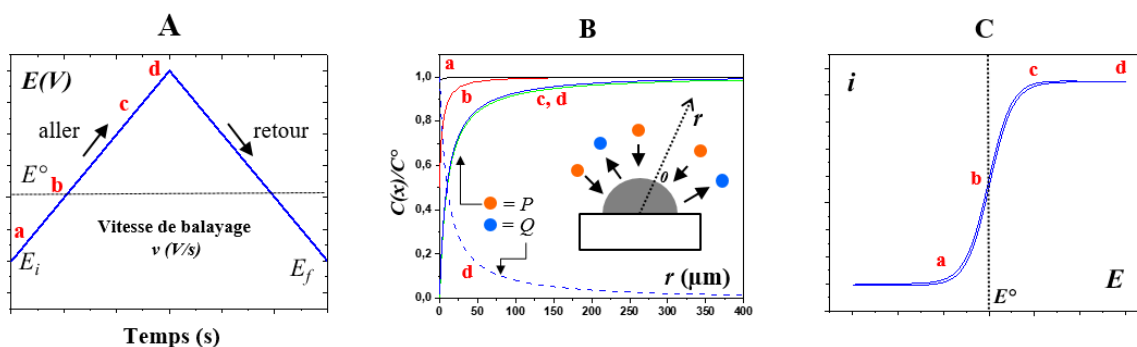


Figure I.12. Voltammétrie cyclique à une microélectrode hémisphérique, simulation. (A) Rampe de potentiel en CV. (B) Profils de concentration en espèce consommée à l'électrode, P , traits pleins, ou produite à l'électrode, Q , traits pointillés, déterminés aux potentiels indiqués par les repères a , b , c , d en (A). (C) Voltammogramme enregistré à l'UME (cas Nernstien ici) aux mêmes potentiels.

A partir de l'équation $\delta = \sqrt{DRT/Fv}$, donnée en Figure I.8B pour l'épaisseur d'une couche de diffusion plane, on voit que, pour une UME caractérisée par un rayon a , ce régime de diffusion sphérique, correspondant à $\delta \gg a$, sera atteint pour des vitesses de balayage suffisamment basses telles que $v \ll DRT/(Fa^2)$. Ce régime est donc valide sur

une plage de vitesse de balayage d'autant plus étendue que a est petit. Ainsi pour une électrode de 25 μm de diamètre le régime stationnaire sera observé pour $v \ll 0.1 \text{ V/s}$.

Il est intéressant d'examiner dans ce cas la forme des profils de concentrations de l'espèce consommée P , se développant autour d'une UME de forme hémisphérique, durant le balayage en potentiel de la CV (Figure I.12B). Comme pour la CV transitoire, les profils montrent un appauvrissement en P au voisinage de l'électrode, qui s'étend spatialement au fur et à mesure du balayage (repères a et b). Cependant on constate que, pour des valeurs de potentiels au-delà de E° (repères c et d en Figure I.12C), le profil de P cesse de dépendre du potentiel. Ce profil stationnaire, qui est *spécifique* aux UME, se caractérise par une région située proche de l'électrode, à une distance radiale, r , de l'ordre du rayon de l'UME ($\sim 10 \mu\text{m}$ ici), où la concentration en P augmente rapidement avec r . Au-delà, se situe une région bien plus étendue, allant jusqu'à 100 μm de distance, soit dix fois le rayon de l'UME, où le profil ne varie que lentement. Il en va de même pour le profil de l'espèce Q produite à l'électrode (courbe pointillée en Figure I.12B) qui, dans cette dernière région, ne tend vers zéro que très lentement. Il en résulte que persiste une concentration non négligeable d'espèce Q même assez loin de l'électrode.

On démontre que le courant, correspondant à la dérivée du profil des concentrations à l'électrode est alors *stationnaire*, c'est-à-dire ne dépend pas de v (ni du temps), et que le voltammogramme adopte une forme en S , comme représenté en Figure I.12C. Le plateau de courant observé à $E > E^\circ$ correspond au profil stationnaire observé en Figure I.12B. Dans le cas d'un transfert Nernstien, ce CV est centré sur E° (cf Figure I.12C). Dans le cas d'un transfert lent, ou d'une réaction chimique consommant l'espèce formée à l'électrode, le CV est décalé en potentiel, au-delà ou en-deçà du E° , respectivement. La valeur du potentiel de demi-vague ($E_{1/2}$, potentiel à mi-hauteur) du CV est alors reliée à la cinétique de la réaction étudiée.

Dans tous les cas (Nernstien ou plus complexe), le CV à une UME présente un plateau en courant dont l'intensité est la même, car limitée par la vitesse de la diffusion sphérique, et donné par l'expression :

$$i_{pl} = \psi n F D C_p^0 a \quad (\text{I.2})$$

où ψ est un terme sans dimension dépendant de la géométrie exacte de la microélectrode. Pour une demi sphère $\psi = 2\pi$, pour un disque $\psi = 4$. Cette dernière géométrie d'UME est

très courante car elle est simplement réalisée en sertissant un micro-fil dans un capillaire dont l'extrémité est ensuite polie.

Revenons maintenant à des considérations instrumentales. L'application de l'équation (I.2) conduit, pour une UME en forme de disque de 1-10 μm de rayon, et les valeurs habituelles de D et $C^{\circ}p$, à une intensité de courant de plateau de : $i_{pl} = 0.4$ à 4 nA. On voit donc que l'emploi de microélectrodes nécessite la mesure de petits courants, de l'ordre du nano-ampère pour des UME micrométriques.

Ces dernières années des techniques de fabrications sophistiquées ont vu le jour pour la fabrication d'UME encore plus petites, d'un rayon de quelques dizaines de nanomètres seulement [10]–[14]. Le courant généré par de telles « nanoélectrodes » est de l'ordre de quelques pA.

Ainsi, l'emploi des nanoélectrodes, outils de base de cette nouvelle branche de l'électrochimie qu'est la « nanoélectrochimie », rend indispensable de disposer, ou de développer, des instruments capables de mesurer des « petits » courants, entendons par là d'une intensité $< \text{nA}$. S'agissant de signaux stationnaires, en pratique enregistrés à basse vitesse de balayage ($v \sim 10 \text{ mV/s}$), on comprend que pour cet usage il n'y a pas de contrainte en bande passante.

Enfin, pour être complet, signalons que les microélectrodes ont été également largement utilisées en régime « transitoire », celui atteint pour des vitesses telles que $v \gg DRT/(Fa^2)$. Il s'agissait là d'étudier des réactions chimiques rapides, ce qui requière des vitesses de balayage élevées, tout en minimisant le courant traversant l'électrode. En effet l'intensité du courant en CV transitoire augmente très vite avec la vitesse de balayage, en v^2 , et des courants intenses se traduisent par une chute ohmique au sein de la solution, déformant les signaux. Le courant en CV transitoire étant proportionnel à la surface de l'électrode, on comprend que diminuer la taille de l'électrode permet de limiter très efficacement l'intensité du courant. Cela permet également de diminuer le temps de réponse de la cellule, $R_s C_d$, qui à haute vitesse pourrait autrement devenir comparable au temps caractéristique de la CV, $\tau_{cv} = RT/Fv$, et déformer les signaux d'une façon impossible à corriger. Les expériences les plus poussées dans ce domaine peuvent atteindre des vitesses de balayage de 1 MV/s, générant des courants dont l'intensité peut être limitée à quelques dizaines de μA seulement grâce à l'emploi d'UME. Ces expériences nécessitent une

instrumentation dédiée, non commercialement disponible, présentant une bande passante de l'ordre de 100 MHz ou plus [15]–[18].

8. L'électrochimie bipolaire

(a) *Electrochimie bipolaire « ouverte »*

Le montage potentiostatique à 3 électrodes, en permettant à l'expérimentateur de se focaliser sélectivement sur le processus d'intérêt ayant lieu à la seule électrode de travail, a également eu pour conséquence d'occulter que l'application d'une tension entre deux électrodes immergées dans une solution électrolytique fait apparaître un champ électrique en solution, issu du gradient de potentiel associé. La possibilité d'utiliser ce champ pour induire des réactions électrochimiques a été « redécouverte » par la communauté des électrochimistes moléculaires au début des années 2000, et a donné lieu au renouveau de l'électrochimie bipolaire [19], [20].

Dans une cellule d'électrochimie, on peut définir un potentiel en chaque point de la solution, dont la valeur dépend de la distance séparant ce point des électrodes. En électrochimie bipolaire on se place sciemment dans des conditions où la chute de potentiel a lieu majoritairement non pas au niveau de la double couche des électrodes, mais à l'intérieur de la solution. Cette distribution du potentiel peut être favorisée par l'emploi de faibles concentrations en électrolyte support, ou par la géométrie de la cellule [21]. On peut alors considérer, comme montré en Figure I.13, que le potentiel décroît linéairement depuis celui de l'anode, E_a , vers celui de la cathode, E_c . Le champ électrique généré en solution est alors approximé par $\mathcal{E} = (E_a - E_c)/d$, où d est la distance séparant les électrodes.

Lorsqu'un objet métallique est placé en solution, un pôle cathodique et un pôle anodique vont apparaître à ses extrémités. Pour un objet linéaire de longueur L , la différence de potentiel entre ses pôles est alors de :

$$\Delta E = \mathcal{E} L = (E_a - E_c) L/d \quad (\text{I.3})$$

Si la valeur de ΔE est suffisante des réactions électrochimiques peuvent avoir lieu simultanément à chaque pôle de l'objet, qui devient donc une *électrode bipolaire*. Une réaction d'oxydation a lieu au pôle anodique et une réaction de réduction au pôle cathodique (Figure I.13). Ces deux réactions sont couplées, l'une ne pouvant avoir lieu sans l'autre pour des raisons évidentes d'électroneutralité. Cette possibilité a été mise à profit dans la

littérature pour coupler des réactions électrochimiques d'intérêt traduisant par exemple la présence d'analytes, avec des réactions servant de « rapporteurs », c'est-à-dire dont l'occurrence est aisément détectée par un changement de couleur ou la production d'espèces fluorescentes [22]–[25]. Cette configuration, dite d'électrochimie bipolaire « ouverte », permettant d'appliquer un gradient de potentiel à un objet sans que celui-ci ne soit connecté directement à un circuit électronique, a également été utilisée pour provoquer l'électrodéposition asymétrique de métaux et de polymères aux pôles d'objets micrométriques [20].

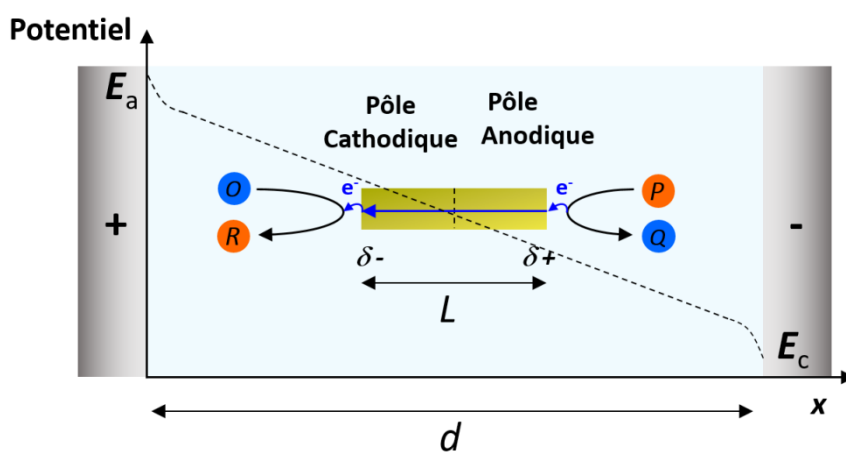


Figure I.13. Cellule d'électrochimie bipolaire « ouverte ». Une différence de potentiel ($E_a - E_c$) est appliquée aux bornes de la cellule, générant un gradient linéaire de potentiel en solution. Il en résulte la polarisation d'un objet métallique introduit en solution, qui joue alors le rôle d'électrode bipolaire, et permet le couplage de deux réactions redox opposées et simultanées à chacun de ses pôles.

Une particularité de la configuration bipolaire est que la mesure du courant traversant l'objet jouant le rôle d'électrode bipolaire n'est pas réellement possible. Seule la mesure du courant traversant les électrodes servant à appliquer le champ électrique est réalisable. Ce courant est la somme de deux composantes, l'une purement ionique est due à la migration des ions de l'électrolyte et est majoritaire, l'autre correspond au courant électronique parcourant l'objet et est minoritaire. Ainsi la mesure du courant ne permet-elle pas de renseigner sur les processus électrochimiques (faradiques) à l'œuvre.

De plus pour déclencher les réactions électrochimiques, la valeur de ΔE doit être suffisante, et on voit, d'après l'Equation (I.3) qu'il faut pour cela appliquer une différence de potentiel ($E_a - E_c$) d'autant plus grande que l'objet jouant le rôle d'électrode bipolaire est petit par rapport à la taille de la cellule électrochimique ($L/d \ll 1$). Aussi, en pratique le

potentiel appliqué entre les électrodes est de quelques dizaines de volts et donc sans rapport avec les potentiels thermodynamiques caractérisant les réactions électrochimiques.

Il existe cependant une configuration bipolaire au fonctionnement plus proche de celle d'un montage « classique » à 3 électrodes, la configuration bipolaire « fermée ».

(b) *Electrochimie bipolaire « fermée »*

Dans ce montage chacune des électrodes assurant l'application du potentiel est placée dans un compartiment distinct. Ceux-ci sont reliés par l'électrode bipolaire, Figure I.14.

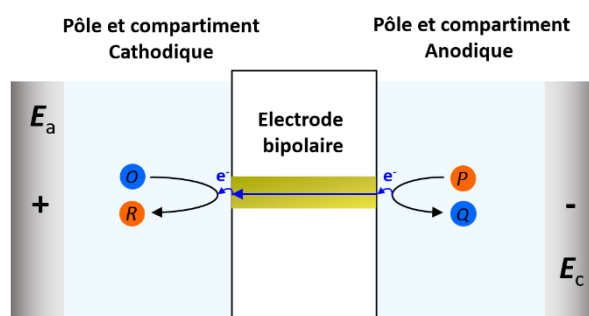


Figure I.14. Cellule d'électrochimie bipolaire « fermée ». Une électrode métallique, jouant le rôle d'électrode bipolaire, sépare la cellule en deux compartiments, contenant l'un l'espèce oxydable P et l'autre l'espèce réductible O . L'application d'un potentiel suffisant aux bornes de la cellule déclenche l'oxydation de P au pôle anodique de l'électrode bipolaire, et la réduction de O à son pôle cathodique, d'une façon couplée et simultanée. L'intégralité du courant traversant la cellule transite par l'électrode bipolaire.

Une différence de potentiel ($E_a - E_c$) est appliquée aux bornes de la cellule, générant un gradient linéaire de potentiel en solution. Il en résulte la polarisation de l'électrode bipolaire et le couplage de deux réactions redox opposées et simultanées à chacun de ses pôles. A la différence du montage dit « ouvert » le courant qui circule dans la cellule transite nécessairement par l'électrode bipolaire. Sa mesure permet donc d'acquérir des informations quant aux processus faradiques ayant lieu à ses pôles. Il en résulte également qu'un voltage bien plus faible, de l'ordre du Volt doit être appliqué aux bornes de la cellule pour déclencher les réactions électrochimiques couplées. Zhang et al. ont d'ailleurs donné une expression reliant le courant, i , traversant la cellule, au potentiel appliqué, E [26]:

$$E = (E_a - E_c) = (E_a^0 - E_c^0) + \frac{RT}{F} \left[\ln \left(\frac{i}{i_{ss}^a - i} \right) + \ln \left(\frac{-i}{i_{ss}^c + i} \right) \right]$$

Cette expression est valide dans le cas où les compartiments anodiques et cathodiques contiennent des espèces redox capables d'échanger réversiblement un électron avec l'électrode bipolaire et caractérisées par des potentiels $E^{\circ}a$ et $E^{\circ}c$ respectivement. i_{ss}^a et i_{ss}^c sont les courants limites pouvant être générés par ces espèces à chacun des deux pôles. En supposant que ces derniers aient la géométrie d'un disque, ces courants sont donnés par :

$$i_{ss}^a = 4FD_a C_a^0 a_a \qquad i_{ss}^c = 4FD_c C_c^0 a_c$$

avec $D_{a/c}$, $C_{a/c}^0$ les coefficients de diffusion et concentrations des espèces dans les compartiments anodique et cathodique, respectivement, et $a_{a/c}$ le rayon des pôles correspondants.

On voit donc que la configuration bipolaire « fermée » permet de coupler deux réactions électrochimiques d'une façon plus douce et mieux définie en théorie que la configuration « ouverte ». Cependant, comme le montrent les équations ci-dessus, la réponse de la cellule est liée de manière *conjointe* aux processus se déroulant *aux deux* pôles. Il n'est donc pas possible d'obtenir indépendamment des informations thermodynamiques ou cinétiques à propos des processus anodiques et cathodiques en jeu à l'un des deux pôles seulement.

Néanmoins l'électrochimie bipolaire « fermée », tout comme son équivalent « ouverte », a trouvé de nombreuses applications analytiques. Celles en lien direct avec le présent travail seront discutées au chapitre suivant de ce manuscrit.

9. Conclusions

A ce stade, le lecteur électronique devrait avoir acquis les bases essentielles en électrochimie moléculaire lui permettant d'appréhender les stratégies expérimentales que nous avons mises en œuvre dans ce travail.

Cependant, avant de présenter nos résultats, il semble nécessaire de présenter au lecteur les avancées récentes de l'électrochimie moléculaire qui nécessitent le développement d'une approche instrumentale nouvelle de la mesure des petits courants faradiques.

Références du chapitre

- [1] J. Bard, Allen and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, 2nd Editio. Wiley, 2001.
- [2] A. J. Bard and L. R. Faulkner, "Kinetics of electrode Reactions," in *Electrochemical Methods*, Second Edi., Hoboken: John Wiley & Sons, 2001, pp. 87–136.
- [3] A. J. Bard and C. G. Zoski, "Voltammetry retrospective," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 9, p. 346 A-352 A, May 2000.
- [4] J.-M. Savéant and C. Costentin, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry*, Second Edition. John Wiley & Sons, 2019.
- [5] M. I. Montenegro, M. A. Queiros, and Daschbach J.L., Eds., *Microelectrodes: Theory and Applications*. Kluwer Academic Publishers, 1990.
- [6] C. Amatore, "Electrochemistry at Ultramicroelectrodes," in *Physical Electrochemistry*, I. Rubinstein, Ed. New-York: Marcel Dekker, 1995, pp. 131–208.
- [7] J. Bard, Allen and L. R. Faulkner, "Basic potential step methods," in *Electrochemical methods. Fundamentals and Applications*, 2nd editio., John Wiley & Sons, 2001, pp. 156–225.
- [8] R. M. Wightman, "Microvoltammetric electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 53, no. 9, p. 1125A–1134A, Aug. 1981.
- [9] M. Fleischmann and S. Pons, "The behavior of microelectrodes," *Anal. Chem.*, vol. 59, no. 24, p. 1391A–1399A, Dec. 1987.
- [10] D. W. M. Arrigan, "Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications," *Analyst*, vol. 129, no. 12, pp. 1157–1165, 2004.
- [11] P. Sun and M. V. Mirkin, "Kinetics of electron-transfer reactions at nanoelectrodes," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 18, pp. 6526–6534, 2006.
- [12] Y.-L. Ying, Z. Ding, D. Zhan, and Y.-T. Long, "Advanced electroanalytical chemistry at nanoelectrodes," *Chem. Sci.*, vol. 8, no. 5, pp. 3338–3348, 2017.

- [13] R. W. Murray, "Nanoelectrochemistry: Metal Nanoparticles, Nanoelectrodes, and Nanopores," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 7, pp. 2688–2720, 2008.
- [14] Y. Takahashi *et al.*, "Multifunctional nanoprobe for nanoscale chemical imaging and localized chemical delivery at surfaces and interfaces," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 41, pp. 9638–9642, 2011.
- [15] G. Boitel-Aullen *et al.*, "Electron Transfer Inside a Decaferrocenylated Rotaxane Analyzed by Fast Scan Cyclic Voltammetry and Impedance Spectroscopy," *ChemElectroChem*, vol. 8, no. 18, pp. 3506–3511, Sep. 2021.
- [16] C. Amatore and E. Maisonhaute, "When voltammetry reaches nanoseconds," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 15, p. 303 A-311 A, Aug. 2005.
- [17] C. Amatore, Y. Bouret, E. Maisonhaute, J. I. Goldsmith, and H. D. Abruña, "Precise Adjustment of Nanometric-Scale Diffusion Layers within a Redox Dendrimer Molecule by Ultrafast Cyclic Voltammetry: An Electrochemical Nanometric Microtome," *Chem. – A Eur. J.*, vol. 7, no. 10, pp. 2206–2226, May 2001.
- [18] C. Amatore, E. Maisonhaute, and G. Simonneau, "Ohmic drop compensation in cyclic voltammetry at scan rates in the megavolt per second range: access to nanometric diffusion layers via transient electrochemistry," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 486, no. 2, pp. 141–155, 2000.
- [19] S. E. Fosdick, K. N. Knust, K. Scida, and R. M. Crooks, "Bipolar Electrochemistry," vol. 52, no. 40, pp. 10438–10456, Sep. 2013.
- [20] G. Loget, D. Zigah, L. Bouffier, N. Sojic, and A. Kuhn, "Bipolar Electrochemistry: From Materials Science to Motion and Beyond," *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, no. 11, pp. 2513–2523, Nov. 2013.
- [21] F. Mavré, K.-F. Chow, E. Sheridan, B.-Y. Chang, J. A. Crooks, and R. M. Crooks, "A Theoretical and Experimental Framework for Understanding Electrogenenerated Chemiluminescence (ECL) Emission at Bipolar Electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 15, pp. 6218–6225, Aug. 2009.
- [22] J. P. Guerrette, S. J. Percival, and B. Zhang, "Fluorescence coupling for direct imaging of electrocatalytic heterogeneity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 2, pp.

855–861, 2013.

- [23] L. Bouffier, T. Doneux, B. Goudeau, and A. Kuhn, “Imaging Redox Activity at Bipolar Electrodes by Indirect Fluorescence Modulation,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 8, pp. 3708–3711, 2014.
- [24] J. P. Guerrette, S. M. Oja, and B. Zhang, “Coupled electrochemical reactions at bipolar microelectrodes and nanoelectrodes,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 3, pp. 1609–1616, 2012.
- [25] T. Sun, D. Wang, and M. V Mirkin, “Tunneling Mode of Scanning Electrochemical Microscopy: Probing Electrochemical Processes at Single Nanoparticles,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 57, no. 25, pp. 7463–7467, Jun. 2018.
- [26] J. T. Cox, J. P. Guerrette, and B. Zhang, “Steady-State Voltammetry of a Microelectrode in a Closed Bipolar Cell,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 20, pp. 8797–8804, 2012.

Chapitre II

**La mesure de petits courants en nanoélectrochimie
d'entités uniques**

La mesure de petits courants en nanoélectrochimie d'entités uniques

1. Introduction

La nanoélectrochimie s'intéresse aux phénomènes associés au transfert d'électron ayant lieu à une échelle allant de 1 – 100 nm. A cette dimension, les propriétés de la matière peuvent différer de celles observées à plus large échelle, notamment en raison du nombre réduit d'atomes, molécules ou nano-objets, mis en jeu. En électrochimie « conventionnelle » l'observable, par exemple le courant, correspond à la réponse d'un grand nombre d'entités, et seul le comportement moyen de l'ensemble de la population est accessible. Cependant les propriétés des nano-objets peuvent varier de l'un à l'autre. Cette « individualité », prend tout son sens lorsqu'il s'agit de biomacromolécules, qui peuvent différer les unes des autres par de subtils changements de conformation, modulant leurs caractéristiques, notamment redox ou catalytique. Il en va de même pour les particules nanométriques « artificielles », par exemple les nanoparticules métalliques, qui présentent inévitablement une certaine dispersion de leurs propriétés physiques (taille, forme,...).

En permettant de sonder la réponse de molécules ou de nano-objets individuels, la nanoélectrochimie présente l'intérêt spécifique de permettre d'accéder à la dispersion statistique des propriétés de ces « nano-entités » au sein de leur population.

Atteindre l'échelle de l'entité unique revêt également une grande importance pratique puisque qu'il s'agit là de la sensibilité ultime en chimie analytique.

La détection de molécules uniques représente en particulier un formidable défi instrumental, relevé par les électrochimistes à partir du début des années 90. Il leur a fallu pour cela concevoir des dispositifs expérimentaux novateurs rendant mesurables les très faibles courants associés à des molécules individuelles.

Dans ce chapitre, nous passerons en revue des exemples de réalisation de détection de molécules ou de nano-objets uniques, spécifiquement sélectionnés pour les défis instrumentaux qu'ils posent, en terme de mesure de courants de faible intensité (<1 pA) et/ou de bande passante. Etablissant ainsi l'état de l'art en ce domaine, nous serons alors à même d'évaluer la possibilité, et la pertinence, d'accroître *encore* la sensibilité et la dynamique de la mesure de petits courants électrochimiques.

2. Le cyclage redox pour l'adressage électrochimique d'entités individuelles

Le cyclage redox est un puissant mécanisme d'amplification du courant faradique, mis à profit en électrochimie moléculaire pour la détection *de molécules individuelles*. Il constitue le principe de fonctionnement de la microscopie électrochimique, une technique à sonde locale qui a rendu possible l'électrochimie de molécules uniques. Il nous faut donc en premier lieu la décrire.

(a) *La microscopie électrochimique (SECM) : la mère des techniques à cyclage redox*

- *Principe de la SECM*

La microscopie électrochimique, ou Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) a été introduite en 1989 par l'équipe du Pr. Allen J. Bard de l'Université du Texas à Austin [1], [2], sur la base de travaux préliminaires publiés en 1986 par Royce C. Engstrom [3]. Schématiquement, elle repose sur l'interaction entre la couche de diffusion stationnaire se développant au voisinage d'une microélectrode, et une surface dont on souhaite sonder la réactivité électrochimique locale. Elle utilise comme sonde locale, ou « tip », une UME à laquelle une espèce redox P , dite « médiateur », est réduite ou, comme montré en Figure II.1, oxydée, en espèce Q .

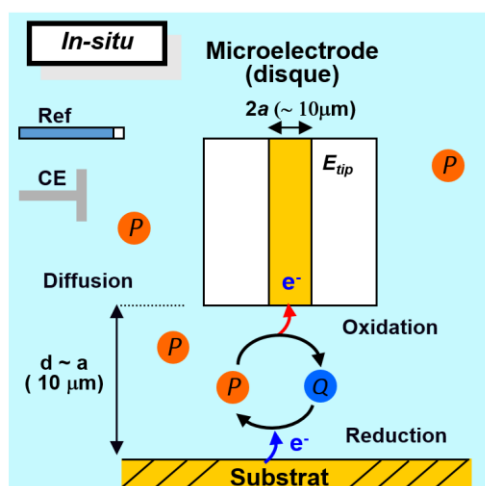


Figure II.1. Principe de la microscopie électrochimique (en mode positive feedback). Une UME (tip), de rayon a , est immergée dans une solution électrolytique contenant une espèce redox P (couple redox P/Q de potentiel standard E°), et approchée d'un substrat métallique. La tip et le substrat sont portés à des potentiels tels que (par exemple) : $E_{tip} > E^\circ$, $E_{sub} < E^\circ$. Lorsque $d \leq a$, s'établit le cyclage redox de l'espèce P/Q , qui est alternativement oxydée à la tip et réduite au substrat, comme montré ici.

Lorsque l'UME, de rayon a , est approchée à une distance $d \leq a$ du substrat à sonder, les molécules de Q peuvent en atteindre la surface par simple diffusion stationnaire. Si, comme en Figure II.1, le substrat est une électrode polarisée à un potentiel $E_{sub} < E^\circ$, Q est réduite en l'espèce P , qui retourne à l'UME pour être à nouveau oxydé. Ce phénomène de cyclage redox, ou de positive feedback SECM, se caractérise par deux étapes de transfert d'électron, une à l'UME et l'autre au substrat, séparées par une étape de diffusion dans l'espace UME-surface. Chacune de ces étapes peut participer au contrôle de l'intensité du courant généré à l'UME. Cependant, dans le cas général le potentiel de l'UME, E_{tip} est choisi tel que le transfert à l'électrode soit rapide ($E_{tip} \gg E_{P/Q}^\circ$ ici). Ainsi l'intensité du courant est-elle contrôlée conjointement par le temps de diffusion sonde-substrat (donné par d^2/D , où D est le coefficient de diffusion du médiateur), et la vitesse de transfert d'électron au substrat, c'est-à-dire sa réactivité électrochimique. Pour une distance sonde/substrat donnée, le courant reflète donc directement la réactivité *locale* du substrat. Suivant cette réactivité le courant pourra être plus ou moins intense par rapport au courant d'oxydation de P enregistré lorsque la tip est loin de la surface, i_{inf} . Schématiquement, à proximité d'une surface très réactive (ou à laquelle un potentiel suffisant est appliqué), le courant de tip augmente au-delà de i_{inf} lorsque la sonde est approchée du substrat, on parle alors de « positive feedback ». Au contraire le courant diminue à l'approche d'une surface non-réactive, car celle-ci écrante partiellement la diffusion de P vers l'UME, on qualifie ce cas de « negative feedback ». La forme exacte de la courbe d'approche i_{tip} vs d permet, sur la base d'abaques, de quantifier la réactivité de la surface, et de déterminer une valeur de k_s locale. En déplaçant latéralement la tip au-dessus de la surface on peut également établir une cartographie de la réactivité locale du substrat, sous la forme d'une image en courant.

Dans sa version « classique » la SECM emploie comme sonde des UME d'un rayon de l'ordre du micron [1]. Aussi, du point de vue instrumental, il s'agit de mesurer des courants SECM de l'ordre du nA, similaires en intensité à ceux rencontrés plus haut en voltammétrie aux UME. Le courant étant stationnaire la bande passante de la mesure n'est pas vraiment un enjeu. Ainsi les besoins en termes de mesure de « petits » courants de la SECM « classique » peuvent-ils être couverts par des potentiostats commerciaux.

- *La SECM pour la détection de molécules uniques*

Dans un registre bien plus pointu, F-R.F. Fan et A.J. Bard, en 1995, ont utilisé le phénomène de cyclage redox entre une tip SECM et une surface conductrice, comme moyen

d'amplification du courant permettant la détection d'une molécule individuelle [4]. Ces auteurs sont partis du constat qu'en SECM chaque molécule de médiateur génère un courant maximal, gouverné par le temps de diffusion à travers l'intervalle tip-substrat, de l'ordre de eD/d^2 (e est la charge élémentaire), qui peut en principe être rendu aussi intense que souhaité en diminuant suffisamment d . Ainsi, pour que la détection d'une molécule individuelle soit associée à un courant de l'ordre de 1 pA, qui correspondait à la limite de ce qui était détectable confortablement à l'époque, il fallait donc que $d \sim 10$ nm. Comme nous l'avons vu, pour que le cyclage redox soit efficace en SECM il faut que d soit du même ordre de grandeur que la taille caractéristique de la sonde, a . Une telle expérience ne pouvait donc être réalisée qu'à l'aide d'une UME nanométrique. Aussi les auteurs ont-ils fabriqué des nanoélectrodes « artisanales », constituées de microfils de platine affutés et isolés par de la cire fondue [1], et les ont utilisées pour réaliser la toute première expérience d'électrochimie de molécule unique (Figure II.2A). Pour cela, la nanoélectrode sonde a été approchée à ~ 10 nm d'un substrat conducteur, dans une solution contenant le médiateur redox triméthylamminométhyl ferrocène à 2mM, et le courant de tip mesuré en fonction du temps (Figure II.2B).

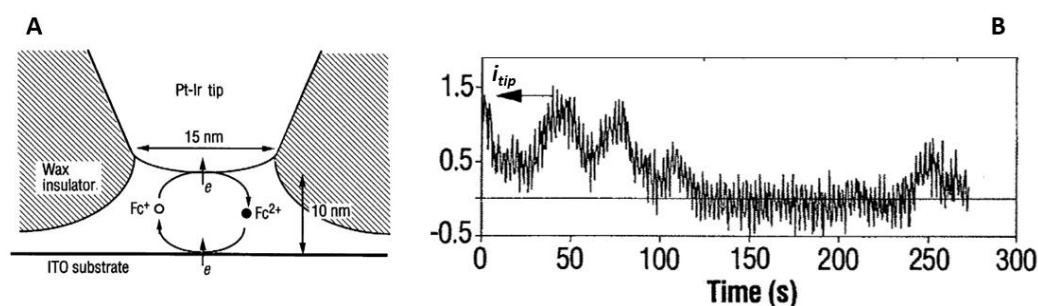


Figure II.2. Premier exemple d'électrochimie de molécule unique, décrit par Bard et al. en 1995. (A) Une nanoélectrode sonde (tip) partiellement isolée par une couche de cire, est approchée à ~ 10 nm d'un substrat conducteur, dans une solution contenant le médiateur redox triméthylamminométhyl ferrocène à 2mM. Le cyclage redox entre les formes réduites (○) et oxydées (●) du médiateur a lieu dans le « nanogap » sonde-surface, générant un courant de sonde i_{tip} qui est mesuré et suivi en fonction du temps. (B) Evolution du courant de sonde avec le temps. Des périodes où un courant d'environ 1pA est mesuré alternent avec des périodes où aucun courant n'est détecté, traduisant l'entrée de molécules individuelles dans l'espace sonde-surface, leur cyclage redox et leur sortie vers la solution. Adapté de F. R. F. Fan and A. J. Bard, *Science*, 267, 871–874, 1995.

L'évolution de i_{tip} avec le temps a montré l'apparition d'une série de pics larges, correspondant à la mesure d'un courant d'environ 1 pA durant une dizaine de secondes, alternant avec des périodes où aucun courant n'était mesuré (Figure II.2B). Ce comportement traduit l'entrée de molécules individuelles dans l'espace sonde-surface, leur

cyclage redox suivi de leur sortie vers la solution. Ce passage transitoire d'une molécule unique dans l'espace sonde-surface a pu être résolu en temps car la concentration en médiateur choisie était telle que le nombre moyen de molécule pouvant se trouver à un instant donné dans cet espace était proche de l'unité. L'étude de la dépendance de i_{tip} en fonction de E_{tip} , a confirmé que le courant mesuré était bien dû au cyclage redox de molécules individuelles du médiateur ferrocène présent transitoirement par l'espace sonde-surface.

Depuis ces expériences pionnières, l'usage du cyclage redox de molécules électroactives entre deux électrodes séparées de quelques dizaines de nanomètres s'est imposé comme le moyen par excellence pour l'adressage électrochimique de molécules uniques. Un enjeu a été de rendre intégrable cette configuration, dite à « nanogap », au sein de dispositifs analytiques « robustes ».

(b) Cellules à nanogaps microfabriquées pour la détection de molécules uniques.

L'équipe de Serge Lemay, de l'Université de Twente au Pays-bas, a exploré cette possibilité, en utilisant la microfabrication par lithographie électronique pour réaliser une cellule « à nanogap », constituée de deux microélectrodes d'or planes rectangulaires, d'une longueur de 50 à 100 μm sur quelques μm de large, se faisant face et séparées d'une distance de 40 à 70 nm (Figure II.3A) [5], [6].

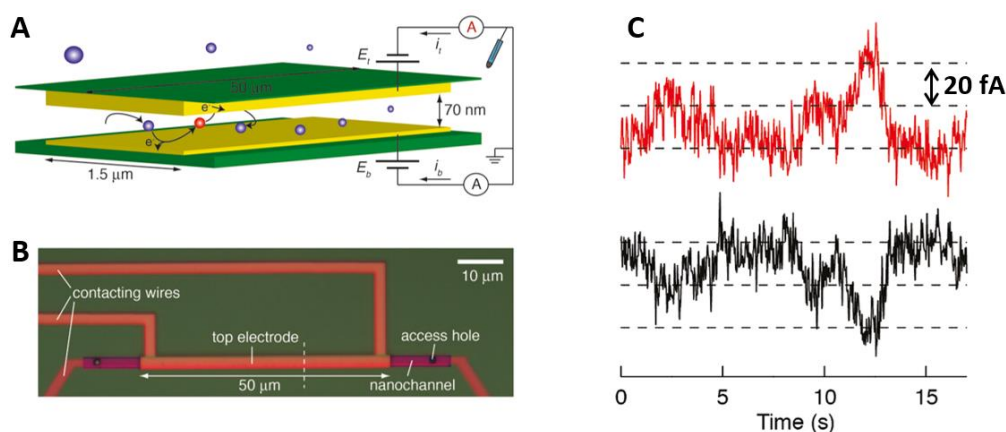


Figure II.3. (A) Schéma d'une cellule « à nanogap », constituée par 2 microélectrodes rectangulaires alignées, et du cyclage redox d'une espèce redox entre ces deux électrodes. (B) Vue en microscopie électronique en fausse couleur montrant le raccordement de la cellule au sein d'un dispositif de nanofluidique. (C) Variation des courants mesurés simultanément à chacune des microélectrodes, montrant l'occurrence de larges pics anti-corrélés d'une intensité d'environ 20 fA. Adapté de Lemay et al., *Nano Lett.*, 11, 7, 2881–2886, 2011.

Cette cellule à nanogap a été conçue pour être intégrée au sein d'un dispositif nanofluidique, permettant de faire circuler une solution électrolytique entre les 2 électrodes (Figure II.3B). Cette configuration a l'avantage de permettre la mesure indépendante du courant traversant l'une ou l'autre des microélectrodes constituant la cellule, chacune portée à un potentiel choisi par rapport à une électrode de référence.

En présence d'une espèce redox dans la solution électrolytique, et pour des potentiels appliqués aux électrodes suffisamment anodique pour l'une et cathodique pour l'autre, des pics de courants transitoires ont été mesurés à chacune des électrodes (Figure II.3C). Ces pics, d'une intensité allant de 5 à 20 fA (suivant les conditions expérimentales) durent quelques secondes et sont anti-corrélés d'une électrode à l'autre. Cela signifie que des pics de courants de forme semblable mais de signes opposés sont simultanément mesurés à chacune des microélectrodes (Figure II.3C). Ces signaux traduisent le cyclage redox de molécules individuelles entre les microélectrodes constituant le nanogap. Ils sont qualitativement similaires à ceux enregistrés par Bard et al. mais d'une intensité bien moindre, fA vs. pA. Ceci s'explique en partie par la distance entre les électrodes, qui est ici plusieurs fois plus grande que pour la configuration en nano-SECM des expériences de Bard et al. Cependant, le courant mesuré est aussi significativement moins intense que prédit par la simple équation de diffusion, eD/d^2 . Ce résultat a été attribué à l'adsorption réversible du médiateur sur les électrodes, qui « interrompt » transitoirement le cyclage redox.

Les travaux Lemay et al. ont constitué le premier exemple où des mesures en nanoélectrochimie nécessitent la mesure de courants réellement très peu intenses, de l'ordre du fA. Ces mesures ne sont typiquement pas réalisables avec les mesureurs de courants implémentés dans les potentiostats commerciaux, mais nécessitent des appareils de haute sensibilité. Ainsi Lemay et al. ont utilisé un multimètre Keithley 6430, ou un préamplificateur FEMTO DDPCA-300, suivant les cas. Ces appareils reposent sur un montage transimpédance à contre-réaction résistive, discuté en détail plus loin dans ce manuscrit, qui permet certes d'atteindre une haute sensibilité de mesure, mais *au détriment de la bande passante*. Ainsi les deux appareils mentionnés ci-dessus sont caractérisés par des temps de montée très lents, de 0.1 et 0.25 s respectivement. Il s'agit là de paramètres expérimentaux importants : Lemay et al. ont montré, sur la base de simulations de marche aléatoire reproduisant l'entrée, le cyclage redox et la sortie de molécules uniques dans le nanogap, que les tracés courant-temps expérimentaux étaient fortement affectés par la lenteur de la réponse du mesureur de courant. Les larges pics en courant observés

expérimentalement traduisent en réalité la convolution entre des massifs de pics de très courte durée, prédits par les simulations, et le temps de réponse du mesureur.

Ces résultats illustrent le besoin en nanoélectrochimie de nouveaux schémas de mesure de petits courants offrant une meilleure bande passante que l'existant. Un gain en sensibilité, permettant une mesure moins bruitée des courants de quelques fA (tels ceux présentés en Figure II.3C) est également souhaitable. L'amélioration simultanée de la bande passante et de la sensibilité de la mesure paraît néanmoins contradictoire, ces deux paramètres étant intrinsèquement inversement liés, comme discuté en détail plus loin dans ce chapitre. Néanmoins l'amélioration de l'une *ou* de l'autre de ces caractéristiques serait bénéfique pour la nanoélectrochimie.

(c) Cyclage redox de molécules uniques en microscopie SECCM

L'équipe de Patrick Unwin, de l'Université de Warwick en Angleterre, a réalisé la détection de molécules individuelles en utilisant une technique électrochimique qu'elle a mise au point et qui est dérivée de la SECM, la SECCM (Scanning Electrochemical Cell Microscopy) [7]. Cette microscopie repose sur l'établissement d'un ménisque microscopique entre une nanopipette remplie d'une solution électrolytique et un substrat à sonder.

Dans le cas qui nous intéresse, la nanopipette comportait quatre canaux : deux remplis de l'électrolyte contenant une faible concentration d'un médiateur redox, et deux convertis en microélectrodes de carbone (par pyrolyse de méthane) [8]. Ces deux UME étaient interconnectées et se comportaient comme une seule et même « tip » SECM, (Figure II.4A). L'approche contrôlée de la nanopipette-tip du substrat a permis la formation et le maintien d'un ménisque de quelques dizaines de nanomètre de hauteur (~20 nm en Figure II.4).

La mesure du courant de tip, et simultanément du courant de substrat, en fonction du temps a révélé l'apparition de pics larges et anti-corrélés, typiques de la détection électrochimique de molécules uniques par cyclage redox (Figure II.4B). L'intensité de ces pics étaient très faible, allant de ~10 fA à quelques fA seulement, en fonction de la viscosité de l'électrolyte (milieu aqueux ou liquide ionique, respectivement). La mesure de courants aussi faibles a été grandement facilitée par la configuration SECCM, qui limite la partie du substrat en contact avec l'électrolyte solution à la taille du ménisque et résulte en un bruit de fond particulièrement bas (~1fA).

Comme observé par Lemay et al., le courant de pic mesuré est moins intense que prédit par la simple diffusion du médiateur dans l'espace sonde-substrat qui, en milieu aqueux

aurait dû se traduire ici par une intensité de 150 fA. Cette différence a été en partie attribuée à l'absorption du médiateur sur le substrat, mais aussi au « filtrage » en fréquence des pics par le mesureur de courant, dont le temps de réponse (100 ms) excédait sans doute largement la durée des évènements de cyclage redox.

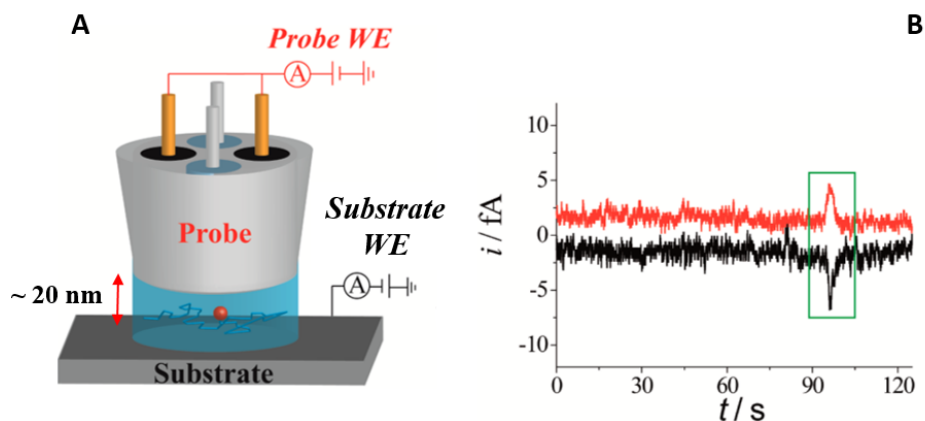


Figure II.4. (A) Schéma de la cellule « à nanogap » SECCM, formée par un ménisque de solution électrolytique joignant l'extrémité d'une nanopipette à un substrat conducteur. La nanopipette comporte 4 canaux, 2 remplis de l'électrolyte contenant une faible concentration d'une espèce redox, et 2 convertis en une double microélectrode de carbone. (B) Evolution temporelle simultanée du courant mesuré à la microélectrode (en rouge) et au substrat (en noir). Un évènement de cyclage redox, donnant lieu à des courants anti-corrélés est encadré en vert. Adapté de Unwin et al. *Anal. Chem.*, 87, 10450–10456, 2015.

Il est à noter que le mesureur de courant haute performance utilisé pour ces expériences était un appareil « fait maison », très sophistiqué, constitué de deux têtes de mesure reposant sur un montage transimpédance à contre-réaction résistive (précision de $\pm 10\%$) connectées chacune à une unité de contrôle de gain automatique de 1 fA/V à 1 pA/V. Un filtre passe-bas de premier ordre de fréquence variable a été incorporé à chaque unité de contrôle pour filtrer les hautes fréquences. Deux autres filtres passe-bas « brick wall » de huitième et seizième ordre optimisés pour les réponses transitoires et la cohérence de phase ont été connectés en cascade pour un meilleur contrôle du bruit. Les constantes temporelles des deux filtres sont de 50 ms et 100 ms.

Comme précédemment, disposer d'une nouvelle approche permettant la mesure de courants de l'ordre du fA avec une bande passante plus large que ne le permet le montage transimpédance aurait été souhaitable, cela aurait permis de mieux résoudre les pics ainsi que d'obtenir une sensibilité de détection accrue.

Ces travaux, comme ceux de Lemay, sont néanmoins remarquables du point de vue instrumental car ils font partie des rares exemples de mesure de courants électrochimiques

ultra-faibles, de l'ordre du fA. Ils représentent l'état de l'art en ce domaine. D'autres en sont assez voisins de par leur performance : ceux de l'équipe Bionano du LEM, réprésentés ci-dessous.

(d) *Imagerie de nanoparticules fonctionnelles individuelles en microscopie Mt/AFM-SECM*

L'équipe Bionano du LEM a mis au point une technique de microscopie électrochimique originale reposant sur l'emploi d'un médiateur redox, un ferrocène, qui ne soit plus libre de diffuser en solution, mais attaché au substrat, ou à un objet d'intérêt qui y est déposé, via une chaîne linéaire flexible nanométrique (typiquement une chaîne polyéthylène glycol), Figure II.5 [9]–[11].

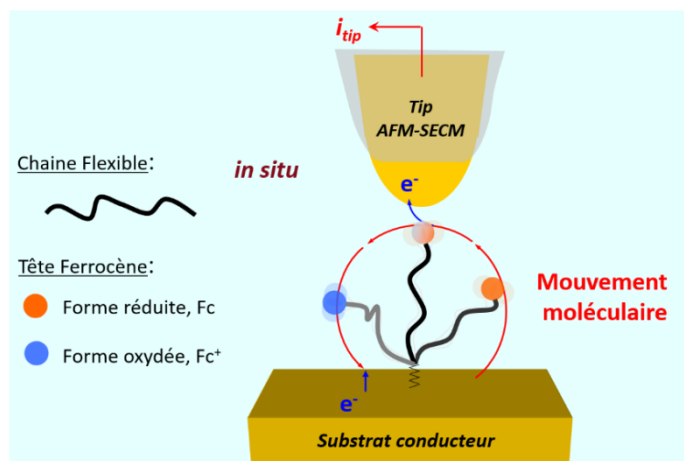


Figure II.5. Cyclage redox en microscopie AFM-SECM à médiateur lié (Mt/AFM-SECM). Le médiateur (un ferrocène, Fc) est attaché au substrat, ou à un objet d'intérêt qui y est déposé, via une chaîne linéaire flexible nanométrique (typiquement polyéthylène glycol). La tip, à laquelle un potentiel anodique est appliqué, vient *au contact* des chaînes Fc-PEG et oxyde les têtes ferrocène. Leur forme oxydée (Fc^+) ainsi formée est amenée par le mouvement brownien de la chaîne vers le substrat conducteur, ou elle est réduite.

Cette configuration, confinant indéfiniment le médiateur à proximité du point d'ancrage, a été initialement conçue pour permettre de sonder l'activité d'enzymes immobilisées sur une surface, avec une résolution nanométrique. En effet, un médiateur libre en solution ne peut pas être utilisé dans ce cas, car à cette échelle, il serait trop rapidement dispersé par diffusion pour pouvoir interagir avec le nombre réduit de molécules enzymes impliquées [12]–[16]. Cette nouvelle microscopie, dite à médiateur lié (mediator tethered, Mt), a nécessité la mise au point de tips qui soient également des sondes de microscopie à force atomique (AFM), sensibles aux interactions locales sonde-surface. Ces sondes combinées

AFM-SECM permettent un positionnement de la tip par rapport à la surface contrôlable à l'échelle du nanomètre.

Le courant généré en Mt/AFM-SECM est dû au phénomène de cyclage redox de la tête ferrocène de la chaîne ancrée. Il s'agit du processus de « positive feedback », typique de la SECM [1], mais qui traduit cette fois les mouvements moléculaires de la chaîne PEG, qui amène le médiateur alternativement en contact avec le substrat et la tip, Figure II.5.

L'intensité du courant est contrôlée par la dynamique moléculaire de la chaîne flexible, le médiateur est ainsi animé d'un mouvement de « diffusion élastique ». Le nombre de chaînes Fc-PEG contactées par la sonde module également le courant. Ce nombre dépend de la couverture locale de la surface en chaîne Fc-PEG attachées, mais aussi de la taille physique de la sonde. Au début des travaux de l'équipe, des sondes d'un diamètre relativement élevé, de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, ont été utilisées pour caractériser le phénomène de diffusion élastique lui-même, à l'aide de substrats portant des couches saturées de chaînes Fc-PEG. Quelques centaines de chaînes étaient contactées simultanément par la tip et les courants résultants étaient alors de l'ordre du pA.

Pour ces mesures, un bipotentiostat, comprenant un mesureur de courant à montage transimpédance à contre-réaction résistive a été développé par l'électronicien alors en poste au laboratoire, Mr Michel Druet. Cet appareil était alors doté d'une résistance de mesure de 10 G Ω , permettant aisément la mesure de courants de cet ordre.

Cependant, rapidement, il s'est agi *d'interroger* des objets nanométriques, de taille plus réduite que la sonde elle-même, et portant un faible nombre de chaînes Fc-PEG. L'intensité des courants de cyclage redox à mesurer en Mt/AFM-SECM a donc progressivement diminué, au fur et à mesure que l'équipe s'intéressait à l'imagerie de systèmes de plus en plus petits et complexes. De plus, afin de localiser ces nanoobjets sur une surface, un mode imagerie de la microscopie Mt/AFM-SECM a dû être développé. Celui-ci reprend le mode « tapping » de l'AFM, pour lequel la sonde est oscillée verticalement de quelques nanomètres à une fréquence de quelques kHz (la fréquence propre de nos sondes AFM-SECM faites maison). L'amortissement de cette oscillation, qui dépend de l'interaction de la tip avec la surface, est utilisé comme signal de consigne pour maintenir la distance sonde-substrat constante. Soulignons que l'amplitude d'oscillation est suffisamment faible pour ne pas affecter le courant électrochimique. La topographie physique de la surface et sa réactivité électrochimique locale, telle que reflétée par le courant de tip, peuvent donc être acquises indépendamment, mais simultanément, et présentées sous forme d'images

corrélées. Une des première applications de l'imagerie Mt/AFM-SECM a été l'étude de nanoparticules d'or d'un diamètre de 20 nm décorées par des chaînes Fc-PEG et immobilisées sur un substrat d'or passivé (Figure II.6A) [17].

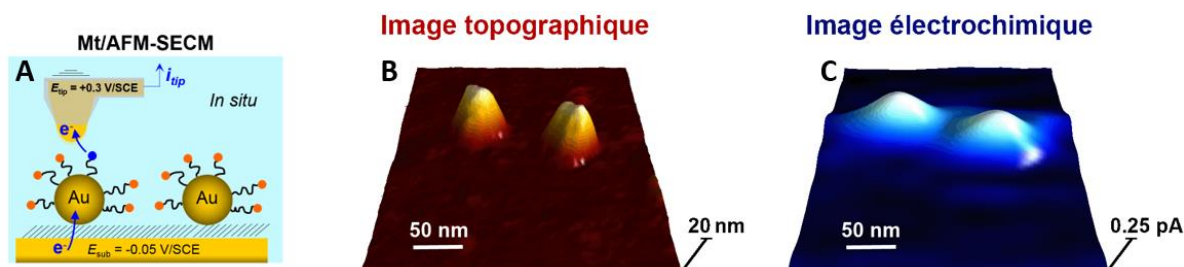


Figure II.6. (A) Principe de l'imagerie Mt/AFM-SECM de nanoparticules d'or portant des chaînes Fc-PEG. Images simultanées en topographie, (B), et en courant de tip, (C) de deux particules d'or Fc-PEGylées individuelles. Adapté de Huang et al., *ACS Nano*, 7, 4151–4163, 2013.

L'acquisition simultanée d'images en topographie et en courant (Figure II.6B, C) a rendu possible la mesure de deux propriétés distinctes d'une série de nanoparticules individuelles : (i) leur taille, à partir de leur hauteur topographique, (ii) leur couverture en chaînes Fc-PEG à partir de l'intensité du courant de sonde qu'elles génèrent. La distribution statistique de chacun de ces paramètres, mais aussi leur corrélation, a ainsi pu être étudiée pour la première fois. Rappelons qu'accéder à ces distributions est hors de portée des techniques d'ensembles généralement utilisées pour caractériser les nanoparticules fonctionnalisées.

Désirant s'intéresser à des systèmes nanométriques *biologiques*, l'équipe a ensuite entrepris l'imagerie de particules virales fonctionnalisées. Des particules du virus en bâtonnet de la mosaïque de la laitue (LMV), déposées sur une surface d'or, ont été décorées par des anticorps redox portant des chaînes Fc-PEG. En utilisant des anticorps spécifiques de certaines protéines du virus, les anticorps-redox ont pu être placés sélectivement sur le corps ou uniquement à l'extrémité de la particule (Figure II.7 et II.8, respectivement). Dans le premier cas, l'image en courant a révélé un ensemble de « taches » (spots) d'une dizaine de fA situés tout le long du corps des virus, et correspondant à la localisation de groupes d'anticorps redox (Figure II.7) [18]. Il a été ainsi possible, pour la première fois, de « visualiser » la répartition spatiale de fonctions redox sur « le corps » d'une nanoparticule virale.

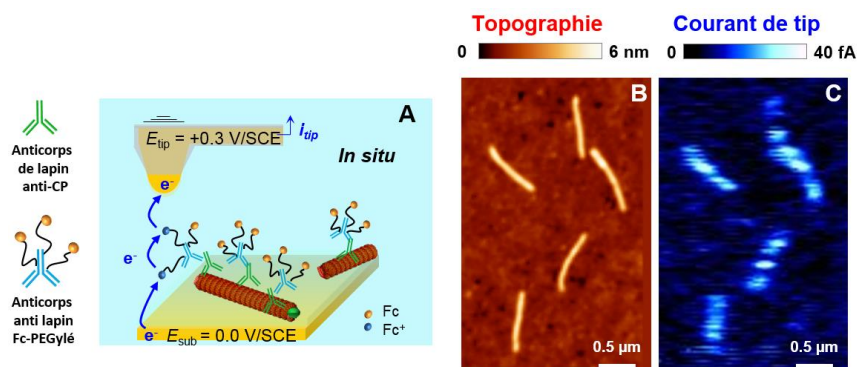


Figure II.7 (A) Principe de l'imagerie Mt/AFM-SECm de particules virales. Le virus LMV est décoré par des anticorps de lapin, dirigés contre sa protéine d'enveloppe (CP), et reconnus par des anticorps anti-lapin Fc-PEGylés. Images simultanées, en topographie, (B), et en courant de tip, (C), de 5 particules virales ainsi dotées de fonctions redox. Adapté de Nault et al., *ACS Nano*, 9, 4911–4924, 2015.

Dans le second cas, le complexe protéique VPg/eIF4E, présent en une seule copie à une seule des extrémités du LMV, a été spécifiquement marquée par des anticorps redox et révélé en imagerie AFM-SECm, par l'observation d'une tache en courant uniquement visible en bout de virus (Figure II.8) [19]. Une telle détection électrochimique d'une protéine virale individuelle a constitué une première. On peut voir sur la coupe de l'image en courant présentée en Figure II.8B que l'intensité de la tache associée à la protéine recherchée était d'environ 10 fA. Cette faible intensité est due au nombre limité d'anticorps redox pouvant se lier à la protéine, qui dépasse peu de l'extrémité du virus.

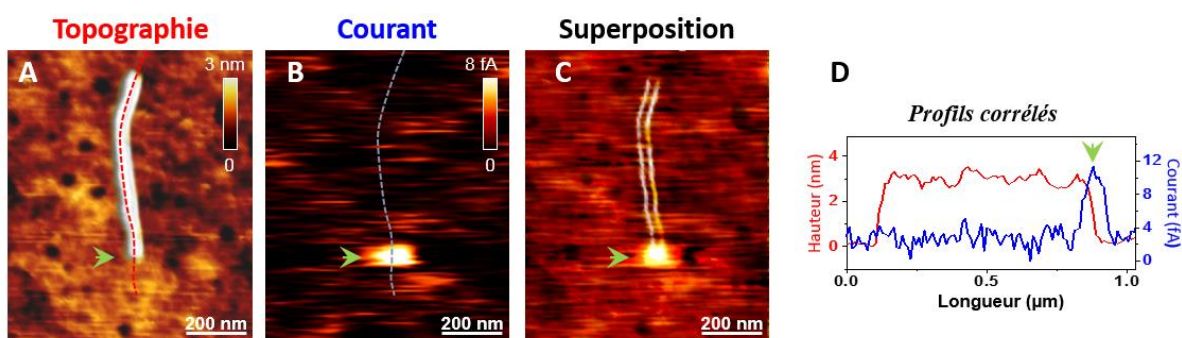


Figure II.8. Imagerie Mt/AFM-SECm d'une particule individuelle du virus LMV décorée à son extrémité par un anticorps redox dirigé contre le complexe protéique VPg/eIF4E, présent en une seule copie à l'extrémité du virus. (A) Image en topographie, (B) en courant de tip, acquises simultanément. (C) Superposition des images en topographie et en courant. (D) Coupes des images, prises suivant les pointillées visibles en (A) et (B). Adapté de G. Tavert-Roudet et al., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 30, 9, 2017.

Enfin, poussant encore plus loin le défi de sonder l'activité électrochimique de bio-nano objets, l'équipe a récemment entrepris de mesurer le fonctionnement *catalytique* de quelques

dizaines de molécules de l'enzyme redox quinoprotéine glucose déshydrogénase (PQQ-GDH) positionnées à l'extrémité du virus en bâtonnet de la mosaïque du tabac (Tobacco Mosaic Virus, TMV) [20]. Pour ce faire, un complexe immunologique comprenant l'enzyme PQQ-GDH et des chaînes Fc-PEG a été assemblé sur le segment terminal, de 40 nm de long, d'une particule de TMV modifiée, Figure II.9A.

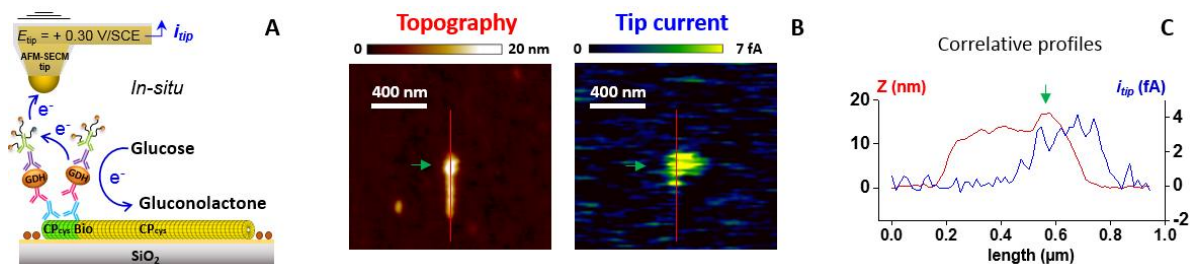


Figure II.9. Imager l'activité enzymatique à l'échelle du nanomètre par Mt/AFM-SECM. Un complexe immunologique comprenant l'enzyme redox PQQ-GDH et des chaînes Fc-PEG est formé à l'extrémité d'une particule de virus TMV. (B) L'image topographique confirme la présence de l'immunocomplexe. L'image en courant traduit le fonctionnement enzymatique de la dizaine de molécules d'enzyme de l'immunocomplexe, suivant le schéma représenté en (A). (C) Coupes des images, prises suivant le trait rouge visibles en (A) et (B). Adapté de Paiva et al., *Nanoscale*. 2022

L'image topographique a permis de visualiser l'immunocomplexe catalytique en bout de particule. L'image en courant à quant à elle montrée une tache unique, corrélée avec la position de l'immunocomplexe (Figure II.9B). Le courant de pointe ainsi détecté traduit le cyclage redox des têtes ferrocène entre la pointe et, *le site actif de l'enzyme*. Celui-ci oxyde le glucose ajouté en solution et transfère les électrons ainsi libérés aux têtes ferrocène oxydées (Fc^+), qui les véhiculent vers la pointe. L'intensité du courant, d'environ 4 fA (Figure II.9C), correspond au fonctionnement simultané de moins d'une dizaine de molécules d'enzyme.

Du point de vue instrumental, la mesure d'un courant électrochimique d'aussi faible intensité, réalisée *in situ*, et *en mode imagerie*, a constitué un tour de force sans précédent. Cette mesure a notamment nécessité d'accroître la sensibilité de notre mesureur de courant, via l'utilisation d'une résistance de mesure de 100 G Ω . Cette modification a eu pour effet de limiter la bande passante de notre appareil à environ 3 Hz, en considérant une capacité résiduelle minimale proche du pF. Cette faible bande passante a l'avantage d'assurer un filtrage du bruit au niveau du fA, mais une fréquence de coupure aussi basse devient hélas difficilement conciliable avec l'imagerie Mt/AFM-SECM. En effet, en mode imagerie, la sonde est balayée le long du substrat et il est nécessaire que celle-ci passe « suffisamment » de temps en interaction avec l'objet d'intérêt pour que l'intensité du courant qu'il génère

soit mesurée sans être atténuée. A défaut, outre une intensité sous-évaluée, l'objet apparaît sur l'image en courant comme une tache allongée dans le sens du balayage de la sonde. L'information quant à la localisation exacte de la source du courant peut alors être perdue. En pratique, pour imager de petits objets, il nous est souvent nécessaire de ralentir la vitesse de balayage de la sonde pour minimiser cette déformation, jusqu'à atteindre des vitesses de balayage aussi basse que 0.2-0.4 ligne/s. Une image étant typiquement constituée de 128 à 256 lignes, parcourues deux fois (aller/retour), ces vitesses lentes rendent l'acquisition d'une image complète très longue (~ 20 minutes). De plus, en imagerie AFM, les objets à imager sont plus aisément abimés par la pointe lorsque la vitesse de balayage est lente, car le temps de contact tip-objet est accru. En pratique, pour une bonne imagerie des virus, ou autre biosurfaces, il n'est pas acceptable de diminuer la vitesse de balayage en deçà de 0.2 ligne/s.

On voit donc que pour nos mesures il serait en premier lieu souhaitable d'accroître, ne serait-ce que d'un facteur x2 ou x3, la bande passante de notre mesureur de courant, avant même de songer à en accroître la sensibilité. Si une meilleure sensibilité devenait nécessaire, il ne sera pas possible de l'atteindre en augmentant encore la résistance de mesure, car cela rendrait la bande passante du mesureur trop faible pour l'imagerie AFM. Nous avons donc atteint les limites du montage transimpédance à contre-réaction résistive en terme de compromis sensibilité/bande passante pour l'imagerie Mt/AFM-SECM. Dans les faits c'est ce besoin qui a poussé l'équipe à proposer le présent sujet de thèse.

(e) Conclusion

Les travaux présentés ci-dessus sont les seuls à notre connaissance rapportant la mesure effective de courant faradiques d'aussi faible intensité, c'est à dire de l'ordre de 1-10 fA. Ils illustrent la limite technologique actuelle en sensibilité pour la mesure de petits courants électrochimiques.

On peut incidemment remarquer que l'équipe Bionano du LEM compte parmi les trois seules équipes au monde réalisant des mesures de courant électrochimique à l'échelle du fA.

3. L'électrochimie de nano-impacts pour la détection d'entités uniques

Inspirée de travaux pionniers de l'équipe de Serge Lemay [21], l'équipe de Bard et al., a, au début des années 2000 [22], mis au point une nouvelle approche de la détection de nano-objets en électrochimie, appelée électrochimie de nano-impacts, électrochimie stochastique ou encore électrochimie de collision. Cette technique repose sur la modulation du courant

enregistré à une UME due à la collision, et à l'adsorption, de nanoparticules sur sa surface. Le succès de cette méthode repose sur le fait que la présence d'objets nanométriques sur la surface d'une UME pourtant bien plus grande (micrométrique) peut néanmoins être détecté à condition qu'un mécanisme de transduction approprié soit utilisé. Le mécanisme de transduction employé est intimement lié aux propriétés du nano-objet à détecter. Passons en revue les différents cas de figure, les signaux en courant correspondants et les limites instrumentales pour leur mesure, Tableau II.1 [23].

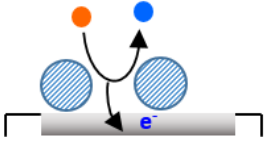
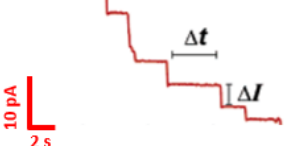
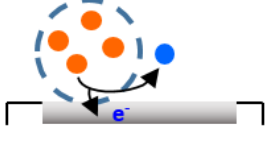
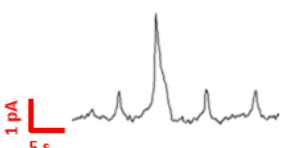
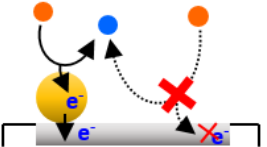
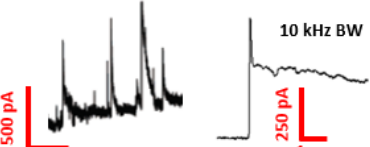
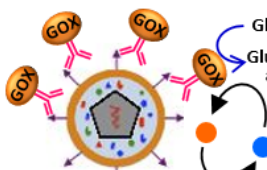
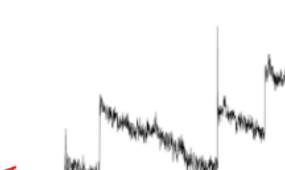
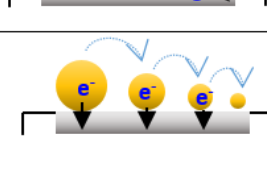
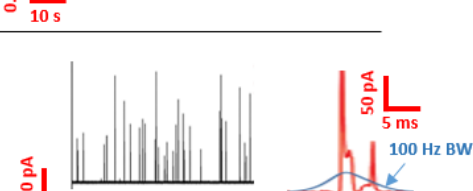
Nano-objects Méthode de détection	Configuration	Signaux typiques
Nanoparticules isolantes (billes, protéines) Bloquage de la surface		
Emulsion, Nanogoute, Micelles Libération d'un médiateur redox		
Nanoparticules catalytiques (Pt, Au, ..) Amplification Electro-catalytique		
Particules virales Amplification Bio-Electrocatalytique		
Nanoparticules oxydables (Ag, Cu, ..) Electro dissolution		

Tableau II.1. Stratégies de détection de nano-impacts en électrochimie. Adapté de Goines et Dick, *J. Electrochem.Soc.*, 167, 037505, 2020

(a) *Electrochimie de nano-impacts et limitations instrumentales*

- Dans leurs travaux fondateurs Lemay et al. [21], ont montré que le courant enregistré à une UME de 5 μm de diamètre, utilisée pour oxyder l'espèce redox ferrocène méthanol,

était modulé de façon quantitative par l'adsorption stochastique de billes de latex de 0.3-1 μm de diamètre introduites en solution. La présence d'une bille en surface de l'UME bloquant une partie de sa surface, les évènements individuels d'adsorption se traduisaient *par une baisse* du courant d'oxydation suivant une série de marches de hauteur $\Delta I = 3\text{pA}$ (1ère ligne, Tableau II.1). Plus récemment Dick et al. ont utilisé ce schéma de détection pour mettre en évidence des évènements individuels d'adsorption de macromolécules biologiques sur UME. Afin de rendre mesurable le blocage de l'UME par des objets aussi petits que des biomacromolécules, d'une taille de l'ordre de 10 nm, des d'UME de faible diamètre, $\sim 200\text{ nm}$, ont dû être employées. Il a également été nécessaire d'utiliser une forte concentration en espèce redox afin de rendre le courant faradique suffisamment intense pour que sa modulation soit quantifiable. En définitive des séries de marches d'une intensité de 5 pA, traduisant l'adsorption de macromolécules uniques, ont été mesurées. La forme en série de marches de ces signaux, et leur intensité, les rendent aisément résolubles avec un potentiostat commercial.

- A l'opposé du « blocage », la libération d'une espèce redox par une nanoparticule s'adsorbant sur l'électrode a été utilisée pour détecter des nanogouttes, des vésicules ou des micelles (ligne 2, Tableau II.1) [24]–[28]. L'espèce redox remplissant ces nanoparticules/nano-conteneurs est choisie pour être insoluble en solution, restant ainsi confinée ou sein de la particule d'intérêt. Lors de la collision, la particule fusionne partiellement avec l'UME, permettant la détection électrochimique de son contenu. Le courant généré au contact est de l'ordre de quelques pA à quelques dizaines de pA, il décline ensuite en quelques secondes en raison de l'électrolyse (la consommation) exhaustive de la faible quantité de médiateur contenu dans la nanoparticule. Il est possible de quantifier cette quantité par intégration des pics et d'en déduire la taille de la nanoparticule. Résoudre de tels pics, tant en intensité que temporellement est à la portée de l'instrumentation commerciale.

- Bard et al., ont introduit l'amplification électro-catalytique comme mécanisme permettant la détection de collisions de nanoparticules uniques avec des UME [22]. Dans ce schéma, présenté en troisième ligne du Tableau II.2, les nanoparticules catalysent une réaction redox, rapide à leur surface, mais intrinsèquement lente (voir totalement inhibée) à celle de l'UME. Cette différence de réactivité électrochimique provient de la nature distincte des matériaux constituant les nanoparticules, souvent métalliques (Au, Pt,..) et l'UME, souvent en carbone. En l'absence de nanoparticules, seul un courant de fond faible (ou

inexistant) est mesuré. Lorsqu'une nanoparticule s'adsorbe, celle-ci joue le rôle de nano-électrode sphérique à laquelle la réaction électro-catalytique a lieu, se traduisant par la génération d'un courant stationnaire contrôlé par la diffusion, si la réaction est assez rapide. La collision stochastique de particules catalytiques résulte donc, en principe, en une série de marches dont la hauteur est proportionnelle à taille de la nanoparticule et à la concentration de l'espèce redox. En réalité, du fait de la désorption de la particule ou de son inactivation, ce sont plus souvent des séries de pics plus ou moins larges qui sont mesurés. Des nanoparticules nanométriques peuvent générer des courants de l'ordre de quelques dizaines de pA ou plus, mesurables sans grandes difficultés instrumentales. Cependant, Zhang et al. ont démontré que seul l'emploi de mesureurs de courants à bande passante élevée (10 kHz) permettait, au-delà de la simple « observation » des pics catalytiques, d'en résoudre la *structure fine* [29]. Ils ont ainsi révélé que les pics de collision de nanoparticules de Pt catalysant la réduction des protons se composaient en réalité de deux phases distinctes : un pic initial très étroit, d'une durée estimée à moins de 100 μ s, suivi d'un plateau décroissant lentement, à l'échelle de la dizaine de ms. Ces auteurs ont postulé que le pic « rapide » correspondait à la réduction des protons initialement adsorbés en surface de la particule, alors que le second reflétait le processus de diffusion des protons vers la nanoparticule. Ces travaux illustrent le rôle déterminant de la bande passante du mesureur de courant pour extraire des informations mécanistiques relatives aux réactions catalysées par des nanoparticules. Ils montrent aussi que la mise au point d'un appareillage présentant une bande passante *supérieure* à 10 kHz est indispensable pour étudier la dynamique de la réduction des protons *adsorbés*, d'une durée trop courte pour être résolue en temps avec l'instrumentation existante.

- Le schéma d'amplification catalytique a également été utilisé pour la détection de particules virales décorées par des enzymes redox (quatrième ligne du Tableau II.1) [30]. Dans ce cas, les molécules d'enzymes portées par les virus catalysent la conversion d'un médiateur redox présent en solution en sa forme détectable à l'UME. Le grand nombre de molécules d'enzymes (plusieurs centaines) décorant chaque virus permet la génération d'un courant par virus de l'ordre du pA. Ainsi, l'adsorption stochastique de particules virales individuelles sur l'électrode se traduit-elle par un accroissement du courant en une série de marches discrètes. Là encore, le courant finit en réalité par décroître après sa brusque augmentation, donnant aux marches un aspect « penché ».

- Enfin, une stratégie très populaire de détection de nanoparticule est basée sur leur électrodissolution à l'UME, dernière ligne du Tableau II.1 [31]. Des nanoparticules, typiquement métalliques (Ag, Au, ...), sont seules présentes en solution (pas d'espèce redox ajoutée). L'UME est amenée à un potentiel suffisamment anodique pour que chaque particule venant à son contact soit oxydée et donc dissoute, au moins partiellement. Le nombre élevée d'atomes impliqués dans l'oxydation d'une nanoparticule métallique se traduit par la génération de courants d'oxydation par collision particulièrement intense, allant de la dizaine de pA au nA. Ces pics de courants, brefs mais intenses, ont donc été initialement détectés sans difficulté en utilisant des potentiostats « commerciaux ». Leur forme gaussienne, ainsi que la charge qu'ils définissent, ont amené les électrochimistes à croire initialement que les particules s'adsorbaient *irréversiblement* sur l'UME pour y être complètement oxydée, en une seule étape [32], [33]. D'une façon très intéressante, cette conclusion a été depuis complètement remise en cause grâce à l'emploi de mesureurs de courants *présentant une bien meilleure bande passante* que ceux implémentés sur des potentiostats du commerce. La meilleure résolution temporelle ainsi obtenue a permis de révéler que les pics, qui semblaient uniques pour chaque collision, étaient en réalité composés d'une succession de « sous-pics » distincts très rapprochés (colonne de droite, dernière ligne du Tableau II.1) [34]–[36]. Ces pics multiples ont été attribués à des collisions répétées *d'une même particule* avec l'UME. A l'issue d'une controverse encore vive, il a été admis que ces multi-collisions étaient bien systématiquement associées avec la détection de particules individuelles, mais que la bande passante limitée des mesureurs de courant employés jusqu'alors les avait systématiquement occultés [37]. Ceci fut confirmé par des expériences où la bande passante effective d'un mesureur de courant rapide a été sciemment limitée par l'adjonction de filtres passe-bas, de fréquence de coupure variable [38], [39]. Il a alors été montré que ce filtrage avait pour effet de fusionner artificiellement les séries de pics rapprochés en de larges pics Gaussiens uniques. Afin de s'affranchir de cet artefact instrumental, la collision de nanoparticules a par la suite été systématiquement étudiée avec des mesureurs de courant aussi rapide que commercialement disponible (Axopatch 200B, Axon Instruments ou HEKA EPC 10), avec une bande passante maximale de 100 kHz, souvent ramenée à 10 kHz après un filtrage numérique nécessaire pour corriger suffisamment le bruit.

Des travaux très récents de la littérature rapportent la détection de la collision de nanoparticules d'argent avec une UME sous une bande passante plus élevée encore, de 1

MHz [40]. Un tel résultat a été obtenu par le développement d'un mesureur de courant à amplificateur transimpédance à contre-réaction résistive, spécifiquement conçu par technologie CMOS. De plus, afin de réduire le bruit, l'expérience a été conduite en configuration SECCM, c'est à dire où la solution contenant les nanoparticules était constituée du ménisque formé entre l'extrémité d'une nanopipette et une surface d'or placée aussi près que possible (à 300 μm) de l'amplificateur. Malgré ce haut degré d'intégration, le filtrage nécessaire pour détecter les pics d'oxydation des nanoparticules de manière convaincante a limité la bande passante à ~ 80 kHz.

Dans une approche plus fondamentale du problème, White et al. ont réalisé des simulations de marches aléatoire afin de reproduire les processus de collision de nanoparticules avec une UME et de leur dissolution [41]. Leurs résultats ont montré, qu'en théorie, une particule individuelle de 70 nm de diamètre, rentrait en collision avec l'UME plusieurs milliers de fois avant d'être dissoute ou de diffuser au loin. Ces collisions multiples avaient lieu à une fréquence de 0.5 à 5 Mhz et généraient un courant maximal de l'ordre du nA, le massif de pics de courant ainsi prédit s'étalant sur ~ 25 ms. Ces travaux ont donc démontré que la dynamique collisionnelle de nanoparticules à une UME ne pourra être correctement résolue expérimentalement qu'à l'aide de mesureurs de courant offrant une bande passante supérieure ou égale à 1 MHz.

4. Pertinence scientifique d'accroître encore la sensibilité et/ou la bande passante de la mesure de faibles courants

A travers quelques exemples de problématiques actuelles, nous avons vu que la mesure de petits courants est en réalité *au cœur* de la nanoélectrochimie.

Il apparaît notamment que le perfectionnement de l'instrumentation constituerait un apport certain dans le domaine de l'électrochimie de nano-impacts. Le développement de nouvelles générations de mesureurs de petits courants, d'une sensibilité « modeste », de l'ordre du pA, mais d'une bande passante 10 à 100 fois plus large que les meilleurs appareils commercialement disponibles, est nécessaire pour l'étude fine de la dynamique de collision/dissolution de nanoparticules. Un tel appareillage haute bande-passante permettrait également une meilleure compréhension des mécanismes des réactions catalytiques aux nanoparticules.

Pour ce qui est du domaine de l'électrochimie à l'échelle de quelques entités moléculaires, il serait souhaitable de pousser spécifiquement les limites *en sensibilité* vers la mesure de courants d'une intensité *inférieure au fA*. A cette échelle la bande passante pourrait être sacrifiée à la sensibilité, tout en étant au moins de quelques Hz. Une telle avancée rendrait possible la détection de molécules individuelles par cyclage redox en utilisant des dispositifs à nanogaps à plus large séparation entre les électrodes, plus aisés à fabriquer et à implanter au sein de circuit micro-fluidiques que les prototypes développés par Lemay et al. Cet appareillage permettrait également de détecter le fonctionnement de molécules d'enzymes redox *individuelles*, par exemple en microscopie Mt/AFM-SECM. On peut en effet aisément calculer que mesurer l'activité d'une molécule d'enzyme unique, typiquement caractérisée par une vitesse catalytique de 1000 s^{-1} , nécessiterait d'être capable de détecter un courant de 0.16 fA. Il s'agit là d'un objectif affiché de la nanoélectrochimie, qui reste à ce jour élué, en dépit de certains résultats récents toujours âprement discutés [42], [43].

5. Conclusions

Le présent chapitre a, espérons-le, éclairé le lecteur sur les enjeux de la mesure de petits courants faradiques en nanoélectrochimie, ainsi que sur notre motivation à proposer des stratégies originales pour y répondre. Le chapitre suivant examinera les raisons fondamentales sous-tendant les limites instrumentales à la mesure de ces courants.

Références du chapitre

- [1] A. J. Bard, "Introduction and Principles," in *Scanning Electrochemical Microscopy Second Edition*, Second edi., A. Bard and M. Mirkin, Eds. Boca Raton: CRC Press, 2012, pp. 1–14.
- [2] A. J. Bard, F. R. F. Fan, J. Kwak, and O. Lev, "Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles," *Anal. Chem.*, vol. 61, no. 2, pp. 132–138, Jan. 1989.
- [3] R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess, and S. Winkvist, "Measurements within the Diffusion Layer Using a Microelectrode Probe," *Anal. Chem.*, vol. 58, no. 4, pp. 844–848, 1986.
- [4] F. R. F. Fan and A. J. Bard, "Electrochemical detection of single molecules," *Science (80-.)*, vol. 267, no. 5199, pp. 871–874, 1995.
- [5] M. A. G. Zevenbergen, P. S. Singh, E. D. Goluch, B. L. Wolfrum, and S. G. Lemay, "Stochastic Sensing of Single Molecules in a Nanofluidic Electrochemical Device," *Nano Lett.*, vol. 11, no. 7, pp. 2881–2886, 2011.
- [6] S. Kang, A. F. Nieuwenhuis, K. Mathwig, D. Mampallil, and S. G. Lemay, "Electrochemical single-molecule detection in aqueous solution using self-aligned nanogap transducers," *ACS Nano*, vol. 7, no. 12, pp. 10931–10937, 2013.
- [7] Y. Du and S. Dong, "Nucleic acid biosensors: Recent advances and perspectives," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 189–215, 2017.
- [8] J. C. Byers, B. Paulose Nadappuram, D. Perry, K. McKelvey, A. W. Colburn, and P. R. Unwin, "Single Molecule Electrochemical Detection in Aqueous Solutions and Ionic Liquids," *Anal. Chem.*, vol. 87, pp. 10450–10456, 2015.
- [9] J. Abbou, "Développement d'une microscopie électrochimique (SECM) à l'échelle du nanomètre par couplage avec la microscopie à force Atomique (AFM). Application à l'étude de la compression et de la dynamique de chaînes linéaires de polyéthylène glycol immobilisées pa," Thèse de Doctorat de l'Université Paris Diderot - Paris 7, 2004.
- [10] J. Abbou, A. Anne, and C. Demaille, "Probing the structure and dynamics of end-

- grafted flexible polymer chain layers by combined atomic force-electrochemical microscopy. Cyclic voltammetry within nanometer-thick macromolecular poly(ethylene glycol) layers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 32, pp. 10095–10108, 2004.
- [11] J. Abbou, A. Anne, and C. Demaille, “Accessing the dynamics of end-grafted flexible polymer chains by atomic force-electrochemical microscopy. Theoretical modeling of the approach curves by the elastic bounded diffusion model and Monte Carlo simulations. Evidence for compression-induced late,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 45, pp. 22664–22675, 2006.
- [12] D. T. Pierce, P. R. Unwin, and A. J. Bard, “Scanning electrochemical microscopy. 17. Studies of enzyme-mediator kinetics for membrane- and surface-immobilized glucose oxidase,” *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 17, pp. 1795–1804, 1992.
- [13] G. Wittstock, M. Burchardt, S. E. Pust, Y. Shen, and C. Zhao, “Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 46, no. 10, pp. 1584–1617, 2007.
- [14] B. R. Horrocks and G. Wittstock, “Biotechnological Applications,” in *Scanning Electrochemical Microscopy Second Edition*, Second Edi., A. J. Bard and M. V. Mirkin, Eds. Boca Raton: CRC Press, 2012, pp. 317–378.
- [15] C. Goyer, “Développement d’une microscopie électrochimique à force atomique SECM-AFM à médiateur lié à la sonde en vue de son application à l’étude du fonctionnement d’une molécule d’enzyme unique.,” Thèse de Doctorat de l’Université Paris Diderot - Paris 7, 2008.
- [16] A. Anne, C. Demaille, and C. Goyer, “Electrochemical Atomic-Force Microscopy Using a Tip-Attached Redox Mediator. Proof-of-Concept and Perspectives for Functional Probing of Nanosystems,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 4, pp. 819–827, 2009.
- [17] K. Huang, A. Anne, M. A. Bahri, and C. Demaille, “Probing individual redox PEGylated gold nanoparticles by electrochemical-atomic force microscopy,” *ACS Nano*, vol. 7, pp. 4151–4163, 2013.
- [18] L. Nault *et al.*, “Electrochemical atomic force microscopy imaging of redox-immunomarked proteins on native potyvirus: From subparticle to single-protein

- resolution,” *ACS Nano*, vol. 9, pp. 4911–4924, 2015.
- [19] G. Tavert-Roudet, A. Anne, A. Barra, A. Chovin, C. Demaille, and T. Michon, “The potyvirus particle recruits the plant translation initiation factor eif4e by means of the vpg covalently linked to the viral RNA,” *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 30, no. 9, 2017.
- [20] T. Oliveira Paiva *et al.*, “Enzymatic Activity of Individual Bioelectrocatalytic Viral Nanoparticles: Dependence of Catalysis on the Viral Scaffold and its Length,” *Nanoscale*, 2022.
- [21] B. M. Quinn, P. G. van’t Hof, and S. G. Lemay, “Time-Resolved Electrochemical Detection of Discrete Adsorption Events,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 27, pp. 8360–8361, Jul. 2004.
- [22] X. Xiao and A. J. Bard, “Observing Single Nanoparticle Collisions at an Ultramicroelectrode by Electrocatalytic Amplification,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 31, pp. 9610–9612, Aug. 2007.
- [23] S. Goines and J. E. Dick, “Review—Electrochemistry’s Potential to Reach the Ultimate Sensitivity in Measurement Science,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 167, no. 3, p. 37505, 2020.
- [24] B.-K. Kim, A. Boika, J. Kim, J. E. Dick, and A. J. Bard, “Characterizing Emulsions by Observation of Single Droplet Collisions—Attoliter Electrochemical Reactors,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 13, pp. 4849–4852, Apr. 2014.
- [25] B.-K. Kim, J. Kim, and A. J. Bard, “Electrochemistry of a Single Attoliter Emulsion Droplet in Collisions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 6, pp. 2343–2349, Feb. 2015.
- [26] E. Lebègue, C. M. Anderson, J. E. Dick, L. J. Webb, and A. J. Bard, “Electrochemical Detection of Single Phospholipid Vesicle Collisions at a Pt Ultramicroelectrode,” *Langmuir*, vol. 31, no. 42, pp. 11734–11739, Oct. 2015.
- [27] J. E. Dick, E. Lebègue, L. M. Strawsine, and A. J. Bard, “Millisecond Coulometry via Zeptoliter Droplet Collisions on an Ultramicroelectrode,” *Electroanalysis*, vol. 28, no. 10, pp. 2320–2326, Oct. 2016.
- [28] H. S. Toh and R. G. Compton, “Electrochemical detection of single micelles through

- ‘nano-impacts,’” *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 8, pp. 5053–5058, 2015.
- [29] P. A. Defnet, C. Han, and B. Zhang, “Temporally-Resolved Ultrafast Hydrogen Adsorption and Evolution on Single Platinum Nanoparticles,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 6, pp. 4023–4030, Mar. 2019.
- [30] J. E. Dick, A. T. Hilterbrand, L. M. Strawsine, J. W. Upton, and A. J. Bard, “Enzymatically enhanced collisions on ultramicroelectrodes for specific and rapid detection of individual viruses,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 23, pp. 6403–6408, 2016.
- [31] P. A. Defnet, T. J. Anderson, and B. Zhang, “Stochastic collision electrochemistry of single silver nanoparticles,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 22, pp. 129–135, 2020.
- [32] Y.-G. Zhou, N. V. Rees, and R. G. Compton, “The Electrochemical Detection and Characterization of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 50, no. 18, pp. 4219–4221, Apr. 2011.
- [33] C. Batchelor-McAuley, J. Ellison, K. Tschulik, P. L. Hurst, R. Boldt, and R. G. Compton, “In situ nanoparticle sizing with zeptomole sensitivity,” *Analyst*, vol. 140, no. 15, pp. 5048–5054, 2015.
- [34] S. M. Oja *et al.*, “Observation of Multiplexed Collision Behavior during the Electro-Oxidation of Single Ag Nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 2, pp. 708–718, Jan. 2017.
- [35] J. Ustarroz, M. Kang, E. Bullions, and P. R. Unwin, “Impact and oxidation of single silver nanoparticles at electrode surfaces: one shot versus multiple events,” *Chem. Sci.*, vol. 8, pp. 1841–1853, 2017.
- [36] W. Ma *et al.*, “Tracking motion trajectories of individual nanoparticles using time-resolved current traces,” *Chem. Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 1854–1861, 2017.
- [37] C. A. Little *et al.*, “A quantitative methodology for the study of particle-electrode impacts,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 20, no. 19, pp. 13537–13546, May 2018.
- [38] D. A. Robinson, M. A. Edwards, H. Ren, and H. S. White, “Effects of Instrumental Filters on Electrochemical Measurement of Single-Nanoparticle Collision Dynamics,” *ChemElectroChem*, vol. 5, no. 20, pp. 3059–3067, 2018.

- [39] K. Kanokkanchana, E. N. Saw, and K. Tschulik, “Nano Impact Electrochemistry: Effects of Electronic Filtering on Peak Height, Duration and Area,” *ChemElectroChem*, vol. 5, no. 20, pp. 3000–3005, Oct. 2018.
- [40] M. Brunet Cabré, D. Djekic, T. Romano, N. Hanna, J. Anders, and K. McKelvey, “Microscale Electrochemical Cell on a Custom CMOS Transimpedance Amplifier for High Temporal Resolution Single Entity Electrochemistry**,” *ChemElectroChem*, vol. 7, no. 23, pp. 4724–4729, 2020.
- [41] D. A. Robinson *et al.*, “Collision Dynamics during the Electrooxidation of Individual Silver Nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 46, pp. 16923–16931, Nov. 2017.
- [42] K. J. Vannoy, A. Ryabykh, A. I. Chapoval, and J. E. Dick, “Single enzyme electroanalysis,” *Analyst*, vol. 146, no. 11, pp. 3413–3421, 2021.
- [43] C. Davis, S. X. Wang, and L. Sepunaru, “What can electrochemistry tell us about individual enzymes?,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 25, p. 100643, 2021.

Chapitre III

**Identifier et repousser les limites instrumentales de
la mesure des petits courants électrochimiques**

Identifier et repousser les limites instrumentales

Identifier et repousser les limites instrumentales de la mesure des petits courants électrochimiques

1. Introduction

Dans ce chapitre nous discuterons du phénomène qui limite la mesure de petits courants : le bruit. Ce sujet est abordé en détail dans de nombreux travaux de la littérature, dans des contextes expérimentaux très variés. Nous nous concentrerons sur la mesure de courants faradiques et suivrons l'approche d'Henri White de l'Université de l'Utah qui a récemment passé en revue de manière exhaustive les performances rapportées dans la littérature dans ce domaine. Il s'agira donc là d'une approche pratique de la notion de bruit de la part d'électrochimistes, qui, de par leur formation, sont bien moins familiers du sujet que peuvent l'être les électroniciens.

Ayant identifié les limites instrumentales actuelles nous serons à même de proposer des stratégies pertinentes pour les repousser.

2. Les différentes sources de bruit sur la mesure de courant

De nombreuses sources de bruit peuvent limiter la mesure de petits courants en électrochimie. Elles se différencient par leurs caractéristiques en fréquence, et leurs contributions respectives au bruit « global » qui est donc fonction de la bande passante de la mesure. Ceci a été particulièrement bien décrit dans les travaux portant sur l'étude de la translocation de biomacromolécules à travers des nanopores [1]. Dans cette configuration, une différence de potentiel est appliquée de part et d'autre d'un nanopore séparant deux compartiments remplis d'un électrolyte, forçant le passage d'un courant « ionique », dont l'intensité, de 1 – 10 nA, est finement modulée par le passage de la biomolécule d'intérêt (brins d'ADN, protéines). Il s'agit alors d'enregistrer ces variations de courant, sous une bande passante la plus élevée possible, afin d'accéder à des signatures transitoires de la dynamique conformationnelle des macromolécules. En intégrant le nanopore et le circuit de mesure sur une même puce, par technologie CMOS, une bande passante allant jusqu'à 10 MHz a pu être démontrée [2].

En ce qui concerne spécifiquement les très petits courants *faradiques*, il a été récemment rapporté par White et al., que la source de bruit la plus limitante était également la plus fondamentale : il s'agit du bruit de grenaille (ou bruit de Schottky, ou bruit quantique), qui

reflète la nature discrète des porteurs de charges [3]. Le but de ces auteurs était de répondre à la question du nombre ultime d'électrons quantifiables via la mesure d'un courant électrochimique. Nous exposons ci-dessous leur raisonnement et conclusion.

3. Le bruit de grenaille : la limite ultime pour la mesure de courant faradique ?

Le bruit de grenaille provient de la fluctuation temporelle du nombre d'électrons générant le courant, i , mesuré durant un temps Δt . Son intensité, i_g , est donnée par : $i_g = \sqrt{ei/\Delta t}$, où e est la charge électrique de l'électron.

En appliquant un critère qui stipule qu'un signal pour être quantifié doit représenter 10 fois l'écart type de sa mesure, on peut définir un courant limite mesurable, i_l : $i_l = 10 i_g = 10\sqrt{ei_l/\Delta t}$, d'où $i_l = 100 e/\Delta t$.

Ce résultat indique que le passage d'au moins 100 électrons est nécessaire pour pouvoir mesurer un courant avec un rapport signal sur bruit de 10. i_l correspond à l'intensité minimale qu'il est possible de mesurer durant un temps Δt , c'est à dire sous une bande passante f , par convention prise égale à $1/(2\Delta t)$.

Pour des expériences « réelles » un courant de base vient souvent s'ajouter au faible signal recherché, qui ne représente alors souvent qu'une fraction de l'intensité totale mesurée. En postulant que le courant de base est typiquement ~ 10 x plus intense que le signal d'intérêt, et qu'il véhicule lui aussi du bruit de grenaille, White et al. proposent une limite « pratique » de mesure des petits courants électrochimiques donnée par :

$$i_l^p = 2100 e/\Delta t \quad (\text{III.1})$$

Soit un nombre minimal de $N_e = 2100$ électrons requis pour mesurer un courant.

Afin de confronter ces prévisions théoriques aux résultats expérimentaux, White et al. ont collecté une large base de données des intensités des courants électrochimiques rapportées dans la littérature, et les ont portées en fonction de la bande passante des mesures, Figure III.1.

On constate que l'ensemble des points se situent au-delà de la limite de détection des 100 électrons (représentée par la ligne en trait continu en Figure III.1). On note également que de nombreux points, correspondants aux intensités parmi les plus faibles rapportées, semblent positionnés sur la ligne en pointillée représentant la limite de 2100 électrons, calculée en tenant compte de l'influence d'un courant de base sur la mesure. Cette

observation suggère, comme défendu par White et al., que la limite de quantification des petits courants en électrochimie est imposée par le bruit de grenaille. Les données présentées en Figure III.1, semblent même indiquer que cette limite a d'ores et déjà été atteinte pour les expériences les plus pointues de molécules uniques générant des courants de l'ordre du fA (◆), d'électrochimie de particules uniques (★, celles caractérisées par des intensités de l'ordre du pA), ou de mesures de courants ioniques à travers des nanopores (■). On voit que dans les deux premiers cas on trouve également des données entre la ligne des 2100 électrons, et celle des 100, laissant penser que, même pour les mesures à la pointe de l'instrumentation un gain en sensibilité et/ou bande passante, se rapprocher plus de la ligne des 100 électrons, reste peut-être possible, bien que dépendant du courant de base.

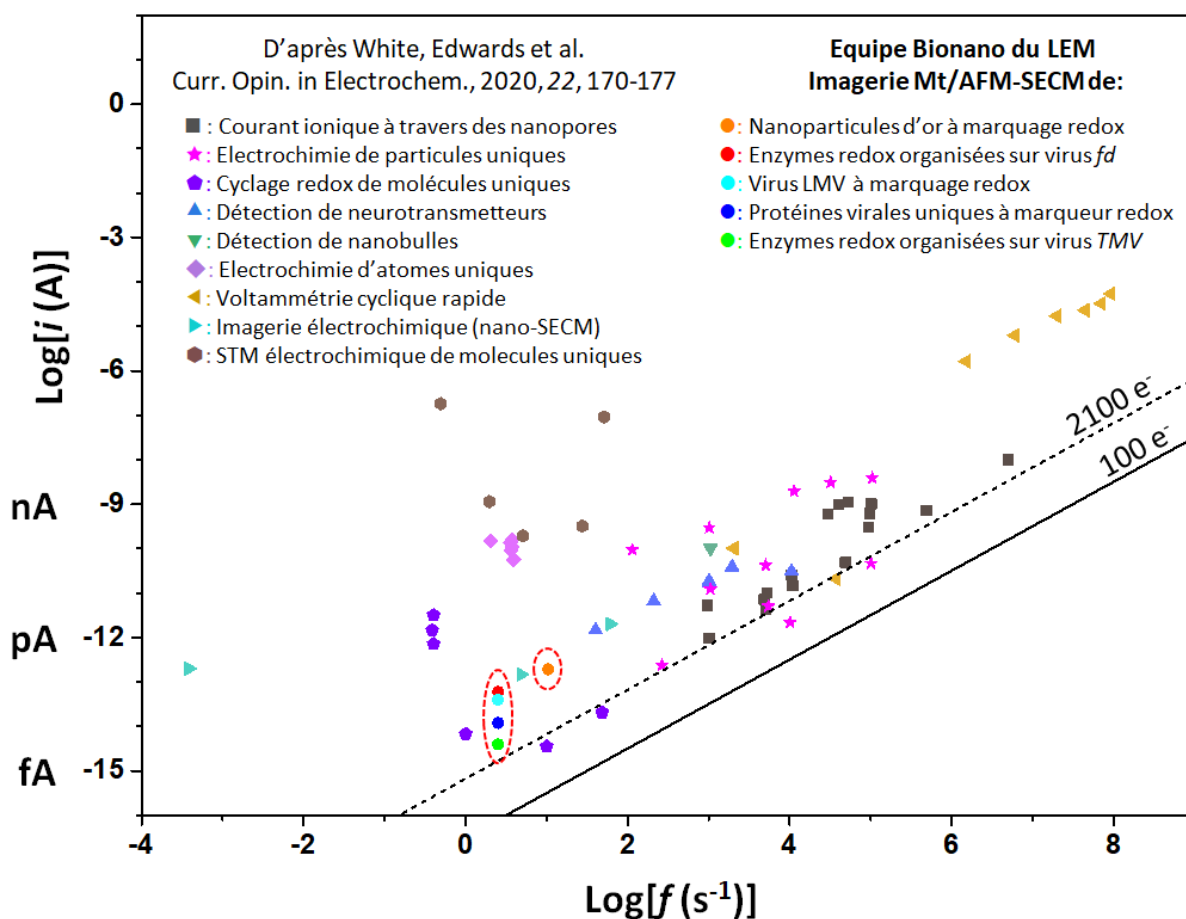


Figure III.1. Intensités de courants électrochimiques rapportées dans la littérature en fonction de la bande passante de la mesure prise par convention $f = 1/(2\Delta t)$. Les données issues des travaux de l'équipe Bionano sont entourées en rouge. Les lignes en traits noirs, continu et pointillés, correspondent aux limites de détection de 100 et 2100 électrons, imposées par le bruit de grenaille, respectivement sans et avec prise en compte de l'effet d'un courant de base typiquement 10 fois supérieur à celui du courant de mesure quantifiant l'évènement.

D'une façon générale, en terme de bande passante, on observe que, pour la mesure du fA au nA les limites théoriques à 2100 électrons, respectivement de 1.5 Hz et 1.5 Mhz ont déjà été pratiquement atteintes en utilisant les meilleurs amplificateurs de courants décrits dans la littérature. En supposant que la limite à 100 électrons soit atteignable, un gain supplémentaire en bande passante d'un facteur $\times 10$ est, au mieux, envisageable. En terme de sensibilité ultime, on constate également que mesurer des intensités très inférieures au fA ne serait possible qu'au prix d'une bande passante significativement inférieure à 1 Hz, en pratique difficilement compatible avec l'étude de systèmes électrochimiques à la dynamique même lente.

Un cas particulièrement intéressant est celui qui concerne les résultats de l'équipe Bionano en bio-imagerie Mt/AFM-SECM. (●,●,●,●,●)[4]–[7]. On voit en effet en Figure III.1, que, même pour le courant le plus faible mesuré (~ 4 fA sous 3 Hz), correspondant à l'activité de quelques dizaines de molécules d'enzymes, un gain en bande passante d'un facteur $\times 2$, est possible avant même d'atteindre la limite des 2100 électrons. Ce gain peut paraître modeste mais, comme décrit au chapitre précédent il se traduirait par un temps de balayage moindre et/ou une imagerie plus douce des biomolécules. De manière équivalente, ce graphique montre qu'en conservant une bande passante de 3 Hz, une sensibilité de 2 fA devrait pouvoir être atteinte en améliorant les performances de notre électronique.

En conclusion, même si le perfectionnement de l'électronique de mesure de petits courants peut encore permettre quelques avancées en nanoélectrochimie, un gain important en bande passante et plus encore en sensibilité semble exclu. C'est pourquoi, en première partie de ce travail de thèse, nous proposons une nouvelle stratégie pour la détection d'évènements de transfert d'électrons faradiques, non plus basée sur la mesure directe des faibles courants qu'ils peuvent générer, mais sur le couplage entre transfert d'électrons et émission de lumière (de photons). Afin d'évaluer *a priori* la viabilité de cette approche, il convient de comparer les performances de la mesure d'un flux de photons à celles d'un flux d'électrons, pour estimer les gains potentiels en sensibilité et bande passante d'une telle stratégie de conversion courant / lumière.

4. Convertir un flux d'électrons en flux de photons : quels bénéfices ?

Sans préjuger du mécanisme par lequel un courant serait converti en un flux de photons, il est intéressant de discuter de la sensibilité avec laquelle la lumière peut être quantifiée.

Identifier et repousser les limites instrumentales

On peut envisager deux dispositifs distincts pour cela, une caméra CCD ou un photomultiplicateur à tube (PMT). Nous ne considérerons que ce dernier dispositif pour la discussion ci-dessous, car il présente une meilleure sensibilité et bande passante qu'une caméra CCD.

Relier la réponse du PMT à l'intensité de la lumière incidente est une tâche rendue difficile par la pléthore d'unités caractérisant le flux lumineux. Néanmoins, on trouve dans la littérature l'expression qui relie P_{min} , la puissance lumineuse minimale assurant un signal sur bruit égal à 1, à la bande passante de la mesure, f , et à divers paramètres caractéristiques du PMT [8]. Pour un rapport signal sur bruit de 10, l'expression de P_{min} est donnée par :

$$P_{min} = 100 \left(\frac{e\mu\alpha f}{S_p} + \frac{\sqrt{(e\mu\alpha f)^2 + \frac{4}{100} e i_{da} \mu \alpha f}}{S_p} \right) \quad (III.2)$$

Avec :

α : la figure de bruit

i_{da} : Le courant d'obscurité de l'anode

μ : Le gain d'amplification

S_p : La sensibilité radiante de l'anode

Les valeurs caractéristiques du photomultiplicateur dont nous disposons (H10721-110, HAMAMATSU) sont : $i_{da} = 1$ nA, $\mu = 2 \cdot 10^6$ (pour une tension de 1V), $S_p = 2.2 \cdot 10^5$ W/A, $\alpha = 1.3$.

La puissance lumineuse reçue dépend du flux de photons, j_p , et de la longueur d'onde de la lumière, λ , par la formule bien connue:

$$P = j_p h C / \lambda \quad (III.3)$$

avec $h = 6.62 \cdot 10^{-34}$, la constante de Planck et $C \approx 3 \cdot 10^{10}$ cm/s la célérité de la lumière.

Si, par un mécanisme de conversion convenable, on arrive à associer chaque électron échangé lors du processus électrochimique d'intérêt à l'émission d'un photon, alors le flux de photons sera égal au flux d'électrons : $j_p = i_e/e$, ou i_e est le courant « équivalent » qui serait mesuré directement. On peut ainsi convertir la valeur de P_{min} , la puissance minimale mesurable avec le PMT, en une intensité minimale équivalente, i_e^{min} . En considérant une émission de lumière visible, de longueur d'onde 500 nm, on obtient simplement numériquement :

Identifier et repousser les limites instrumentales

$$i_e^{min} = P_{min} / 2.5 \quad (III.4)$$

Cette relation permet de convertir la dépendance de P_{min} avec la bande passante, donnée par l'Equation III.2, en celle d'un courant minimum *équivalent*, mesurable *indirectement* en utilisant un PMT, et de tracer sa variation avec bande passante f , Figure III.2 (trait noir plein).

On peut alors directement comparer cette variation à celle de l'intensité minimale détectable par mesure directe, limitée par le bruit de grenaille comme discuté ci-dessus (en trait rouge en Figure III.2).

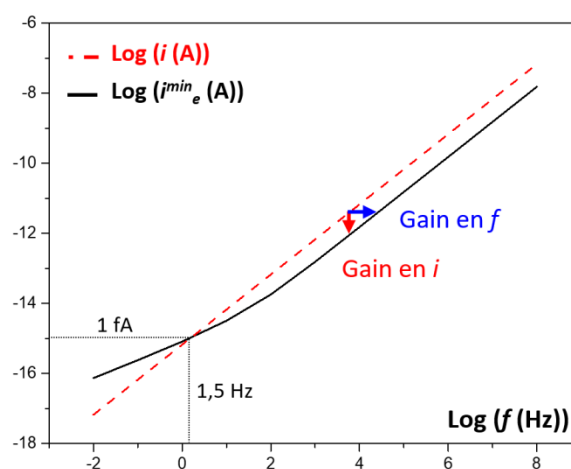


Figure III.2. Variation du courant minimal mesurable, soit directement (i), soit par conversion intégrale en lumière et détection via un PMT, (i_e^{min}), en fonction de la bande passante en fréquence de la mesure, (f). La droite en pointillés est la valeur de i donnée par l'équation (III.1), limitée par le bruit de grenaille et correspondant au passage de 2100 électrons durant le temps $\Delta t = 1/(2f)$. La courbe en trait noir représente la valeur de i_e^{min} limitée par le bruit de la réponse du PMT et donnée par les équations (III.2) et (III.4).

On note que la courbe représentant l'intensité minimale mesurable par conversion du courant en flux de photons se situe en dessous de celle correspondant à la mesure directe de l'intensité, pour toute bande passante au-delà de 1.5 Hz, ou, de manière équivalente dès que $i > \sim 1$ fA. Cette situation traduit un gain en sensibilité espérable de la conversion courant en lumière qui, pour une valeur de bande passante donnée, est quantifiable en déterminant l'écart vertical entre les courbes (flèche rouge en Figure III.2). De même, pour une intensité donnée, le gain en bande passante espérable est représenté par l'écart horizontal entre les courbes (flèche bleue en Figure III.2). Ces gains peuvent alors être portés en fonction de la bande passante, ou du courant, respectivement, en Figure III.3A et III.3B.

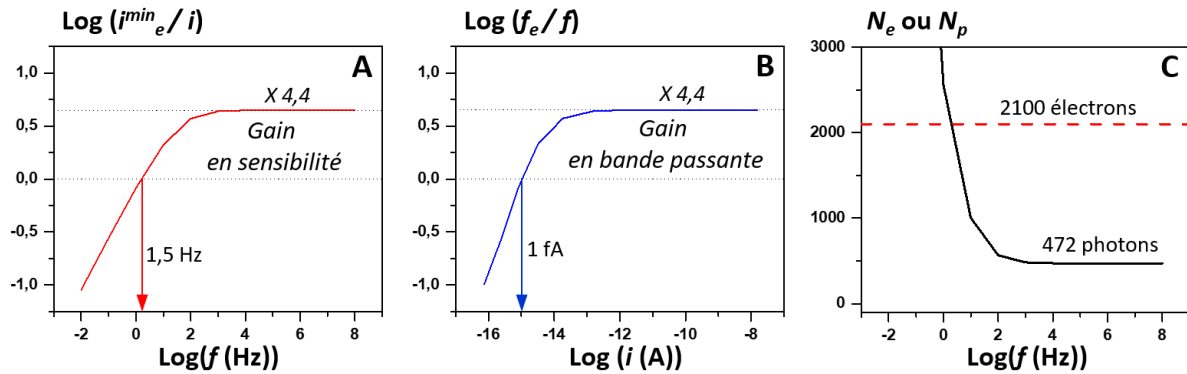


Figure III.3. Gains en sensibilité, (A), ou en bande passante, (B), apportés par la conversion intégrale du courant en lumière et sa détection avec un PMT, respectivement portés en fonction de la bande passante de la mesure (f) et de l'intensité à mesurer (i). On montre en (C) le nombre minimal d'électrons ou de photons devant être détectés dans l'intervalle $\Delta t = 1/(2f)$ pour générer une réponse quantifiable par un mesureur de courant (droite en pointillés) ou un PMT (courbe en trait plein).

En Figure III.3A, on constate que le gain en sensibilité croît avec la bande passante depuis 1 Hz jusqu'à ~ 10 kHz, ou il atteint un facteur $\times 4.4$, conservé à bande passante plus élevée. De manière similaire, comme le montre la Figure III.3B, le gain en bande passante pour un courant donné croît avec l'intensité à mesurer, jusqu'à atteindre $\times 4.4$ pour des intensités au-delà de 100 fA. On peut notamment déduire que des courants de l'ordre de 1 pA ou 1 nA deviennent mesurables avec des bandes passantes de 6.3 kHz et 4.2 MHz respectivement, le tout avec un rapport signal sur bruit de 10.

Enfin, une façon complémentaire d'apprécier le gain apporté par la mesure d'un flux de photons, plutôt que d'électrons, est de calculer le nombre de photons minimum, N_p , quantifiables durant le temps de la mesure Δt . On a : $N_p = j_p \times \Delta t$. On peut également relier j_p à P_{min} via l'équation (III.3), pour arriver à : $N_p = P_{\text{min}}\lambda/(2hCf)$.

P_{min} variant avec f suivant l'équation (III.2), on arrive ainsi à un nombre de photons minimal requis qui dépend de f comme représenté en Figure III.3C. On constate que pour des bandes passantes inférieures à 1.5 Hz, plus de 2100 photons sont nécessaires, c'est-à-dire plus que d'électrons pour la mesure directe. Cependant au-delà de 1.5 Hz, le nombre de photons nécessaires chute très rapidement en deçà de ce seuil, pour atteindre 472 photons dès que la bande passante excède 10 kHz. Une différence notable par rapport aux 2100 électrons nécessaires à la mesure directe d'un courant, qui laisse présager la possibilité d'un gain en sensibilité conséquent.

En conclusion, même si les calculs ci-dessus sont basés sur un scénario optimiste, qui voudrait notamment que le mécanisme de conversion courant/lumière soit d'une efficacité parfaite, les valeurs obtenues laissent raisonnablement espérer que des gains en sensibilité et en bande passante pourraient résulter d'une telle stratégie. Le gain en bande passante réalisable pour des intensités allant du pA au nA bénéficierait notamment grandement à l'étude de la dynamique des processus de collision/dissolution ou collision/catalyse de nanoparticules.

5. Au-delà de la mesure de flux : vers le comptage d'électrons

Caractériser le passage d'électrons via leur flux (le courant) n'a de sens que si le nombre d'électrons transférés durant la mesure est suffisamment grand. Lorsque cela cesse d'être le cas, la notion même de courant n'a plus réellement de sens. A cette échelle, sonder un processus électrochimique requière d'être alors capable « de compter » les éléments individuels de transferts d'électrons. Si les amplificateurs de courant ne peuvent, de par leur conception, réaliser cette prouesse, celle-ci n'est pas totalement hors de portée instrumentale. Ainsi, la détection de transferts d'électrons à cette échelle a été démontrée pour des molécules bien particulières, celles dont la conversion redox produit une espèce capable d'émettre de la lumière [9]–[11]. Pour ces molécules, transfert d'électron et émission de photon se trouvent naturellement couplés, et la détection des événements de luminescence permet donc indirectement le « comptage » de transferts d'électrons individuels. Les espèces dites électro-fluorogènes, c'est-à-dire dont le produit d'oxydation ou de réduction est une molécule fluorescente, sont particulièrement adaptées pour réaliser cette conversion électrons/photons. En effet, en fluorescence l'espèce produite est excitée par de la lumière incidente et peut émettre en retour *un flux* de photons permettant sa détection sensible. De ce fait, un événement redox unique indétectable directement devient mesurable « optiquement », avec une sensibilité sans doute encore meilleure que discuté ci-dessus, puisqu'un seul électron n'est pas associé à l'émission d'un seul photon, mais d'un grand nombre de ceux-ci. D'une façon très pratique, il en résulte que ce genre de mesure ne requière pas l'emploi d'un PMT, mais qu'une caméra CCD, moins sensible, suffit. Un autre type de luminescence peut être également envisagé, l'électrochimiluminescence (ECL). Celle-ci repose sur le déclenchement à l'électrode, par le transfert d'électron, d'une série de réactions redox en cascade produisant des intermédiaires de haute énergie, qui se

Identifier et repousser les limites instrumentales

désactivent par émission de photons. Dans ce cas un nombre moindre de photon est émis par rapport à la fluorescence, et un PMT est requis.

6. Conclusions

Ayant maintenant une vue plus claire des limites instrumentales actuelles pour la mesure des petits courants électrochimiques, nous proposons deux approches distinctes destinées à les repousser :

- Le développement d'un schéma de mesure original permettant de réaliser le couplage entre transfert d'électrons et luminescence (fluorescence et ECL) *pour la détection de réactions redox « génériques »*, c'est-à-dire ne se limitant pas aux molécules fluorogènes, ou capables de déclencher des réactions ECL. Notre but est la mise au point d'un dispositif expérimental universel, basé sur la conversion électron/photon, pour la détection de tout processus électrochimique à une électrode, générant des courants trop faibles pour être mesurés directement. Ce travail est présenté dans le manuscrit en chapitres IV, V pour ce qui est de la fluorescence et en chapitre VI pour ce qui est de l'ECL. Il a à ce jour fait l'objet de deux publications [12], [13].
- La conception d'un mesureur de petits courants basé sur un schéma d'amplification à transimpédance capacitive, aux performances accrues par rapport aux montages à transimpédance résistive utilisés couramment. Cette stratégie sera exposée au Chapitre VII du manuscrit. Nous en espérons des gains, en sensibilité et bande passante, modestes mais non négligeables, notamment pour nos mesures en Mt/AFM-SECM. L'architecture de cet appareillage sera à terme publiée afin de bénéficier à tous.

References du chapitre

- [1] A. J. W. Hartel, S. Shekar, P. Ong, I. Schroeder, G. Thiel, and K. L. Shepard, “High bandwidth approaches in nanopore and ion channel recordings - A tutorial review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1061, pp. 13–27, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.034>.
- [2] C.-C. Chien, S. Shekar, D. J. Niedzwiecki, K. L. Shepard, and M. Drndić, “Single-Stranded DNA Translocation Recordings through Solid-State Nanopores on Glass Chips at 10 MHz Measurement Bandwidth,” *ACS Nano*, vol. 13, no. 9, pp. 10545–10554, Sep. 2019, doi: [10.1021/acsnano.9b04626](https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04626).
- [3] R. Gao, M. A. Edwards, J. M. Harris, and H. S. White, “Shot noise sets the limit of quantification in electrochemical measurements,” *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 22. Elsevier B.V., pp. 170–177, Aug. 2020, doi: [10.1016/j.coelec.2020.05.010](https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.05.010).
- [4] T. Oliveira Paiva *et al.*, “Enzymatic Activity of Individual Bioelectrocatalytic Viral Nanoparticles: Dependence of Catalysis on the Viral Scaffold and its Length,” *Nanoscale*, 2022, doi: [10.1039/d1nr07445h](https://doi.org/10.1039/d1nr07445h).
- [5] L. Nault *et al.*, “Electrochemical atomic force microscopy imaging of redox-immunomarked proteins on native potyviruses: From subparticle to single-protein resolution,” *ACS Nano*, vol. 9, pp. 4911–4924, 2015, doi: [10.1021/acsnano.5b00952](https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00952).
- [6] T. O. Paiva *et al.*, “Probing the Enzymatic Activity of Individual Biocatalytic fd-Viral Particles by Electrochemical-Atomic Force Microscopy,” *ACS Catal.*, vol. 10, no. 14, pp. 7843–7856, Jul. 2020, doi: [10.1021/acscatal.0c01920](https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01920).
- [7] K. Huang, A. Anne, M. A. Bahri, and C. Demaille, “Probing individual redox PEGylated gold nanoparticles by electrochemical-atomic force microscopy,” *ACS Nano*, vol. 7, pp. 4151–4163, 2013, doi: [10.1021/nn400527u](https://doi.org/10.1021/nn400527u).
- [8] *Photomultipliers tubes - Basics and applications*, 4ème édit. Hamamatsu, 2017.
- [9] C. Lei, D. Hu, and E. J. Ackerman, “Single-molecule fluorescence spectroelectrochemistry of cresyl violet,” *Chem. Commun.*, vol. 43, pp. 5490–5492, 2008, doi: [10.1039/b812161c](https://doi.org/10.1039/b812161c).

- [10] J. Liu, C. M. Hill, S. Pan, and H. Liu, "Interfacial charge transfer events of BODIPY molecules: single molecule spectroelectrochemistry and substrate effects," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 42, pp. 23150–23156, 2014, doi: 10.1039/C4CP02950J.
- [11] J. Lu, Y. Fan, M. D. Howard, J. C. Vaughan, and B. Zhang, "Single-Molecule Electrochemistry on a Porous Silica-Coated Electrode," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 8, pp. 2964–2971, Mar. 2017, doi: 10.1021/jacs.6b10191.
- [12] R. Djoumer *et al.*, "Converting Any Faradaic Current Generated at an Electrode under Potentiostatic Control into a Remote Fluorescence Signal," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 10, pp. 6775–6782, May 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00851.
- [13] R. Djoumer, A. Chovin, C. Demaille, C. Dejous, and H. Hallil, "Real-time Conversion of Electrochemical Currents into Fluorescence Signals Using 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic Acid (HPTS) and Amplex Red as Fluorogenic Reporters," *ChemElectroChem*, vol. 8, no. 12, pp. 2298–2307, Jun. 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/celec.202100517>.

Identifier et repousser les limites instrumentales

Chapitre IV

**Convertir un courant faradique généré à une
électrode sous contrôle potentiostatique en émission
de fluorescence**

Convertir un courant faradique généré à une électrode sous contrôle potentiostatique en émission de fluorescence

1. Introduction

Nous l'avons vu en introduction générale et au chapitre précédent, être capable de transformer un événement de transfert d'électron en une émission de fluorescence constituerait un formidable gain en sensibilité, permettant de détecter des événements faradiques générant des courants trop faibles pour être mesurables autrement. Se pose néanmoins la question fondamentale du processus par lequel un transfert d'électrons peut être transduit par une émission de fluorescence. Un tel couplage entre événement électrochimique et de fluorescence est immédiat quand il s'agit d'étudier des espèces électroactives dont la fluorescence est intrinsèquement modulée par l'état redox [1]. Certaines molécules, dites fluorogènes, peuvent ainsi passer, suite à un transfert d'électron d'un état non-fluorescent à un état fluorescent. Cependant, la majorité des molécules ne présentent pas cette propriété ni ne peuvent en être doté. De même, lorsqu'une espèce d'intérêt est telle que sa conversion électrochimique génère un changement local du pH, une molécule dont la fluorescence est modulée par le pH peut être utilisée pour en détecter la transformation électrochimique [2]–[4]. Mais là encore ce schéma n'est pas généralisable à une espèce électroactive quelconque. C'est pourquoi il est nécessaire de développer un nouveau schéma expérimental permettant la conversion directe d'une réaction de transfert d'électrons d'une molécule non fluorescente (et non fluorogénique), en une émission de fluorescence. Jusque-là, un tel schéma n'a été réalisé qu'en configuration bipolaire, Figure VI.1 [5]–[7].

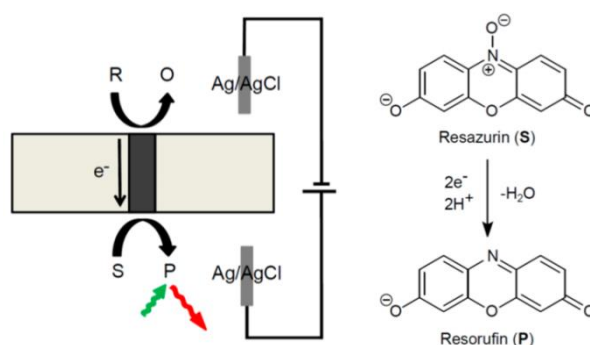


Figure IV.1. Couplage direct de la réaction non fluorogénique générant l'espèce O à partir de R avec la réaction cette fois-ci fluorogénique générant P à partir de S, en configuration bipolaire fermée. La résazurine (S) générant la résorufine (P) est ici la molécule fluorochrome utilisée.

Une réaction redox classique (non-fluorogénique) se produit à un pôle tandis qu'une réaction électro-fluorogénique se produit à l'autre pôle, et est suivie par microscopie optique. Ce concept a très récemment été porté par Zhang et al. à une échelle nanométrique, dans le but de détecter optiquement un évènement redox individuel par mesure de fluorescence [8].

Cependant, le problème avec l'électrochimie bipolaire c'est que, pour rappel, le potentiel appliqué pour générer le champ électrique n'est pas uniquement relié à la thermodynamique de la réaction de transfert faradique d'électrons, mais dépend également d'autres paramètres non « universels », comme la taille et la géométrie exacte des deux pôles, ou encore le potentiel redox du fluorogène [9]. En d'autres termes, l'expérimentateur ne contrôle que de façon indirecte le potentiel appliqué au pôle où se produit la réaction d'intérêt.

Il serait donc souhaitable que ce pôle soit sous contrôle potentiostatique, c'est-à-dire qu'il soit possible de lui appliquer un potentiel parfaitement défini thermodynamiquement, induisant une réaction électrochimique d'intérêt, tout en s'assurant que soit émis à l'autre pôle un signal en fluorescence, traduisant la cinétique de cette réaction. C'est précisément ce que le schéma instrumental présenté dans ce chapitre est amené à accomplir. Il repose sur la propriété intrinsèque du montage potentiostatique qui couple deux réactions redox, l'une d'intérêt ayant lieu à une électrode sous contrôle potentiostatique et l'autre à la contre-électrode.

2. Principe de fonctionnement du convertisseur courant-fluorescence que nous proposons

La stratégie originale et « universelle » que nous proposons ici pour coupler *tout* transfert d'électron ayant lieu à une électrode en une émission de fluorescence met à profit le principe même de fonctionnement du montage potentiostatique communément utilisé par les électrochimistes. Ce montage électronique est conçu de telle sorte que l'expérimentateur puisse contrôler le potentiel de l'électrode dite de travail (WK) afin d'y déclencher un transfert d'électron vers/depuis une molécule d'intérêt qui se trouve ainsi respectivement réduite/oxydée. Le principe de conservation de la charge électrique, qui veut que toute charge injectée/extraite vers/depuis la solution doit être compensée, est respecté grâce à la présence d'une contre-électrode (CE) où se produit une réaction électrochimique inverse de celle ayant lieu à l'électrode de travail. L'électrode de travail et la contre-électrode peuvent être placées dans des compartiments électrolytiques séparés, du moment que ceux-ci sont reliés par un

pont-salin ou un verre fritté permettant le passage des ions. Par principe, le potentiostat ajuste automatiquement le potentiel de la contre-électrode à une valeur telle que la « contre » réaction électrochimique nécessaire puisse y avoir lieu. Ce potentiel n'est pas sous le contrôle direct de l'expérimentateur mais il est tel que le courant généré par la contre-électrode soit égal et de signe opposé à celui de l'électrode de travail. Le plus souvent, la nature de cette contre-réaction importe peu à l'expérimentateur, elle met typiquement en jeu l'électrolyse des molécules du solvant. Notre idée consiste à faire en sorte que cette contre-réaction électrochimique soit une réaction redox générant de la fluorescence. Ainsi, conserve-t-on l'avantage du montage à trois électrodes, à savoir un contrôle parfait du potentiel de l'électrode de travail, tout en couplant la réaction redox d'intérêt à une réaction fluorogénique elle-même redox. De plus, le courant à la contre-électrode étant nécessairement égal en valeur absolue au courant à l'électrode de travail, ce couplage est parfaitement quantitatif « électron pour électron »: la fluorescence émise à la contre-électrode doit refléter quantitativement le courant généré par la réaction électrochimique de l'espèce d'intérêt à l'électrode de travail.

De façon pratique, nous proposons de réaliser ce schéma de conversion du courant faradique en émission de fluorescence tel que représenté en Figure IV.2, il nécessite l'emploi d'une cellule électrochimique, « classique » dite à compartiments séparés.

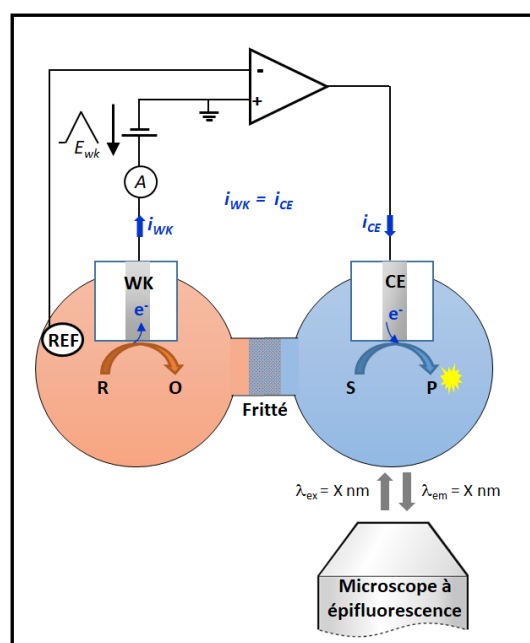


Figure IV.2. Principe du système de conversion courant faradique-fluorescence. La réaction électrochimique d'intérêt se produisant à l'électrode de travail (WK) est couplée, via le potentiostat, à la production d'une espèce fluorescente à la contre-électrode (CE). Le courant faradique ($i_{WK} = i_{CE}$) est alors traduit en émission de fluorescence. Dans le cas de l'ECL (chapitre VI), le même schéma est employé sans lumière d'excitation.

La solution contenant l'espèce d'intérêt est placée dans le compartiment comprenant l'électrode de travail (WK) et l'électrode de référence (REF). Ce dernier est relié, via un verre fritté, à un second compartiment, contenant l'espèce fluorogénique et dans lequel est immergée la contre-électrode (CE). Les trois électrodes sont connectées à un potentiostat classique. Cette configuration permet l'application du potentiel désiré à l'électrode de travail induisant l'oxydation ou la réduction de l'espèce d'intérêt. Pour ce faire, le potentiostat va automatiquement adapter le potentiel de la contre-électrode pour que la réduction ou l'oxydation du fluorogène génère un courant opposé et de même intensité que celui traversant l'électrode de travail. On voit donc que si l'espèce d'intérêt est oxydable le fluorogène choisit doit être réductible, et vice versa. Afin de détecter, et de quantifier la réaction fluorogénique, sous la forme d'un signal de fluorescence, un microscope à épifluorescence est focalisé sur la surface de la contre-électrode.

La première condition pour réaliser la conversion courant-fluorescence est l'identification d'une espèce fluorogénique appropriée. Pour réaliser la preuve de principe de cette conversion, nous avons choisi la résazurine (RZ) molécule fluorogénique populaire [5], [10]. Il nous faut donc à présent présenter cette molécule et ses propriétés electro-fluorogéniques.

3. Electrochimie et fluorescence de la résazurine, fluorogène modèle

La résazurine (de son nom chimique la 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) est réductible irréversiblement en résorufine (RF) dans un processus complexe incluant le transfert de deux électrons, deux protons et la rupture d'une liaison N-O comme illustré dans le Schéma IV.1.

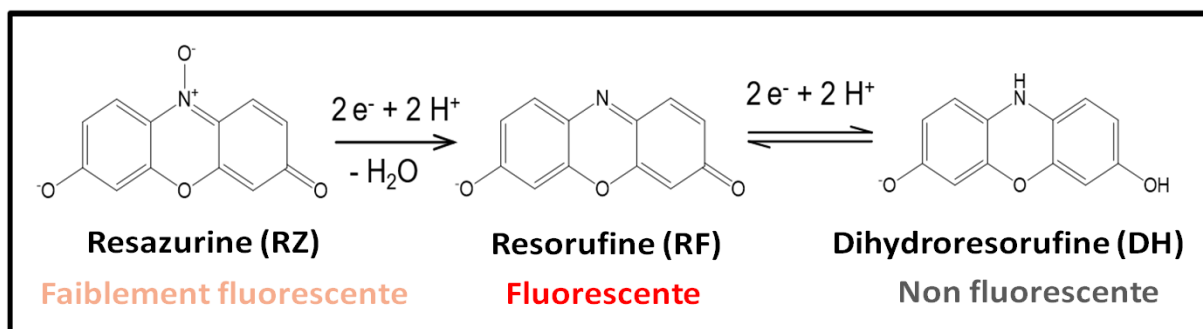


Schéma IV.1. Schéma global de la réduction fluorogénique de la résazurine en résorufine puis en dihydrorésorufine, à pH = 10.

RF est réversiblement réductible à son tour en dihydrorésorufine (DH), via le transfert de deux électrons et deux protons [11], [12]. La résazurine est une molécule dont la fluorescence est principalement modulée par l'état redox. La fluorescence de RZ, RF et DH diffère en effet

nettement : RZ est peu fluorescente, RF est fortement fluorescente et DH est à l'opposé non-fluorescente [13], [14]. De ce fait, l'électrochimie RZ/DH a été utilisée comme l'outil de base des systèmes spectro-électrochimiques visant à coupler le transfert d'électrons à la génération de fluorescence [5], [6], [10], [15]. Dans notre cas nous chercherons, via notre schéma de conversion, à coupler la réduction fluorogène de la résazurine avec l'oxydation d'une espèce d'intérêt. Mais, pour atteindre ce but, il nous a semblé nécessaire d'approfondir au préalable les connaissances mécanistiques sur la réduction de la résazurine disponibles dans la littérature à l'heure actuelle. Nous avons par conséquent réalisé des études en voltammétrie cyclique de la réduction de la résazurine, couplée à la détection simultanée de la fluorescence émise à l'électrode de travail.

4. Analyse mécanistique de la réduction de la résazurine par voltamétrie et voltfluorométrie couplées

Pour ces expériences, l'électrode de travail, en platine ou on carbone, immergée dans une solution contenant RZ, est observée par microscope d'épifluorescence dans un montage potentiostatique à 3 électrodes classique (Figure IV.3).

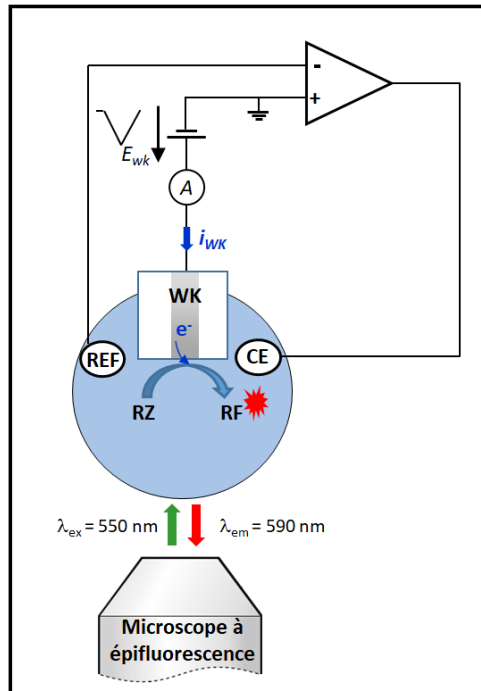


Figure IV.3. Configuration utilisée pour l'étude mécanistique de la réduction de la résazurine par voltammétrie cyclique et voltfluorométrie cyclique couplées. Les signaux de courant et de fluorescence sont tous deux enregistrés à l'électrode de travail. Excitation lumineuse de RF à une longueur d'onde $\lambda_{ex} = 550 \text{ nm}$ et signal de fluorescence détecté à $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$.

La surface de l'électrode est éclairée avec une lumière verte ($\lambda \sim 550$ nm), longueur d'onde correspondant à la bande d'absorption de la résorufine. Cette lumière est générée par une lampe halogène puis filtrée par un filtre d'excitation passe-bande autour des 550nm. L'image de la surface de l'électrode est collectée sous la forme d'un « film ». Un filtre d'émission passe-haut permet d'éliminer sur l'image collectée toute perturbation lumineuse de longueur d'onde inférieure à 570 nm dont la lumière d'excitation, tout en sauvegardant la lumière due à la fluorescence de la résorufine ($\lambda \sim 590$ nm). Il est à noter que la lumière générée par RF est dans la bande d'absorption de la résazurine, ce qui induit un effet de filtre interne diminuant l'amplitude du signal utile récolté et générant un signal de fond non utile. Heureusement, la fluorescence de la résazurine étant bien moins intense que celle de la résorufine, le signal utile récolté reste d'amplitude largement suffisante pour être détecté et analysé (voir Figure IV.4 et partie expérimentale, partie 4).

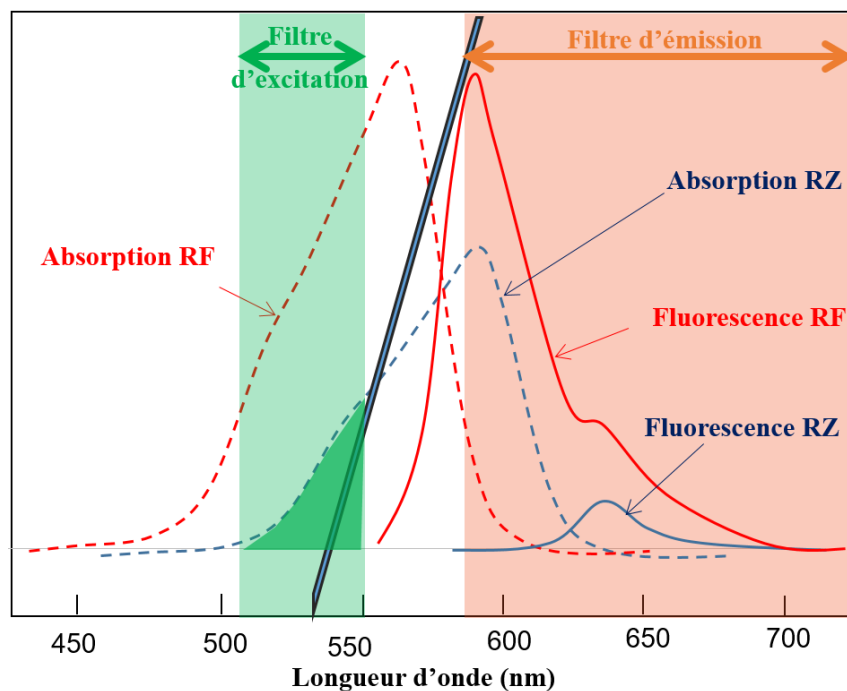


Figure IV.4. Schéma d'Epifluorescence utilisé avec représentation de l'absorption et de la fluorescence de la résazurine et de la résorufine.

Pour toutes les expériences rapportées dans ce chapitre, un tampon carbonate à 0.1 M pH = 10 a été utilisé comme électrolyte, puisque dans ces conditions de pH l'intensité de la fluorescence émise par la résorufine est maximale [10], [16]. La concentration en RZ utilisée est typiquement de 1 mM. L'oxygène est exclu de la solution de résazurine par un bullage à l'argon préalable à l'expérience. Un faible flux d'argon est maintenu en surface de la solution pendant l'enregistrement des données.

Le potentiel de l'électrode est balayé cathodiquement, jusqu'à une valeur suffisamment négative pour provoquer les réductions de la résazurine et de la résorufine, puis ramené à sa valeur initiale. Durant ce balayage, sont enregistrés simultanément le courant traversant l'électrode de travail et l'image de sa surface. L'intensité de fluorescence provenant d'une partie paramétrable de l'image, dite « région d'intérêt », pouvant par exemple correspondre à toute la surface de l'électrode, ou seulement à son centre, est collectée en temps réel. Le courant mesuré par le potentiostat et la fluorescence mesurée par la caméra sont enregistrés simultanément. Chaque échantillon de mesure correspond à une valeur instantanée du courant mesuré couplé à une valeur moyenne instantanée de la fluorescence, calculée sur l'ensemble des pixels formant la « région d'intérêt », en fonction du potentiel appliqué à l'électrode. On obtient ainsi des voltammogrammes (CV) et « voltfluorogrammes » (CVF), tels que ceux représentés respectivement en Figure IV.5A et Figure IV.5B. Pour pouvoir comparer visuellement plus facilement les signaux de courant et de fluorescence, la polarité des courants cathodiques générés par les espèces fluorogéniques a été inversée.

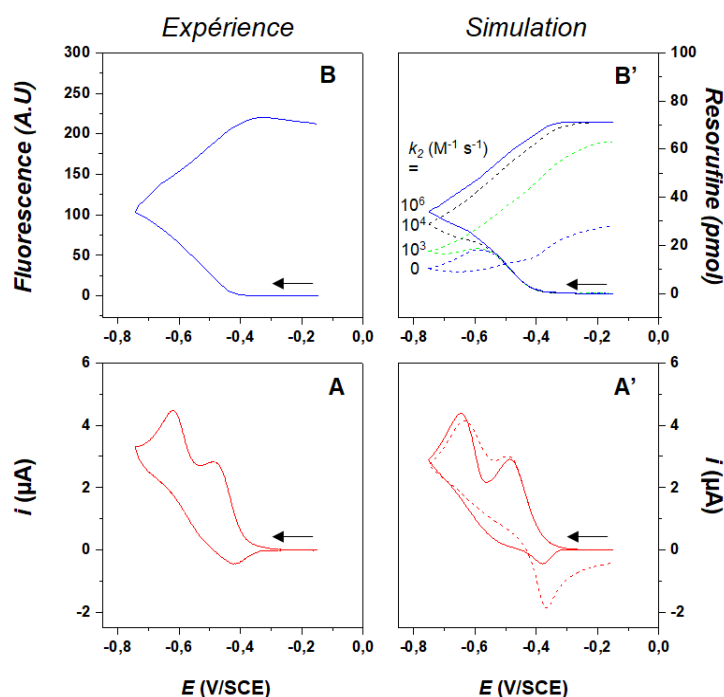


Figure IV.5. (A) voltammogramme cyclique (CV) expérimental d'1 mM de résazurine à une électrode de travail en platine de 1 mm de diamètre, (B) voltfluorogramme (CVF) enregistré simultanément. Conditions : Electrolyte support 0.1 M buffer carbonate pH = 10, vitesse de balayage 100 mVs⁻¹. (A') CV simulé et (B') quantité molaire de résorufine présente dans la couche de diffusion (N_{RF}), calculée avec DigiElch pour différentes valeurs de la constante de vitesse de comproportionation k_2 , comme indiqué. La polarité des courants a été inversée.

Ces signaux, ont été enregistrés à une électrode à disque de platine de 1mm de diamètre. Le potentiel de l'électrode a été scanné de -0.15 à -0.75 V/SCE avec une vitesse de balayage de 100 mV/s.

Le CV en Figure IV.5A présente deux pics cathodiques, situés respectivement vers -0.49 V/SCE et -0.62 V/SCE, et un pic anodique moins intense vers -0.42 V/SCE. Comme rapporté dans la littérature, le premier pic est assigné à la réduction de RZ en RF le second à la réduction de RF en DH, et le pic anodique assigné à l'oxydation de DH en RF [5], [10]–[12].

En examinant le CVF correspondant (affichée en unités arbitraires (AU)), représenté en Figure IV.5B, on remarque que l'apparition de la fluorescence commence vers -0.4 V/SCE, ce qui est concomitant avec le début de la réduction de RZ en l'espèce fortement fluorescente RF. Lorsque l'électrode est scannée plus cathodiquement, on observe que l'amplitude du signal de fluorescence augmente continuellement, même lorsque le potentiel arrive à la région où l'espèce RF est consommée au voisinage de l'électrode, et convertie en DH non fluorescente. Cette apparente contradiction met en réalité en évidence une réaction de comproportionation, correspondant à la réduction de RZ par DH pour former RF, les deux espèces coexistant alors dans la couche de diffusion, au voisinage de l'électrode. De ce fait, l'espèce fluorescente RF *est produite tout le long du balayage en potentiel*. L'occurrence de cette réaction de comproportionation a été récemment mise en évidence par une étude de fluorescence en microscopie confocale [16].

Dans le but de mieux comprendre la relation entre génération de courant et de fluorescence, nous proposons de modéliser la réduction de la résazurine à l'électrode (à pH = 10), par la séquence de réactions suivante (Schéma IV.2).

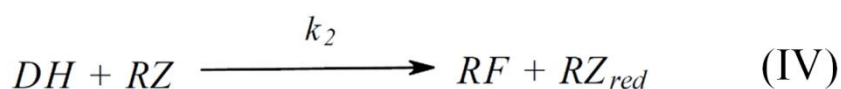
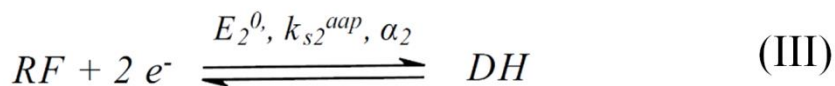
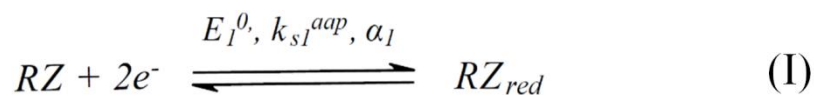


Schéma IV.2. Séquence de réactions décrivant l'électroréduction de la résazurine, et de la molécule ainsi produite, la résorufine à une électrode.

La réduction de RZ à l'électrode est modélisée par une réaction de transfert directe de deux électrons, caractérisée par un potentiel standard E_1^0 , une constante de vitesse de transfert hétérogène d'électrons k_{s1}^{ap} et un coefficient de transfert de charge α_1 , réaction (I).

Une étape chimique, caractérisée par une constante de premier ordre k_1 , et correspondant à la rupture de la liaison N-O de l'espèce intermédiaire RZ_{red} (espèce formelle « résazurine réduite ») est ensuite supposée produire RF par rupture liaison, Réaction (II).

Il est possible que la réduction de RZ à l'électrode, et la production de RF, constituent en réalité une seule et même réaction, dite concertée [17], plutôt que d'avoir lieu ainsi en étapes successives. Cependant la modélisation des ces réactions comme des processus séquentiels est préférée ici car plus simple. Comme nous le verrons plus loin, elle permet de rendre compte des données expérimentales de façon satisfaisante.

La réduction de la résorufine, se produisant au niveau de la seconde vague du CV, est aussi modélisée par le transfert de deux électrons, caractérisé par les paramètres E_2^0 , k_{s2}^{ap} , α_2 , Réaction (III). Il s'agit d'une simplification délibérée, car le transfert de deux électrons et deux protons ne correspond exactement au transfert direct de deux électrons que dans des conditions cinétiques bien précises [18]–[21]. Cependant, en l'absence de données cinétiques complètes décrivant la réduction de RF, cette simplification est requise.

Pour finir, la réaction de comproportionation, thermodynamiquement favorable entre RZ et DH [16], produisant RF et RZ_{red} , est décrite par la réaction irréversible (IV), et caractérisée par la constante de second ordre k_2 .

Armés du mécanisme proposé ci-dessus, nous pouvons maintenant simuler les CV et CVF de la résazurine, grâce au logiciel DigiElch version professionnelle V7. Nous avons admis que toutes les formes de résazurine ont le même coefficient de diffusion que celui de la résorufine en un milieu aqueux ($4.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) [22]. Cette simulation requière que tous les paramètres du schéma cinétique ci-dessus soient quantitativement connus, ou, à défaut requière que des simplifications supplémentaires soient faites. Les paramètres les plus facilement accessibles sont ceux liés à la réduction de la résorufine, puisque sa réponse en voltammétrie peut être enregistrée dans une expérience séparée. L'analyse du voltammogramme de RF, réalisé comme détaillé en partie 1 de l'annexe de ce chapitre, nous a permis d'obtenir les valeurs suivantes : $E_2^0 = -0.465 \text{ V/SCE}$, $k_{s2}^{ap} = 6.8 \cdot 10^5 \text{ cm/s}$, $\alpha_2 = 0.35$. La faible valeur obtenue pour k_{s2}^{ap} , et une valeur de α_2 significativement différente de 0.5, sont toutes les deux typiques

d'une réaction de transfert d'électrons e^-/H^+ à une électrode [18]–[21]. En effet, en raison de la protonation rapide des espèces produites par l'étape de transfert d'électron individuel, les réactions e^-/H^+ dans l'eau sont typiquement caractérisées par des constantes de vitesses de transfert d'électrons hétérogène très faibles [21]. Cela s'applique également à la réaction directe à deux électrons $RZ \rightarrow RZ_{red}$, réaction (I), laquelle peut sans risque de se tromper être considérée comme lente par rapport à la réaction de rupture de liaison (II). Dans cette situation, la réaction de transfert d'électrons est cinétiquement déterminante, et aucune information concernant la valeur de k_I ne peut être obtenue à partir de l'analyse du voltammogramme [23].

La première vague de réduction de RZ correspond donc simplement à une vague irréversible de transfert de deux électrons, de laquelle seul le paramètre α_I peut être immédiatement obtenu. Il suffit pour cela de mesurer la demi-largeur de la vague, théoriquement donnée par $29.6/\alpha_I$. Nous trouvons ainsi $\alpha_I = 0.39$. À noter que cette valeur est proche de celle obtenue pour α_2 . A ce stade, les seuls paramètres encore non déterminés sont E_1^0 , k_{s1}^{aap} et k_2 . En considérant la nature similaire des réactions de transfert e^-/H^+ (I) et (III), il semble raisonnable de considérer que les valeurs de k_{s2}^{aap} et k_{s1}^{aap} sont de même ordre de magnitude. Pour simplifier, nous avons décidé de considérer $k_{s1}^{aap} = k_{s2}^{aap}$. Ensuite, nous avons vérifié que, comme attendu, avec une valeur aussi faible de k_{s1}^{aap} , les CV simulés ne dépendaient pas de la valeur assignée à k_I tant que $k_I \geq 10 \text{ s}^{-1}$ (voir Annexe du chapitre, partie 2).

Nous avons ensuite pu lancer des simulations avec pour seuls paramètres ajustables k_2 et E_1^0 , en essayant de reproduire le signal représenté en Figure IV.5A. En faisant cela, nous avons observé que la première vague de réduction du voltammogramme simulé était insensible à la valeur assignée à k_2 . On peut le constater en Figure IV.5A', où les voltammogrammes simulés pour des valeurs extrêmes de k_2 ($k_2 = 0$, courbe en pointillés, et $k_2 = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, courbe continue) sont comparés. Ce résultat est en accord avec le fait, très documenté, que dans le cas plus simple de réaction de transfert de deux électrons successifs (schémas EE), les réactions de comproportionation ont un faible effet sur les signaux de voltammétrie [24]–[26]. La seconde vague cathodique dépend elle aussi très peu de la valeur de k_2 . Il n'est donc pas possible d'obtenir de valeur précise pour k_2 en analysant la vague cathodique du voltammogramme expérimental. A l'opposé, nous avons observé sur les simulations que le potentiel de pic de la première vague dépend fortement de la valeur

affectée à E_1^0 . Les simulations montrent que la valeur de potentiel de pic expérimentalement obtenue correspond à $E_1^0 = -0.33$ V/SCE.

Dans le but de déterminer la dernière valeur manquante, celle de k_2 , nous nous sommes tournés vers l'analyse du voltfluorogramme. Evidemment, contrairement au signal en courant, on s'attend à ce que le signal de fluorescence dépende fortement de la réaction de comproportionation, puisque cette réaction génère RF à partir des espèces non fluorescentes ou faiblement fluorescente DH et RZ. Afin d'évaluer théoriquement cette dépendance, la quantité molaire de l'espèce RF présente dans la couche de diffusion, N_{rf} , a été extraite de la simulation, pour tout potentiel E , et pour plusieurs valeurs de k_2 . La courbe N_{rf} vs. E , illustrée en Figure IV.5B' peut être considérée comme équivalente aux voltfluorogrammes. On peut voir que lors du balayage cathodique du potentiel, N_{rf} (et donc le signal de fluorescence) augmente au niveau de la première vague cathodique, quel que soit la valeur de k_2 . Mais on observe aussi qu'en l'absence de comproportionation ($k_2 = 0$), N_{rf} diminue au niveau des potentiels correspondants à la seconde vague du voltammogramme, c.-à-d. quand RF est consommée pour produire DH.

Le simple fait qu'une telle diminution de la fluorescence n'ait pas été observée sur nos voltfluorogrammes expérimentaux indique que la réaction de comproportionation (IV) se produit à une vitesse significative. On voit en Figure IV.5B que le signal expérimental augmente même continuellement durant le balayage, ce qui, comme on peut le déduire de la Figure VI.5B', implique une valeur de k_2 supérieure à 10^3 M⁻¹ s⁻¹. En fait, reproduire la forme du voltfluorogramme expérimental requiert d'employer une valeur minimale de $k_2 \sim 10^5$ M⁻¹ s⁻¹ en simulation (comparer la Figure IV.5B et la Figure IV.5B'). Déterminer une valeur plus précise pour k_2 est difficile puisque la forme de la variation simulée N_{rf} vs. E change très peu pour des valeurs de k_2 supérieures à 10^5 M⁻¹ s⁻¹. Cette valeur constitue donc une limite inférieure pour la constante de vitesse de la réaction de comproportionation entre DH et RZ. Nous avons aussi vérifié qu'en définissant des valeurs supérieures à 10^5 M⁻¹ s⁻¹ pour k_2 , un bon accord entre les CV expérimentaux et théoriques peut être obtenu (comparer la Figure IV.5A et la Figure IV.5A'). Ces derniers résultats démontrent que la réaction de comproportionation (IV) peut légitimement être considérée comme infiniment rapide, confirmant ce qui n'était jusqu'à présent qu'une supposition [16]. Globalement, la génération de courant et l'émission de fluorescence sont donc cinétiquement corrélées par la réaction de transfert d'électrons de RZ et RF à une électrode. Par conséquent, à ce stade de notre travail,

l'analyse des signaux de CV et CVF de RZ, enregistrés simultanément à une électrode millimétrique, nous a permis de proposer un mécanisme simple, et d'obtenir les valeurs des constantes thermodynamiques et cinétiques requises pour reproduire quantitativement les signaux expérimentaux de voltammétrie et voltfluorométrie. La détermination de ces paramètres est fondamentale pour la mise au point de notre dispositif de conversion de courant en fluorescence car, quel que soit la configuration retenue au final, elle va nous permettre de comprendre et de modéliser quantitativement la corrélation entre génération de courant et de fluorescence.

Dans cette optique, il est important de remarquer que les signaux enregistrés à une électrode millimétrique, en courant d'une part, et en fluorescence d'autre part, *ne sont pas du tout corrélés en forme*. Tel n'est pas non plus le cas pour la dérivée de la fluorescence et le courant (voir Annexe du chapitre, partie 2).

Cette non-corrélation de forme provient du fait que le transport de masse à une électrode millimétrique est contrôlé par la diffusion transitoire planaire, qui induit une accumulation de RF à proximité de l'électrode. Par conséquent, il peut être conclu que l'électrochimie d'un fluorogène à une électrode millimétrique ne peut pas être la base du système de conversion courant/fluorescence que nous voulons développer ici. Pour qu'une telle conversion soit possible il faut en effet que le signal de fluorescence suive de manière conforme le signal en courant. Nous nous sommes donc tournés vers la voltammétrie à une *microélectrode*, qui implique un régime diffusionnel distinct de celui à une électrode millimétrique. En effet à une microélectrode, c-à-d. une électrode d'une taille caractéristique inférieure à $\sim 100 \mu\text{m}$ un régime de diffusion stationnaire, c'est à dire ne dépendant plus du temps (de la vitesse de balayage), prévaut.

5. Voltammétrie et voltfluormétrie stationnaire de la résazurine à une ultramicroélectrode

Les voltammogramme et voltfluorogramme cycliques de la résazurine simultanément enregistrés à une ultramicroélectrode (UME) de platine de $25\mu\text{m}$ de diamètre sont présentés en Figure IV.6.

Le signal de voltammétrie (Figure IV.6A) présente deux vagues cathodiques de forme sigmoïdale. La première vague est attribuable à la réduction de RZ en RF et la seconde à la réduction de RF en DH. On remarque que, de façon notable, le signal de voltfluorométrie,

montré en Figure IV.6B, présente également deux vagues correspondant de près en forme et en potentiel aux vagues du CV. Cette remarquable correspondance peut être mieux visualisée en traçant le signal de fluorescence en fonction du courant, comme montré en Figure IV.7A.

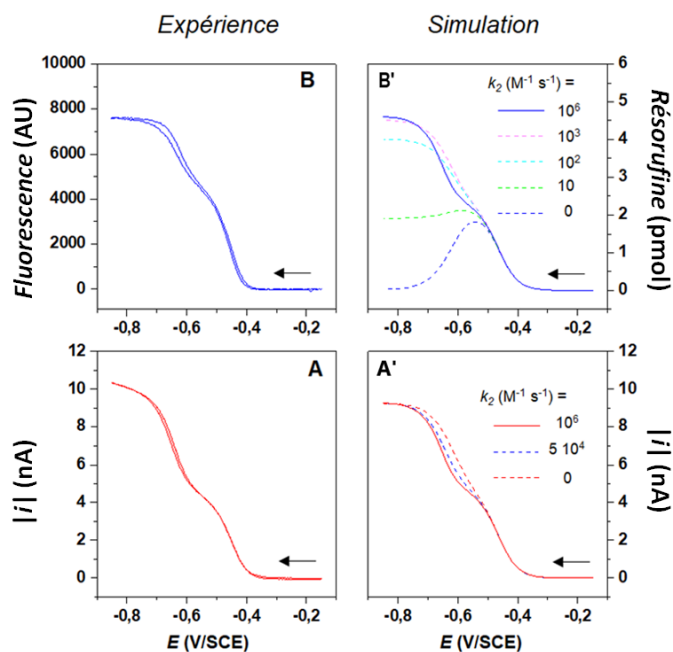


Figure IV.6. (A) CV expérimental d'1 mM de résazurine à une UME de platine de 25 μ m de diamètre et (B) CVF enregistré simultanément. Conditions : 0.1 M tampon carbonate pH = 10, vitesse de balayage 10 mVs⁻¹. (A') CV stationnaire théorique et (B') quantité molaire de résorufine (N_{RF}) présente à proximité de l'électrode en fonction de E , calculée avec COMSOL pour différentes valeurs de la constante de vitesse de comproportionation k_2 , comme indiqué.

On peut observer que le signal de fluorescence *est presque exactement proportionnel au courant*, tout au moins jusqu'à des valeurs de courant de ~ 6 nA. En se référant à la Figure IV.6A, il apparaît que ce comportement linéaire correspond à des régions de potentiel de l'électrode englobant la première vague cathodique, et s'étendant même jusqu'au début de la deuxième vague de réduction du voltammogramme. Pour des valeurs de courant > 6 nA, la variation de la fluorescence avec le courant cesse d'être linéaire. Ceci peut être expliqué par le fait que, dans la région de potentiel très cathodique correspondante, un courant résiduel, non attribuable à l'électrochimie de RZ est détecté. Ce courant donne un aspect « penché » au plateau du CV en Figure IV.6A (voir aussi Figure AIV.1A en annexe du chapitre). Il peut être dû à la réduction des protons ou de l'oxygène résiduel.

Nous avons ensuite tenté de reproduire théoriquement le comportement électrochimique de RZ et l'émission de fluorescence associée, enregistrés à une UME, par simulation. Pour cela, nous avons implémenté le mécanisme de réduction de RZ décrit en Schéma VI.2 sous le

logiciel COMSOL Multiphysics 4.4. Nous avons calculé à la fois les voltammogrammes stationnaires théoriques à une électrode de $25\mu\text{m}$ de diamètre, et la quantité totale de résorufine, N_{RF} , présente à proximité de l'électrode (dans un domaine hémisphérique de $250\mu\text{m}$ de rayon depuis la surface de l'électrode). Pour ces simulations, nous avons utilisé l'ensemble des paramètres cinétiques obtenus ci-dessus par voltammétrie cyclique transitoire et étude mécanistique. Cela nous a permis de reproduire de façon très satisfaisante à la fois les signaux de voltammétrie et de voltfluorométrie enregistrés à une UME, sans aucun paramètre ajustable (Figure IV.6A', B'). Ce résultat valide davantage encore notre modèle cinétique de la réduction de RZ.

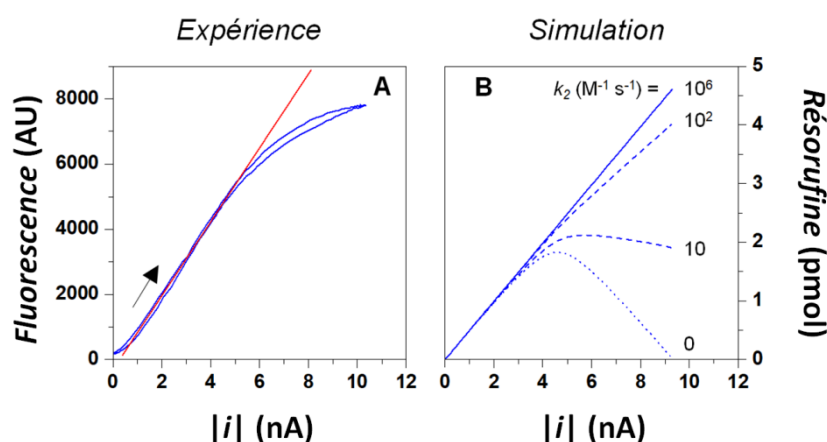


Figure IV.7. (A) Intensité de fluorescence enregistrée à une UME de platine de $25\mu\text{m}$, où la réduction de la résazurine se produit, en fonction du courant de l'UME, i , (les CV et CVF correspondants sont présentés en Figure IV.6). (B) Simulation de la dépendance en fonction du courant de l'UME, de la quantité molaire (N_{RF}) de résorufine présente à proximité de l'électrode, calculée pour différentes valeurs de la constante de vitesse de comproportionation k_2 .

Nous avons aussi utilisé les simulations sous COMSOL pour étudier la façon dont les signaux en courant et en fluorescence (et leur corrélation) dépendait de la vitesse de la réaction de comproportionation, qui est la clé de l'entretien de la génération de fluorescence. On peut observer en Figure IV.6A' que la première vague des CV simulés est, comme prévu, largement insensible à la vitesse de la réaction de comproportionation. En revanche, concernant les CVF simulés, Figure IV.6B', on peut voir qu'en l'absence de comproportionation ($k_2 = 0$), une extinction totale de la fluorescence est prévue au niveau de la seconde vague cathodique (réduction de RF en DH). Il apparaît cependant que même une réaction de comproportionation lente ($k_2 = 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) est suffisante pour empêcher la fluorescence de s'éteindre durant le balayage du potentiel. En fait, une valeur de $k_2 = 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ est suffisante pour permettre à l'intensité de fluorescence d'être proche de sa valeur maximale, atteinte pour une réaction de comproportionation très rapide ($k_2 = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ces

données nous ont également permis de construire des tracés simulés du courant en fonction de la fluorescence, pour plusieurs valeurs de k_2 . Comme on le voit en Figure IV.7B, dans la gamme de courants correspondants à la première vague de réduction (en dessous de 4 nA ici), la proportionnalité entre le courant et la quantité de RF présente à proximité de l'électrode (i.e. l'intensité de fluorescence) est toujours vérifiée, indépendamment de la vitesse de comproportionation. Pour des courants plus intenses, i.e. dans la gamme de potentiel où la réduction de RF se produit ($i > 4$ nA), cette linéarité n'est vérifiée qu'à condition que $k_2 > 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Une telle condition est évidemment vérifiée ici, puisque nous avons déterminé au paravent que $k_2 > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Par conséquent, nous avons théoriquement justifié par simulation notre observation expérimentale qui montre que la fluorescence générée à une ultramicroélectrode ou la réduction de RZ se produit *est proportionnelle au courant*.

Cette proportionnalité est évidemment le fruit du régime de diffusion sphérique stationnaire propre aux UMEs, qui empêche l'accumulation de l'espèce électrogénérée RF à proximité de la surface de l'électrode. Lors des expériences, on a remarqué que la convection générée par le flux d'argon au-dessus de la solution pendant la mesure participe à l'obtention de cette linéarité et que sans elle une hystérèse inverse apparaît sur le signal de fluorescence, ce phénomène est discuté plus en détail dans le chapitre suivant. Dans la littérature, une corrélation directe, quoi qu'imparfaite, entre courant de réduction de la résazurine et émission de fluorescence par la résorufine, a déjà été rapportée. Celle-ci a été obtenue par ajout en solution de glucose qui consomme chimiquement RF, empêchant là aussi son accumulation. Cependant cette réaction impose un milieu extrêmement basique consistant en 0.5 M NaOH [6]. Nous démontrons ici que la diffusion sphérique à une UME assistée par une légère convection, est suffisante pour offrir une *proportionnalité quasi parfaite* entre le courant et la fluorescence d'une façon bien plus simple et généralisable.

L'apport principal de l'étude présentée ci-dessus est de nous avoir permis d'identifier un système idéal, permettant la transduction d'une réaction électrochimique en un signal de fluorescence conforme, un prérequis indispensable pour le développement de notre dispositif de conversion courant-fluorescence.

6. Conversion d'un courant faradique généré à une électrode sous contrôle potentiostatique en émission de fluorescence – preuve de principe

Le schéma de conversion courant/fluorescence que nous proposons repose, comme nous l'avons déjà expliqué, sur l'occurrence d'une réaction électrochimique fluorogénique à la contre-électrode d'un montage à trois électrodes. De plus, il est nécessaire que la fluorescence ainsi générée transcrive de façon fidèle le courant traversant le système, qui traduit la cinétique de la réaction électrochimique d'intérêt à l'électrode de travail. L'étude ci-dessus suggère que la réduction de la résazurine à une UME constitue a priori une telle (contre)-réaction idéale. Dans le but d'établir la preuve de concept de ce schéma simple et original, nous avons utilisé une cellule électrochimique comprenant deux compartiments séparés, comme discuté au précédemment dans le chapitre. Celle-ci est reproduite à nouveau, de façon plus détaillée ci-dessous :

Pour nos expériences de validation, l'oxydation du ferrocenediméthanol ($\text{Fc}(\text{diOH})$) à une microélectrode de carbone de $25\ \mu\text{m}$ a été choisie comme réaction électrochimique d'intérêt, et couplée à la réduction de la résazurine à la contre-électrode, qui est une UME de $25\ \mu\text{m}$ en platine (Figure IV.8).

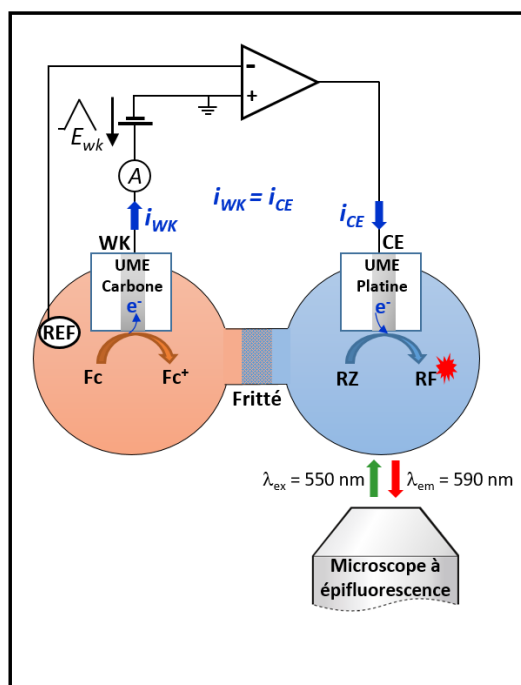


Figure IV.8. Montage permettant la conversion d'un courant faradique en un signal de fluorescence. L'oxydation de $\text{Fc}(\text{diOH})$ à une électrode de travail sous contrôle potentiostatique, est couplée à une émission de fluorescence due à la réduction de RZ à la contre-électrode. (WK carbone $25\ \mu\text{m}$ de diamètre, CE platine $25\ \mu\text{m}$ de diamètre).

Le ferrocenedimethanol, à 1 mM dans une solution aqueuse de NaClO_4 0,1 M, est introduit dans le compartiment de l'électrode de travail. La solution de résazurine (0,5 mM dans le tampon carbonate pH = 10), remplit le compartiment de la contre-électrode. L'oxygène en est chassé par bullage à l'argon entre chaque mesure, et maintien du flux d'argon en surface pendant. Le microscope à épifluorescence est focalisé sur la surface *de la contre-électrode*. Celle-ci est illuminée par une lumière d'excitation verte à 550 nm et la fluorescence de la résorufine à 590 nm est collectée comme décrit dans la « partie expérimentale » du manuscrit.

Le potentiel de l'électrode de travail est balayé anodiquement à 10 mV/s, pour provoquer l'oxydation du FcdiOH. Le courant à l'électrode de travail est enregistré simultanément avec l'émission de fluorescence à la contre-électrode.

En traçant le courant de l'électrode de travail en fonction de son potentiel E , le voltammogramme de forme sigmoïdale, typique de l'électrochimie du FcdiOH à une microélectrode, est obtenu (Figure IV.9A) [27]. Remarquablement, le voltfluorogramme obtenu en traçant l'intensité de fluorescence enregistrée à la contre-électrode en fonction du potentiel E , est *très similaire en forme* avec le voltammogramme enregistré à l'électrode de travail (Figure IV.9B).

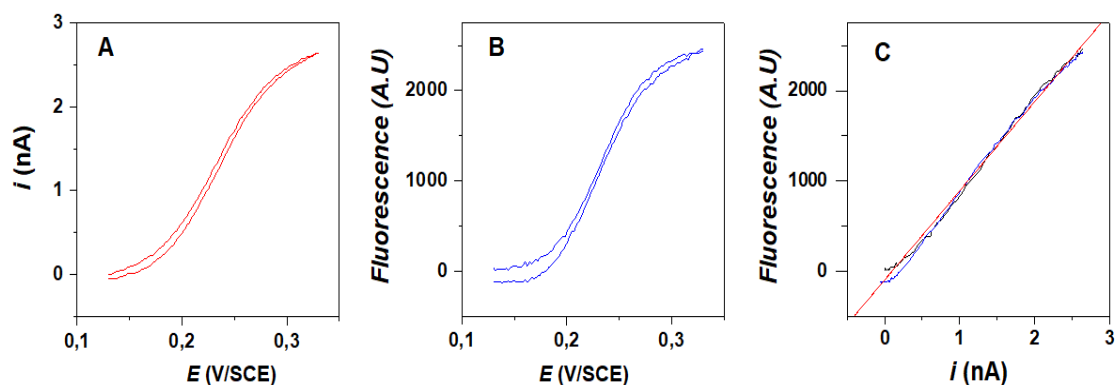


Figure IV.9. Preuve de principe de la conversion d'un courant faradique en un signal de fluorescence. L'oxydation du ferrocenedimethanol (FcdiOH) à une électrode sous contrôle potentiostatique, est couplée à l'émission de fluorescence résultant de la réduction de la résazurine. (A) Voltammogramme de FcdiOH à l'UME électrode de travail de 25 μm de diamètre en carbone vitreux. (B) Signal de fluorescence enregistré simultanément à l'UME contre-électrode de 25 μm de diamètre en platine. (C) Intensité du signal de fluorescence en fonction du courant de l'électrode de travail. Les compartiments de l'électrode de travail et de la contre-électrode contiennent respectivement 1 mM de FcdiOH dans une solution aqueuse de NaClO_4 0,1 M, et 0,5 mM de résazurine dans un tampon carbonate 0,1 M pH = 10. Vitesse de balayage 10 mVs^{-1} .

De fait, la similarité entre ces deux signaux peut être mieux appréhendée en traçant l'intensité de fluorescence enregistrée à la contre-électrode en fonction du courant enregistré à

l'électrode de travail. On peut voir en Figure IV.9C que le tracé obtenu est quasi linéaire. Cela montre que nous sommes parvenus à réaliser la configuration souhaitée, pour laquelle l'émission de fluorescence à la contre-électrode suit parfaitement le courant de l'électrode de travail.

Sur la base du système modèle FcdiOH/RZ, nous avons donc démontré comment une réaction électrochimique d'une espèce non fluorescente (non fluorogène) se produisant à une électrode sous contrôle potentiostatique peut être quantitativement couplée à une émission de fluorescence.

Ce nouveau schéma de transduction d'une réaction électrochimique à une électrode vers une émission de fluorescence, ouvre la voie à l'amplification de signaux électrochimiques de basse intensité via une détection optique hautement sensible.

Pour compléter la caractérisation de notre système de conversion, nous avons reproduit l'expérience décrite en Figure IV.9, mais cette fois-ci au lieu de balayer le potentiel de l'électrode de travail, nous l'avons incrémenté par petites valeurs discrètes. Les mesures de courant et de fluorescence sont faites 30 secondes après l'application d'une valeur de potentiel, pour s'assurer qu'un régime de diffusion stationnaire a été atteint à l'électrode de travail et à la contre-électrode. Le courant à l'électrode de travail et la fluorescence à la contre-électrode ainsi enregistrés et leur corrélation sont représentés en Figure IV.10.

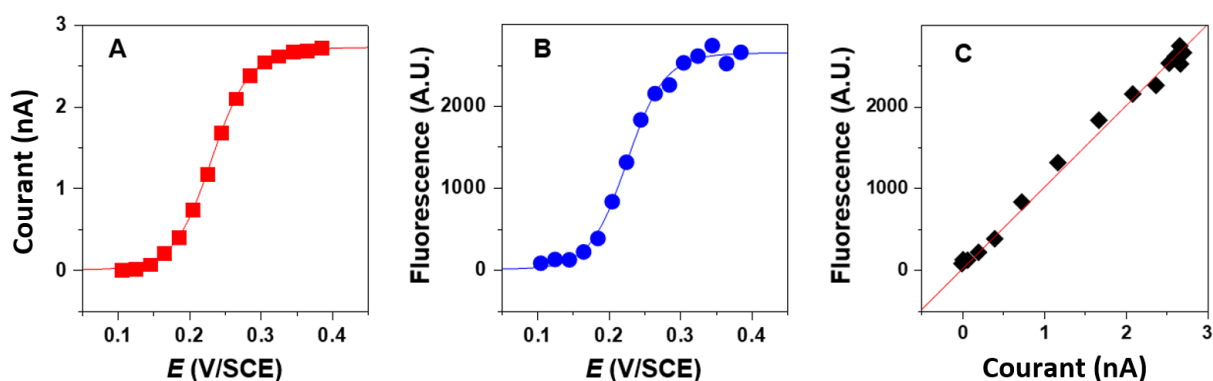


Figure IV.10. Couplage du courant d'oxydation du FcdiOH à l'électrode de travail, avec l'émission de fluorescence produite par la réduction de la résazurine à la contre-électrode, par notre système de couplage courant/fluorescence. (A) Courant mesuré à l'ultramicroélectrode de travail en carbone vitreux de 25 μ m de diamètre. (B) Signal de fluorescence en fonction du potentiel de l'électrode de travail, E , simultanément enregistré à la contre-ultramicroélectrode en platine de 25 μ m de diamètre. (C) Intensité du signal de fluorescence en fonction du courant de l'électrode de travail. Les compartiments de l'électrode de travail et de la contre-électrode contiennent respectivement : 1mM FcdiOH dans 0.1M NaClO_4 électrolyte, et 0.5mM de résazurine dans 0.1M de buffer carbonate pH 10. Les lignes dans (A) et (B) sont des guides. La ligne dans (C) est un ajustement régressif linéaire des données.

Les voltammogrammes et voltfluorogrammes reconstitués sont très similaires à ceux de la Figure IV.9. Ce résultat affirme que la vitesse de balayage de 10mV/s, utilisée dans la première expérience de couplage, permet un régime de diffusion quasi-stationnaire aux ultramicroélectrodes contre et de travail.

7. Caractéristiques de la réponse du montage convertisseur courant fluorescence : améliorations, sensibilité, et temps de réponse

Quelques caractéristiques importantes, limitations, et avantages, du dispositif de conversion courant faradique vers fluorescence que nous avons mis au point sont examinées ci-dessous.

Le système que nous avons conçu ici pourrait être rendu plus versatile s'il permettait que les courants anodiques et cathodiques se traduisent par des émissions de fluorescence de longueurs d'ondes différentes. Il faudrait pour cela identifier dans la littérature une molécule fluorogénique oxydable et une autre réductible, capables de fluorescer à des longueurs d'ondes distinctes l'une de l'autre. Ces deux molécules seraient présentes conjointement dans le compartiment de la contre-électrode.

La limite en sensibilité de notre système de conversion courant-fluorescence mérite aussi d'être discutée. Le courant qui doit être traduit en signal de fluorescence doit être tel que le potentiel de la contre-électrode soit maintenu dans la gamme -0.4 à -0.6 V/SCE, où le courant et l'intensité de fluorescence sont idéalement proportionnels. Cela requiert l'adaptation du diamètre de l'UME contre-électrode, a_{CE} , et de la concentration en résazurine, C_{RZ} , pour que l'intensité du courant devant être mesuré soit tel que : $i \leq 8FDa_{CE}C_{RZ}$, avec D le coefficient de diffusion de l'espèce fluorogénique. Cette condition définit *une limite maximale* au courant pouvant être traduit (mesuré) par émission de fluorescence pour un ensemble donné de valeurs de a_{CE} et C_{RZ} . Cette contrainte peut être vue comme équivalente à la nécessité d'ajuster le "gain" d'un ampèremètre en fonction du courant maximal devant être mesuré.

Pour notre dispositif, on s'attend à ce que *l'intensité minimale mesurable* soit limitée d'un côté par l'efficacité de la collecte des photons émis, et de l'autre par la sensibilité de la caméra. La limite de détection de cette plateforme pourrait être améliorée par l'optimisation de notre schéma de détection d'épifluorescence afin de réduire le fond lumineux hors plan focal et également de corriger les effets de filtres internes inhérent à ce genre de microscopie à large bande (voir partie expérimentale du manuscrit).

Bien évidemment, la mesure de courants plus faibles que ceux rapportés ici nécessitera l'utilisation d'UMEs contre-électrodes d'un diamètre plus petit, et/ou une concentration en RZ plus faible, que celles employée ici. Ces deux paramètres devront être ajustés afin que le passage du faible courant à mesurer impose au potentiostat d'appliquer à la contre-électrode un potentiel suffisamment négatif pour provoquer la réduction de RZ, c.-à-d. inférieur à -0.4 V/SCE.

La bande passante du système (réciproque de sa réponse temporelle) est dictée par la nécessité de maintenir le transport de masse à l'UME contre-électrode dans le régime de diffusion stationnaire. Le temps de réponse du système correspond au temps, t , que met RF pour quitter la couche de diffusion stationnaire située autour de l'UME contre-électrode. Elle est grossièrement estimée par $t = a_{CE}^2/D$. En conséquence, la taille de l'UME contre-électrode doit être adaptée à la bande passante souhaitée. Cette bande passante va dépendre du "gain", via la valeur de a_{CE} , de manière exactement opposée au cas d'un ampèremètre : large bande passante et mesure de courants faibles ne seront pas mutuellement exclusifs, mais au contraire seront l'un et l'autre réalisables avec des UME contre-électrodes de faible diamètre.

8. Conclusions

Tout d'abord, nous avons examiné, par voltammétrie cyclique et voltfluorométrie couplées, la réduction de la résazurine à une électrode millimétrique, et l'émission de fluorescence associée. Cette étude nous a permis de proposer un modèle cinétique « minimal » permettant de rendre compte quantitativement de la génération du courant électrochimique et des signaux de fluorescence expérimentaux. L'effet de la réaction de comproportionation sur le courant et la génération de fluorescence a été notablement mis en évidence et quantifié. Globalement, nous avons montré que l'émission de fluorescence est cinétiquement contrôlée par la (lenteur) de la réaction de transfert d'électrons de la résazurine et de la résorufine à l'électrode. Les paramètres cinétiques et thermodynamiques qui décrivent ces réactions ont été déterminés.

Ensuite, nous avons démontré expérimentalement, et confirmé par simulation, qu'à la condition que l'électrode de travail soit une ultramicroélectrode et en présence d'une faible convection, les signaux de fluorescence et de courant générés par la réduction de la résazurine sont rigoureusement proportionnels entre eux. Cette propriété non publiée à ce jour de l'électrochimie de la résazurine est le résultat du régime de diffusion sphérique stationnaire

qui peut être expérimentalement réalisé en utilisant des ultramicroélectrodes suffisamment petites.

Enfin, en exploitant cette propriété unique, et la capacité inhérente des potentiostats à coupler des réactions redox, nous avons démontré qu'une réaction d'oxydation se produisant à l'électrode de travail peut être couplée à la réduction de la résazurine à une contre-(ultramicro)-électrode, pour que le courant généré soit traduit en émission de fluorescence conforme. Il s'agit de la première démonstration de la transduction d'une réaction électrochimique d'une espèce non-fluorescente (ou fluorogène) à une électrode sous contrôle potentiostatique en un signal de fluorescence quantifiable. Nous sommes convaincus que grâce à l'extrême sensibilité de la détection de fluorescence, ce schéma de couplage original peut, à terme, permettre la détection optique d'événements individuels de transfert d'électrons (ou de courants faradiques extrêmement faibles) qui ne peuvent pas directement être mesurés électroniquement.

Références du chapitre

- [1] L. Bouffier and T. Doneux, “Coupling electrochemistry with in situ fluorescence (confocal) microscopy,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 6, no. 1, pp. 31–37, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.06.015>.
- [2] R. C. Engstrom, S. Ghaffari, and H. Qu, “Fluorescence Imaging of Electrode-Solution Interfacial Processes,” *Anal. Chem.*, vol. 64, pp. 2525–2529, 1992, doi: [10.1021/ac00045a012](https://doi.org/10.1021/ac00045a012).
- [3] S. Cannan, I. D. Macklam, and P. R. Unwin, “Three-dimensional imaging of proton gradients at microelectrode surfaces using confocal laser scanning microscopy,” *Electrochem. commun.*, vol. 4, no. 11, pp. 886–892, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(02\)00482-4](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(02)00482-4).
- [4] M. Yang, C. Batchelor-Mcauley, E. Kätelhön, and R. G. Compton, “Reaction Layer Imaging Using Fluorescence Electrochemical Microscopy,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 12, pp. 6870–6877, 2017, doi: [10.1021/acs.analchem.7b01360](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01360).
- [5] J. P. Guerrette, S. J. Percival, and B. Zhang, “Fluorescence coupling for direct imaging of electrocatalytic heterogeneity,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 2, pp. 855–861, 2013, doi: [10.1021/ja310401b](https://doi.org/10.1021/ja310401b).
- [6] S. M. Oja, J. P. Guerrette, M. R. David, and B. Zhang, “Fluorescence-Enabled Electrochemical Microscopy with Dihydroresorufin as a Fluorogenic Indicator,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 12, pp. 6040–6048, 2014, doi: [10.1021/ac501194j](https://doi.org/10.1021/ac501194j).
- [7] W. Xu, C. Ma, and P. W. Bohn, “Coupling of Independent Electrochemical Reactions and Fluorescence at Closed Bipolar Interdigitated Electrode Arrays,” *ChemElectroChem*, vol. 3, pp. 422–428, 2016, doi: [10.1002/celec.201500366](https://doi.org/10.1002/celec.201500366).
- [8] Y. Fan, R. Hao, C. Han, and B. Zhang, “Counting Single Redox Molecules in a Nanoscale Electrochemical Cell,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 23, pp. 13837–13841, 2018, doi: [10.1021/acs.analchem.8b04659](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04659).
- [9] J. T. Cox, J. P. Guerrette, and B. Zhang, “Steady-State Voltammetry of a Microelectrode in a Closed Bipolar Cell,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 20, pp. 8797–8804, 2012, doi: [10.1021/ac302219p](https://doi.org/10.1021/ac302219p).

- [10] T. Doneux, L. Bouffier, B. Goudeau, and S. Arbault, "Coupling Electrochemistry with Fluorescence Confocal Microscopy To Investigate Electrochemical Reactivity: A Case Study with the Resazurin-Resorufin Fluorogenic Couple," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 12, pp. 6292–6300, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b00477.
- [11] R. S. Twigg, "Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin," *Nature*, vol. 155, pp. 401–402, Mar. 1945, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/155401a0>.
- [12] S. Khazalpour and D. Nematollahi, "Electrochemical study of Alamar Blue (resazurin) in aqueous solutions and room-temperature ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate at a glassy carbon electrode," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 17, pp. 8431–8438, 2014, doi: 10.1039/C3RA45800H.
- [13] C. Bueno, M. L. Villegas, S. G. Bertolotti, C. M. Previtali, M. G. Neumann, and M. V Encinas, "The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction¶," *Photochem. Photobiol.*, vol. 76, no. 4, pp. 385–390, Oct. 2002, doi: 10.1562/0031-8655(2002)0760385TESIOR2.0.CO2.
- [14] G. V Porcal, C. M. Previtali, and S. G. Bertolotti, "Photophysics of the phenoxazine dyes resazurin and resorufin in direct and reverse micelles," *Dye. Pigment.*, vol. 80, no. 2, pp. 206–211, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2008.05.014>.
- [15] S. M. Oja and B. Zhang, "Imaging Transient Formation of Diffusion Layers with Fluorescence-Enabled Electrochemical Microscopy," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 24, pp. 12299–12307, 2014, doi: 10.1021/ac5035715.
- [16] A. de Poulpiquet *et al.*, "A snapshot of the electrochemical reaction layer by using 3 dimensionally resolved fluorescence mapping," *Chem. Sci.*, vol. 9, no. 32, pp. 6622–6628, 2018, doi: 10.1039/C8SC02011F.
- [17] C. Costentin, "Electrochemical approach to the mechanistic study of proton-coupled electron transfer," *Chem. Rev.*, vol. 108, pp. 2145–2179, 2008, doi: 10.1021/cr068065t.
- [18] E. Laviron, "Electrochemical reactions with protonations at equilibrium: Part VII. The 2 e, 1H⁺ reaction (six-member fence scheme) for a surface or for a heterogeneous reaction in the absence of disproportionation or dimerization," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 146, no. 1, pp. 1–13, 1983, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(83\)80109-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(83)80109-0).

- [19] E. Laviron, "Electrochemical reactions with protonations at equilibrium: Part VIII. The 2 e, 2H⁺ reaction (nine-member square scheme) for a surface or for a heterogeneous reaction in the absence of disproportionation and dimerization reactions," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 146, no. 1, pp. 15–36, 1983, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(83\)80110-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(83)80110-7).
- [20] E. Laviron, "Electrochemical reactions with protonations at equilibrium: Part X. The kinetics of the p-benzoquinone/hydroquinone couple on a platinum electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 164, no. 2, pp. 213–227, 1984, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(84\)80207-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(84)80207-7).
- [21] D. Marchal, W. Boireau, J. M. Laval, C. Bourdillon, and J. Moiroux, "Kinetics of redox conversion at a gold electrode of water-insoluble ubiquinone (UQ(10)) and plastoquinone (PQ(9)) incorporated in supported phospholipid layers," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 451, no. 1, pp. 139–144, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(98\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(98)00076-X).
- [22] E. A. Schilling, A. E. Kamholz, and P. Yager, "Cell Lysis and Protein Extraction in a Microfluidic Device with Detection by a Fluorogenic Enzyme Assay," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 8, pp. 1798–1804, 2002, doi: 10.1021/ac015640e.
- [23] J. Bard, Allen and L. R. Faulkner, "Basic potential step methods," in *Electrochemical methods. Fundamentals and Applications*, 2nd editio., John Wiley & Sons, 2001, pp. 156–225.
- [24] M. W. Lehmann and D. H. Evans, "Effect of Comproportionation on Voltammograms for Two-Electron Reactions with an Irreversible Second Electron Transfer," *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 10, pp. 1947–1950, 1999, doi: 10.1021/ac990066g.
- [25] C. Amatore, F. Bonhomme, J.-L. Bruneel, L. Servant, and L. Thouin, "Mapping dynamic concentration profiles with micrometric resolution near an active microscopic surface by confocal resonance Raman microscopy. Application to diffusion near ultramicroelectrodes: first direct evidence for a conproportionation reaction," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 484, no. 1, pp. 1–17, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(00\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(00)00057-7).
- [26] O. V Klymenko, I. Svir, and C. Amatore, "Theoretical study of the EE reaction

mechanism with comproportionation and different diffusivities of reactants,” *Electrochem. Commun.*, vol. 12, no. 10, pp. 1378–1382, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.07.025>.

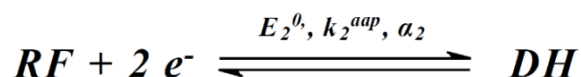
- [27] M. A. G. Zevenbergen, B. L. Wolfrum, E. D. Goluch, P. S. Singh, and S. G. Lemay, “Fast electron-transfer kinetics probed in nanofluidic channels,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 32, pp. 11471–11477, 2009, doi: 10.1021/ja902331u.

Annexe du chapitre IV

1. Voltammétrie cyclique de la résorufine (RF)

Nous avons étudié la réduction de la résorufine à une électrode millimétrique et à une ultramicroélectrode par voltammétrie cyclique. Chacune de ces configurations offre des avantages spécifiques pour la détermination des paramètres cinétiques du transfert d'électrons.

Comme discuté dans ce chapitre, la réduction de la résorufine est modélisée par le transfert direct de deux électrons suivant une cinétique de Butler-Volmer (à pH = 10).



où le potentiel standard apparent E_2^0 , la constante de vitesse de transfert d'électron hétérogène k_2^{app} et le coefficient de transfert de charge α_2 , sont tous à déterminer à partir de l'analyse du voltammogramme.

- **Voltammétrie à une ultramicroélectrode, détermination de la valeur de α_2**

Un voltammogramme typique de la réduction de la résorufine (0.25mM en tampon carbonate 0.1M, pH = 10), enregistré à une électrode de platine de 25 μm de diamètre, à une faible vitesse de balayage (10 mV/s), est représenté en Figure AIV.1A.

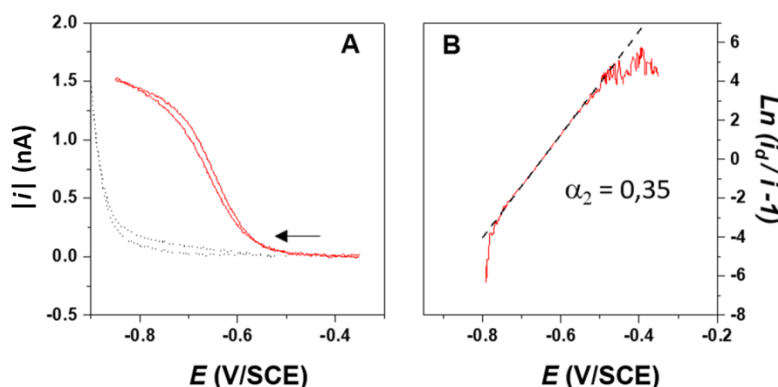


Figure AIV.1. (A) Tracé rouge : CV de la résorufine (0.25 mM) à une ultramicroélectrode de platine de 25 μm de diamètre. Tracé en pointillés : courant de fond enregistré en l'absence de résorufine. Electrolyte : Tampon carbonate 0.1 M pH 10. Vitesse de balayage de 10 mVs^{-1} . (B) transformée logarithmique du CV de la résorufine affiché en (A).

On observe une vague unique, de forme sigmoïdale, centrée sur un potentiel à mi-vague de -0.650 V/SCE. Elle est caractérisée par un courant de plateau quelque peu penché, dû au courant de fond apparaissant dans la région cathodique même en l'absence de résorufine,

montré en Figure AIV.1A (tracé en pointillés noirs). Une intensité de courant de plateau de diffusion d'environ $i_d \sim 1.3\text{nA}$ peut néanmoins être estimée.

i_d est théoriquement donné par : $i_d = 4nFDCa$ [1], avec n le nombre d'électrons échangés, D le coefficient de diffusion de la résorufine ($4.8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) [2], C sa concentration, et a le rayon de l'ultramicroélectrode. On obtient ainsi : $n \sim 2$, confirmant que la réduction de la résorufine implique le transfert de deux électrons.

Le voltammogramme peut être analysé plus avant sur la base du traitement théorique valide pour tout voltammogramme correspondant à un transfert d'électrons lent décrit par la cinétique de Butler-Volmer [1]. Il s'agit de tracer l'expression $\ln(\frac{i_d}{i} - 1)$, où i est le courant du CV, en fonction du potentiel de l'électrode E . Comme prédit par la théorie, on obtient ainsi une ligne droite, voir Figure AIV.1B, dont la pente est théoriquement donnée par $\alpha_2 nF/(RT)$. En prenant $n = 2$ et $T = 25^\circ\text{C}$, nous trouvons donc $\alpha_2 = 0.35$.

- **Voltammétrie à une électrode millimétrique, détermination des valeurs de $E_2^{0'}$ et k_{s2}^{aap}**

Un CV typique correspondant à la réduction de la résorufine (0.5 mM dans un tampon carbonate 0.1 M, pH = 10), enregistré à une électrode de platine d'1 mm de diamètre, à une vitesse de balayage de 100 mV/s, est représenté en Figure AIV.2A.

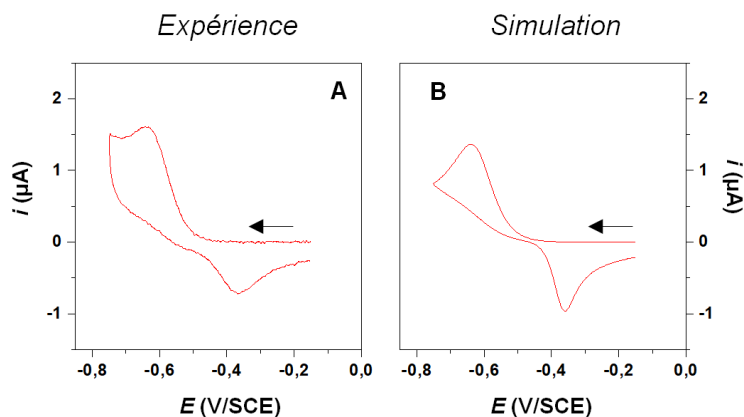


Figure AIV.2. (A) CV expérimental de la résorufine (0.5 mM) à une électrode de platine d'1 mm de diamètre. (B) CV théorique correspondant, simulé en utilisant les paramètres donnés ci-dessous. Electrolyte : Tampon carbonate 0.1 M pH 10. Vitesse de balayage 100 mVs^{-1} . La polarité des courants a été inversée.

On observe une vague unique de réduction, caractérisée par un potentiel de pic $E_p \sim -0.64 \text{ V/SCE}$, et une vague d'oxydation correspondante, caractérisée par un potentiel pic $\sim -0.36 \text{ V/SCE}$. La large séparation entre les pics nous permet de considérer que la vague cathodique

corresponds à un transfert d'électrons électrochimiquement irréversible, dont le potentiel pic, E_p , est donné par [3] :

$$E_p = E_2^0 + \frac{RT}{\alpha_2 n F} \left[2.3 \log \left(k_{s2}^{app} \sqrt{\frac{RT}{\alpha_2 n F v D}} \right) - 0.78 \right], \text{ avec } v \text{ la vitesse de balayage}$$

Cette équation indique que le potentiel pic de la vague cathodique dépend conjointement des paramètres E_2^0 et k_{s2}^{app} . Tout couple de valeurs de E_2^0 , k_{s2}^{app} , qui résout l'équation ci-dessus, permet de reproduire par simulation la vague cathodique du voltammogramme. Cependant, nous avons observé qu'il n'existe qu'un seul couple de valeurs permettant de reproduire *également* le potentiel pic de la vague anodique par simulation: $E_2^0 = -0.465$ V/SCE, $k_{s2}^{app} = 6.8 \cdot 10^{-5}$ cm/s. Le CV ainsi simulé, représenté en Figure AIV.2B, est en bon accord avec le signal expérimental, à ceci près que la forme de la vague anodique est plus large pour le CV expérimental. Cela est peut-être dû au fait que, comme discuté dans le corps du manuscrit, la modélisation d'une réaction de transfert électrons-protons par un transfert direct de deux électrons, n'est qu'une approximation. A noter que la valeur donnée ici pour E_2^0 est en bon accord avec la valeur ~ -0.450 V/SCE qui peut être estimée à partir de la demi-somme des potentiels des pics anodique et cathodique du voltammogramme enregistré à une faible vitesse de balayage de 10mV/s. Dans la littérature, les valeurs rapportées pour le potentiel standard apparent du couple RF/DH sont dans la gamme -0.430 à -0.480 V/SCE, à pH = 10 [4], [5].

2. Voltammétrie cyclique de la résazurine, à une électrode millimétrique

• Effet de la valeur de la constante de vitesse k_l sur les CV simulés de RZ

Le voltammogramme expérimental de RZ, présenté en Figure AIV.3A, est comparé à une série de signaux théoriques simulés avec différentes valeurs de la constante de vitesse k_l , Figure AIV.3A'.

Nous voyons que les CV simulés ne dépendent pas de la valeur de k_l , si $k_l \geq 10 \text{ s}^{-1}$. Pour des valeurs inférieures, les CV dépendent de la valeur exacte de k_l , mais la vague de RF devient alors nettement moins intense que la vague de réduction de RZ. Comme ce n'est pas ce qu'on observe expérimentalement, nous pouvons en conclure que $k_l \geq 10 \text{ s}^{-1}$, c.-à-d. que la réaction de coupure de liaison est suffisamment rapide pour ne pas contribuer au contrôle cinétique du CV de RZ.

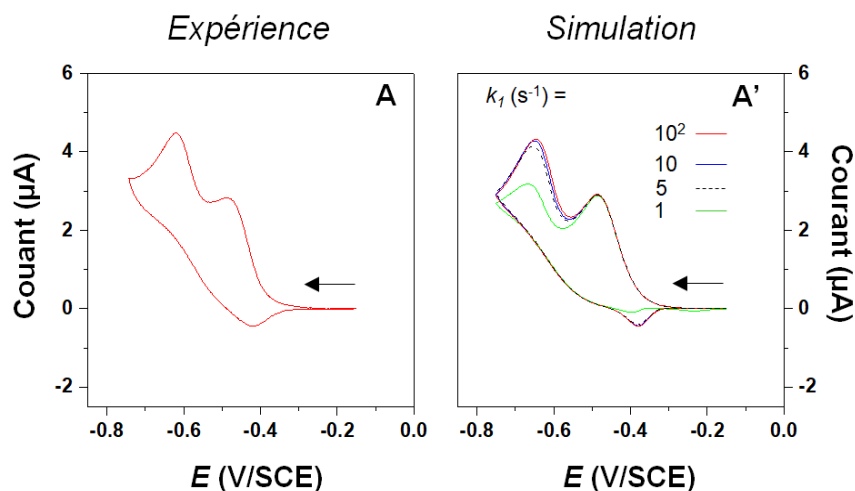


Figure AIV.3. (A) CV expérimental de la résazurine (1mM), enregistré à une électrode de travail en platine d'1 mm de diamètre. Électrolyte : 0.1 M buffer carbonate pH = 10. Vitesse de balayage 100 mVs^{-1} . (A') CV théoriques simulés pour différentes valeurs de k_f . Les autres paramètres cinétiques et thermodynamiques utilisés sont ceux donnés dans le corps du manuscrit. La polarité des courants a été inversée.

- **Signaux obtenus à une électrode millimétrique : Dérivée de l'intensité de fluorescence en fonction du potentiel de l'électrode, corrélation avec le courant électrochimique.**

Dans la littérature, il a été rapporté que, pour certains systèmes où une réaction électrochimique était couplée à l'émission de fluorescence, le courant mesuré était proportionnel à la dérivée du signal en fluorescence. C'est le cas pour des schémas de couplage en électrochimie bipolaire [6], et aussi pour l'électrochimie directe de l'espèce fluorogénique cresyl violet à une électrode d'ITO [7]. Nous avons par conséquent cherché à mettre en évidence une telle proportionnalité ici.

La dérivée, en fonction du potentiel de l'électrode de travail, du voltfluorogramme de la résazurine enregistré à une électrode millimétrique est illustrée en Figure AIV.4C. Il peut être observé qu'aucune corrélation de forme n'existe entre cette dérivée et le voltammogramme enregistré simultanément, tracé en Figure AIV.4A. On en arrive à la même conclusion pour le CV et la dérivée des signaux en fluorescence simulés, Figure AIV.4A' et AIV.4C'. Un examen plus détaillé des signaux montre néanmoins qu'une certaine corrélation entre la dérivée du signal de fluorescence et le courant existe, mais seulement au début de la première vague de CV. Cette corrélation nous a parue insuffisante pour servir de base à la mise au point de notre dispositif de conversion courant/fluorescence.

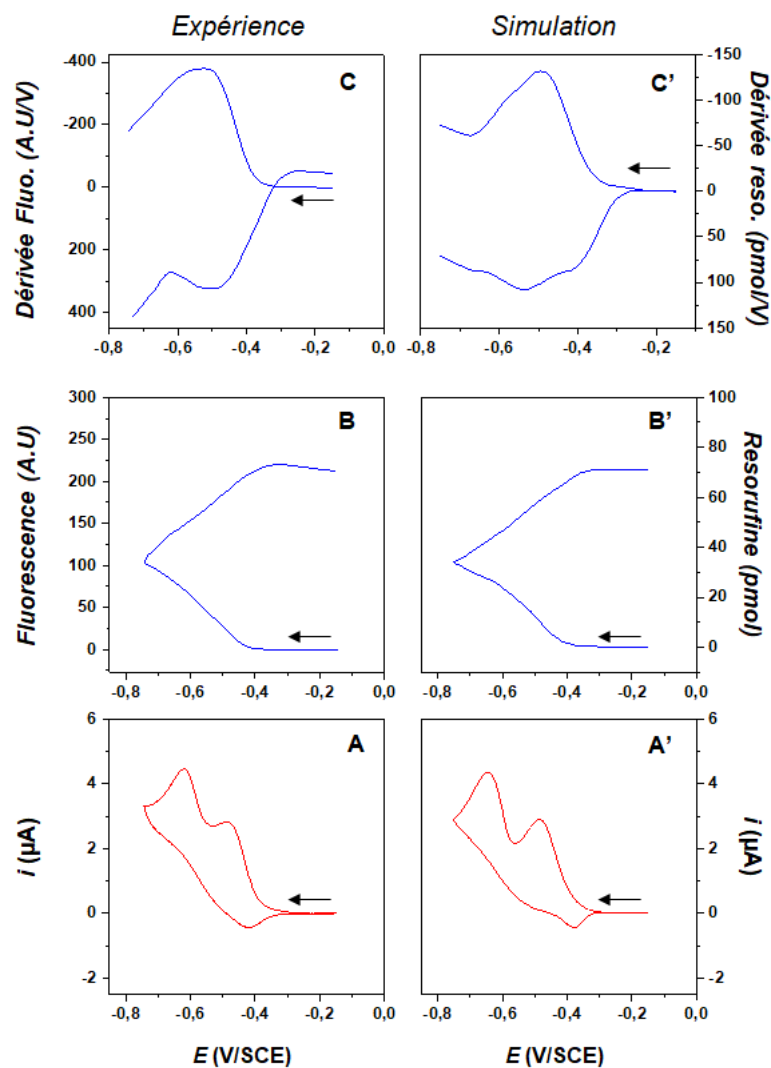


Figure AIV.4. (A) CV, et (B) CVF, expérimentaux, de la résazurine (1mM), enregistrés simultanément à une électrode de travail en platine d'1 mm de diamètre. Électrolyte : 0.1 M buffer carbonate pH = 10. Vitesse de balayage 100 mVs⁻¹. (A') CV simulé, et (B') CVF simulé (variation de la quantité de résorufine dans la couche de diffusion en fonction du potentiel E). (C) dérivée du CVF expérimental en fonction de E . (C') dérivée du CVF simulé. La polarité des courants a été inversée.

Références de l'annexe

- [1] J. Bard, Allen and L. R. Faulkner, "Basic potential step methods," in *Electrochemical methods. Fundamentals and Applications*, 2nd editio., John Wiley & Sons, 2001, pp. 156–225.
- [2] E. A. Schilling, A. E. Kamholz, and P. Yager, "Cell Lysis and Protein Extraction in a Microfluidic Device with Detection by a Fluorogenic Enzyme Assay," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 8, pp. 1798–1804, 2002, doi: 10.1021/ac015640e.
- [3] L. Nadjo and J. M. Savéant, "Linear sweep voltammetry: Kinetic control by charge transfer and/or secondary chemical reactions: I. Formal kinetics," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 48, no. 1, pp. 113–145, 1973, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(73\)80300-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(73)80300-6).
- [4] T. Doneux, L. Bouffier, B. Goudeau, and S. Arbault, "Coupling Electrochemistry with Fluorescence Confocal Microscopy To Investigate Electrochemical Reactivity: A Case Study with the Resazurin-Resorufin Fluorogenic Couple," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 12, pp. 6292–6300, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b00477.
- [5] A. de Poulpiquet *et al.*, "A snapshot of the electrochemical reaction layer by using 3 dimensionally resolved fluorescence mapping," *Chem. Sci.*, vol. 9, no. 32, pp. 6622–6628, 2018, doi: 10.1039/C8SC02011F.
- [6] J. P. Guerrette, S. J. Percival, and B. Zhang, "Fluorescence coupling for direct imaging of electrocatalytic heterogeneity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 2, pp. 855–861, 2013, doi: 10.1021/ja310401b.
- [7] C. Lei, D. Hu, and E. J. Ackerman, "Single-molecule fluorescence spectroelectrochemistry of cresyl violet," *Chem. Commun.*, vol. 43, pp. 5490–5492, 2008, doi: 10.1039/b812161c.

Chapitre V

**Généralisation de la conversion courant/fluorescence
et amélioration du système de couplage.**

Généralisation de la conversion courant/fluorescence et amélioration du système de couplage

1. Introduction

Au chapitre précédent, nous avons démontré qu'une réaction d'oxydation se produisant à l'électrode de travail pouvait être quantitativement couplée à la réduction fluorogénique de la résazurine à une contre-(ultramicro)-électrode, une « image » conforme du courant d'oxydation étant obtenue en fluorescence. Dans ce chapitre nous tenterons d'améliorer les performances de notre schéma de conversion, en cherchant à le rendre plus sensible et versatile par l'utilisation de nouveaux rapporteurs electro-fluorogéniques récemment décrits dans la littérature. Nous nous intéresserons également à la possibilité de convertir non plus seulement des courants stationnaires, mais également des courants transitoires de faible durée en fluorescence.

2. Etude en voltammétrie et voltfluorométrie cyclique du système fluorogénique HPTS/BQ

Le premier système que nous avons considéré comme nouveau rapporteur fluorogénique est basé sur l'acide 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique (HPTS), une molécule dont les propriétés de fluorescence ont été décrites récemment par Compton et al [1], Schéma V.1A.

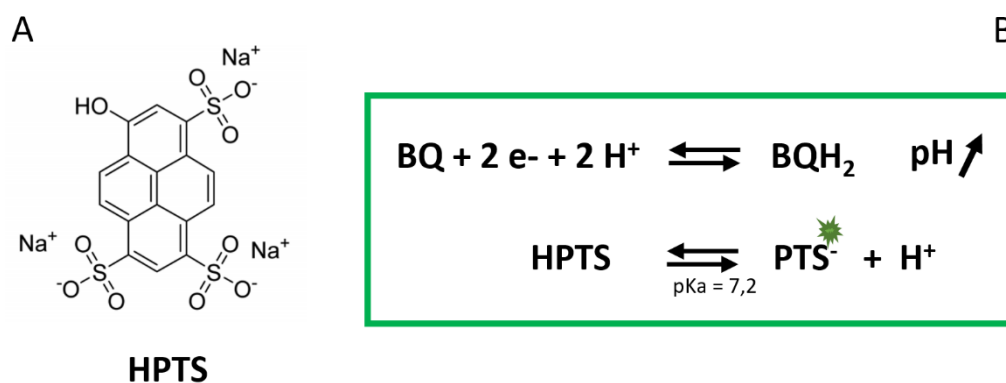


Schéma V.1. (A) Structure chimique de la molécule fluorogénique d'acide 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique (HPTS). (B) Principe de l'émission de fluorescence pH-induite par la déprotonation de l'HPTS à une électrode où la p-benzoquinone (BQ) est réduite en p-hydroquinone (BQH₂).

L'HPTS présente une bande d'adsorption à 460 nm à laquelle est associée une émission de fluorescence à 510 nm, dont l'intensité dépend fortement du pH. En effet la forme protonée (acide) de l'HPTS est peu fluorescente, alors que sa forme déprotonée (basique, PTS⁻) est très

fluorescente. Cette dernière est prédominante lorsque le pH dépasse le pKa d'HPTS qui est de 7.2.

La fluorescence de HPTS a été utilisée par Compton et al. pour visualiser une réaction électrochimique, la réduction de la *p*-benzoquinone (BQ) en *p*-hydroquinone à une microélectrode filaire en fibre de carbone [1]. Cette visualisation est rendue possible par l'augmentation locale du pH due à la consommation d' H^+ associée à la réduction de BQ, qui provoque la déprotonation de l'espèce non-fluorescente HPTS pour former PTS^- , Schéma V.1B. Il s'agit donc là d'un schéma de transduction « indirect » d'un processus faradique en fluorescence, puisque, contrairement à l'emploi de la résazurine, la réaction faradique en elle-même (la réduction de BQ) ne génère pas d'espèce fluorescente directement, mais seulement via un changement local de pH.

Il nous a semblé intéressant d'implémenter ce schéma au sein de notre dispositif de conversion de courant en fluorescence, afin d'étudier son éventuel apport en termes de performances de conversion.

Mais avant cela, il est apparu nécessaire d'étudier le système HPTS/BQ par lui-même, en voltammétrie et voltfluorométrie cyclique. Comme précédemment pour la résazurine, nous avons employé un montage classique à 3 électrodes, où le courant et la fluorescence sont tous deux enregistrés à l'électrode travail. Plus précisément, nous avons enregistré des voltamogrammes (CV) et voltfluorogrammes (CVF) simultanés à une ultramicroélectrode (UME) de travail en carbone de 25 μ m de diamètre, dans une solution électrolytique de 0.1 M KCl contenant 1 mM BQ et 2 mM HPTS. Ces données sont représentées en Figure V.1a et Figure V.1b respectivement. On peut observer qu'un signal de CV de forme sigmoïdale, typique de la voltammétrie aux microélectrodes, est obtenu (Figure V.1a). Il est caractérisé par un potentiel à mi-hauteur de -0.18 V/SCE et un plateau en courant de 5 nA, indiquant une réaction de réduction à deux électrons. Ces caractéristiques correspondent bien au comportement électrochimique de la benzoquinone en milieu aqueux non tamponné [2].

Le CVF enregistré simultanément (Figure V.1b), montre qu'une émission de fluorescence très intense est générée pendant que le potentiel de l'électrode est balayé cathodiquement, c.-à-d. alors que la BQ est réduite. Le signal de fluorescence a la même forme que le CV, mais présente une large hystérésis : un signal plus intense est observé sur le retour que sur l'aller de la courbe de fluorescence. Étonnamment, nous n'avons pas mesuré une telle hystérésis précédemment en étudiant le système fluorogénique résazurine/résorufine [3].

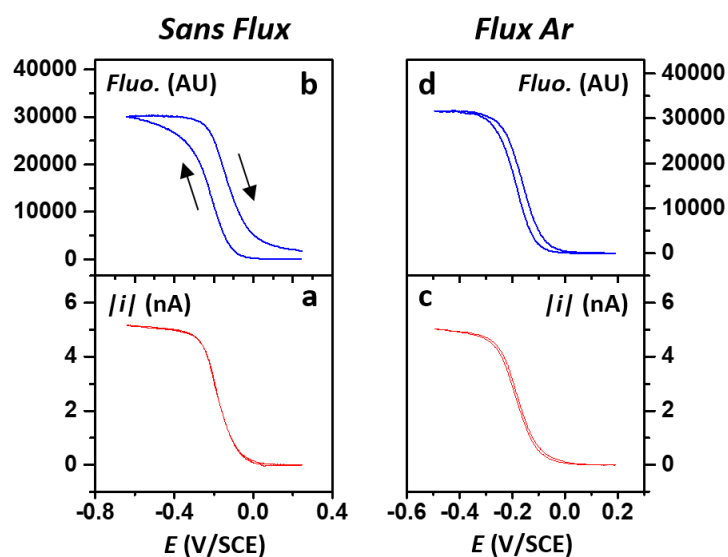


Figure V.1. Voltammétrie (CV) et voltfluorométrie (CVF) cyclique du système fluorogénique HPTS/BQ. (a, c) CV de 1 mM BQ en présence de 2 mM HPTS, à une UME en carbone de 25 μm de diamètre. (b, d) CVF enregistrés simultanément. Effet de la convection induite par un flux d'argon libéré au-dessus de la solution : (a, b) sans flux, (c, d) avec flux. Electrolyte aqueux 0.1 M KCl, vitesse de balayage de 0.01 Vs^{-1} .

Après investigation, nous avons découvert que l'hystérésis obtenue ici peut être grandement diminuée, et parfois complètement éliminée, simplement en augmentant l'intensité du flux d'argon maintenu en permanence au-dessus de la solution durant l'enregistrement des CV et CVF (pour maintenir l'oxygène hors de la cellule), comme illustré en Figure V.1d. Il est important de noter que cette augmentation du flux d'argon ne perturbe pas le CV (comparer Figure V.1a et Figure V.1c). Par conséquent, nous attribuons cette hystérésis de la fluorescence à l'accumulation de l'espèce PTS^- générée à l'électrode dans le champ de vision du microscope à épifluorescence. Ce résultat révèle que, contrairement à ce que nous pensions précédemment, la diffusion sphérique à une UME de 25 μm de diamètre n'est pas suffisante pour éviter *totalemment* l'accumulation d'espèces fluorescentes à proximité de l'électrode, mais a besoin pour cela d'être complétée par une légère convection (ici apportée par la circulation de l'argon). La relative insensibilité à la convection, des courants stationnaires mesurés à des UMEs [4]–[6], rend possible l'utilisation d'un flux d'argon assez intense pour disperser les molécules fluorescentes accumulées à proximité de l'électrode sans perturber le courant pour autant. Même un flux d'argon modéré (~ 100 ml/min) au-dessus de la surface d'une cellule électrochimique de dimensions 3 cm x 1.5 cm x 1 cm, suffit à générer la convection nécessaire pour obtenir un courant et un signal de fluorescence très similaires. Cependant, il nous a semblé pertinent de rechercher une manière expérimentale, plus fiable que la convection, permettant d'empêcher l'accumulation de PTS^- à proximité de l'électrode.

Dans la littérature il a été montré que l'accumulation de fluorescence au voisinage d'une électrode pouvait être évitée par l'introduction en solution d'espèces qui consomment chimiquement les molécules fluorescentes produites localement [7], [8]. Compton et al. ont ainsi montré que l'extension spatiale du profil de fluorescence développé à une électrode où BQ est réduite en présence d'HPTS peut être minimisée en acidifiant le milieu par l'ajout d'acide chlorhydrique [1]. Les molécules PTS^- formées au voisinage de l'électrode ne diffusent alors que sur une courte distance avant d'être protonées par les H^+ , pour former l'espèce HPTS non fluorescente. La distance de propagation de l'espèce PTS^- et donc la zone d'émission de fluorescence est d'autant plus réduite que la solution a été acidifiée.

Nous avons exploré cette méthode, basée sur la modulation du pH de la solution, pour tenter de résoudre le problème d'hystérésis sur le signal de fluorescence rencontré ici. Pour cela nous avons enregistré une série de voltammogrammes et voltfluorogrammes à une UME de travail en carbone de 25 μm de diamètre dans la solution contenant 1 mM BQ et 2 mM HPTS comme précédemment, cette fois-ci en ajoutant progressivement une certaine quantité d'HCl, Figure V.2.

On voit que l'ajout d'une quantité même infime d'HCl (par exemple 0.05 mM) réduit considérablement l'hystérésis du CVF (Figure V.2d). Cet effet est dû à la protonation rapide du PTS^- qui diffuse et s'éloigne de la surface de l'électrode vers la solution à présent acidifiée. Ce résultat valide l'emploi de la stratégie 'd'extinction' chimique de la fluorescence générée à proximité de la surface comme moyen de réduire l'hystérésis du signal de fluorescence. Cependant, si on considère maintenant le signal en courant (Figure V.2c), on peut voir que l'ajout d' H^+ est aussi associé à l'apparition d'une pré-vague (désignée par un astérisque), qui gagne en intensité avec l'augmentation de la concentration en HCl (Figure V.2e). Le plateau en courant du CV diminue aussi légèrement avec l'augmentation de la concentration en H^+ . Si on compare maintenant les CVF présentés en Figure V.2(b, d et f) on peut observer que l'intensité du signal en fluorescence diminue quant à elle drastiquement avec l'augmentation de la concentration en H^+ . De plus, on peut aussi observer que quasiment aucune fluorescence n'est mesurée dans la zone de potentiel de la pré-vague, tandis qu'une intense fluorescence est mesurée une fois la vague passée. Cela pose un problème majeur à l'utilisation du système HPTS/BQ pour transduire des courants électrochimiques en émission de fluorescence qui nécessite une corrélation parfaite entre ces deux signaux.

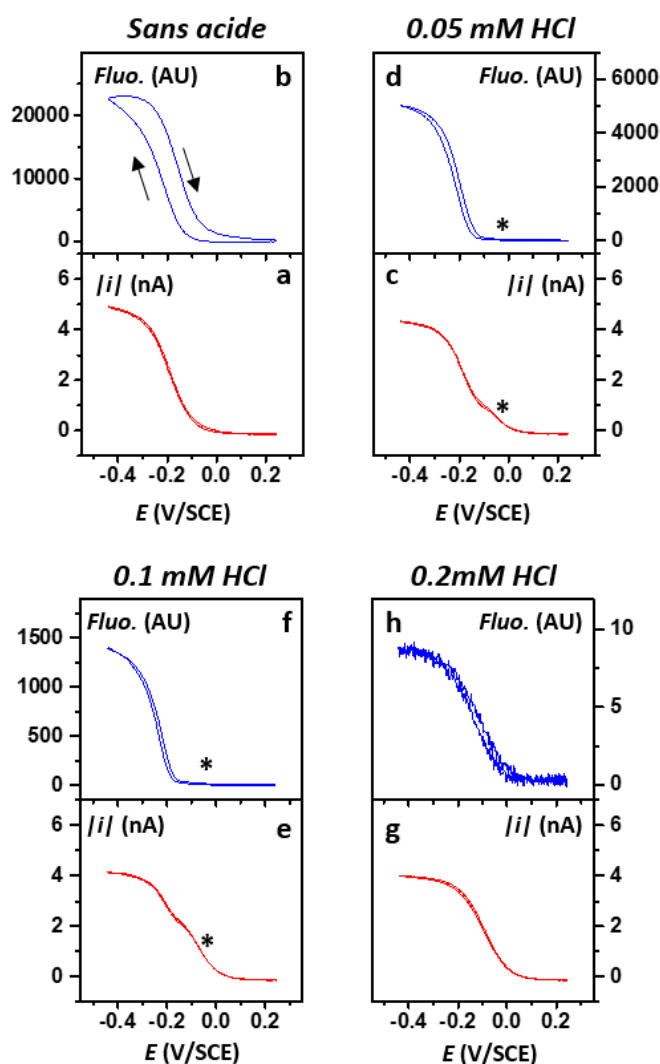


Figure V.2. Voltammétrie et voltfluorométrie cyclique du système fluorogénique HPTS/BQ. Effet d'ajout d'HCl. (a, c, e, g) : CV de 1 mM BQ en présence de 2 mM HPTS, à une UME en carbone de 25 μm de diamètre. (b, d, f, h) : CVF enregistrés simultanément. La concentration en HCl ajoutée est indiquée au-dessus de chaque couple de CV/CVF. L'astérisque désigne la position de la pré-vague discutée dans le texte. Electrolyte aqueuse 0.1 M KCl, vitesse de balayage de 0.01 Vs^{-1} .

Cependant, pour une concentration en HCl relativement élevée (0.2 mM), on observe que la pré-vague fini par dominer complètement la totalité du signal en courant (Figure V.2g) et la forme du signal en fluorescence associé devient alors bien corrélée à celle du CV (Figure V.2h). Le CVF présente alors une hystérésis négligeable, mais son intensité est très faible (Figure V.2h). Il est donc intéressant d'essayer de comprendre d'avantage le comportement en CV et CVF du système HPTS/BQ afin de trouver un moyen d'augmenter l'intensité de la fluorescence mesurée dans cette situation.

Pour cela il est nécessaire de considérer en détails les étapes de transfert d'électrons et de protonation associées à la réduction de la benzoquinone, et la façon dont s'effectue la production des espèces fluorescentes PTS^- , sur la base du schéma carré reproduit en Schéma V.2 et adapté de la référence [1].

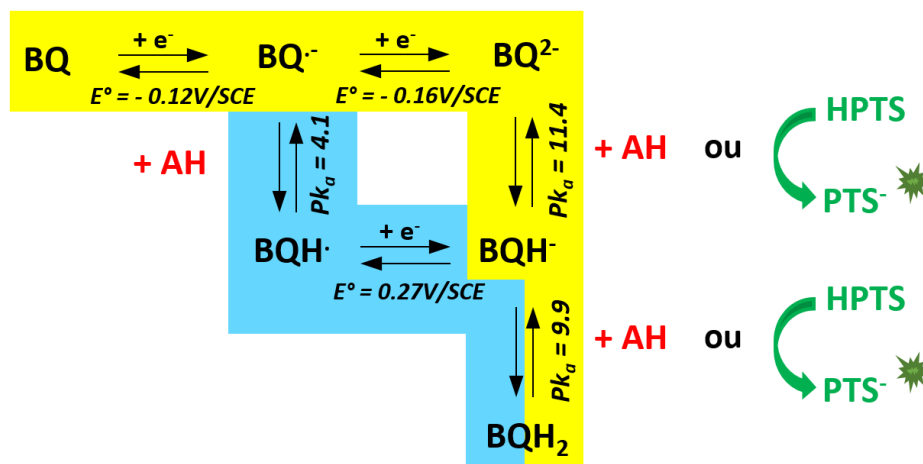


Schéma V.2. Schéma carré représentant les chemins réactionnels possibles pour la réduction de la benzoquinone à une électrode, en présence d'un acide (AH) et de l'HPTS.

Ce schéma représente de manière séquentielle, et sans doute de façon abusivement simple, les différentes étapes de transferts élémentaires d'électrons et de protons aboutissant à la réduction complète de BQ à 2 électrons/2 protons. Il a été montré que ce schéma carré permettait de reproduire le comportement du système HPTS/BQ par simulation numérique de façon satisfaisante [1]. Aussi l'avons-nous implémenté dans le logiciel de simulation DigiElch, en utilisant les paramètres cinétiques et thermodynamiques rapportés dans la littérature (constantes de vitesse de transferts d'électrons, de protonation, pK_a et E° des diverses espèces).

La simulation, en donnant accès aux profils de concentration de toutes les espèces intermédiaires, nous a permis de déterminer le chemin réactionnel suivi par la réaction de réduction de BQ, en fonction des concentrations en acide ajoutées à la solution. De plus, la simulation a rendu possible de visualiser l'évolution du profil de l'espèce PTS^- avec le potentiel, permettant ainsi une compréhension qualitative du comportement du système observé en CVF. Enfin, bien évidemment, le logiciel a permis de calculer des voltammogrammes théoriques, dont les caractéristiques reproduisent celles des CV expérimentaux (Figure AV.1).

Au final, de cette étude, les conclusions suivantes ont pu être tirées quant au mécanisme de réduction de BQ et à la génération des signaux en courant et en fluorescence.

En l'absence d'acide, le chemin réactionnel surligné en jaune en Schéma V.2 est suivi préférentiellement. BQ est réduite successivement en deux étapes à deux potentiels très proches, si bien qu'une seule vague est obtenue en CV. L'espèce di-anionique BQ^{2-} produite à l'électrode est protonée par l'HPTS pour produire l'espèce fluorescente PTS^- . Il en va de même pour l'espèce BQH^- , dont la protonation par l'HPTS produit une seconde molécule PTS^- . L'ensemble du processus est alors responsable de la formation d'une zone de fluorescence intense autour de l'électrode.

En présence de H^+ , la simulation permet de mettre en évidence que la pré-vague est associée à l'apparition de l'espèce BQH^- , démontrant que la réduction de BQ suit alors le chemin réactionnel « bleu » (Figure AV.2). Les H^+ protonent l'espèce intermédiaire BQ^- pour former BQH^- qui est instantanément réduite pour former BQH^- . Cette dernière espèce est alors protonée majoritairement par H^+ et minoritairement par HPTS. Ceci explique pourquoi seule une faible fluorescence est mesurée au niveau de la pré-vague. Cependant, comme la concentration en H^+ est très faible comparée à BQ, H^+ est rapidement épuisé à la surface de l'électrode et la réduction de BQ *reprend* par le chemin surligné en jaune une fois la pré-vague passée. HPTS peut alors à nouveau jouer son rôle de donneur de proton pour les espèces BQ^{2-} et BQH^- , s'ensuit l'émission d'un signal en fluorescence bien plus intense qu'au niveau de la pré-vague, comme illustré en Figure V.2d et V.2f. La diminution globale de l'intensité de fluorescence avec l'augmentation de la concentration en HCl provient du fait que les espèces BQ^{2-} et BQH^- deviennent majoritairement protonées par H^+ plutôt que par HPTS.

Les simulations ont aussi montré qu'en augmentant la concentration en H^+ même à une fraction de la concentration initiale en BQ, il est possible de trouver des conditions où le chemin surligné en bleu est suivi *tout au long de la mesure* des CV/CVF. Dans cette situation on ne s'attend à mesurer qu'une seule vague, correspondant à la 'pré-vague', et à une émission de fluorescence assez faible. Cette situation est rendue possible par la diffusion rapide des H^+ vers l'électrode, qui permet la réduction complète de BQ en BQH_2 même si le rapport des concentrations $[H^+]/[BQ]$ dans la solution est inférieur à l'unité. Ces conditions ont à l'évidence été atteintes ici expérimentalement pour 0.2 mM HCl, comme montré en Figure V.2h. Cette valeur est la concentration minimale en HCl pour laquelle on obtient un

CV et un CVF identiques en forme tout au long de la plage de potentiel explorée. Augmenter d'avantage la concentration en HCl est néfaste puisque cela ne fait que diminuer encore l'intensité de la fluorescence, en rendant la protonation de BQH^- par H^+ plutôt que par HPTS encore plus favorable.

Nous avons donc identifié les conditions appropriées pour l'emploi du système HPTS/BQ pour la conversion courant-fluorescence. Cependant, en comparant les Figures V.2d et V.2f à la Figure V.2h, on peut voir que réunir ces conditions se fait au détriment de l'intensité du signal de fluorescence, qui a diminué de deux ordres de magnitude une fois que l'HCl a été rajouté.

Nous pouvons donc conclure que, même si l'ajout d'HCl au système HPTS/BQ peut être une bonne stratégie pour minimiser l'hystérésis du signal de fluorescence, ou, comme décrit par Compton et al. [1] pour augmenter la résolution en microscopie de fluorescence couplée à l'électrochimie, la perte en amplitude du signal en fluorescence en limite sévèrement l'utilité. Cela est dû conjointement au changement de chemin réactionnel de réduction de BQ et à la compétition entre H^+ et HPTS pour la protonation des espèces BQ^{2-} et BQH^- .

Pour tenter de minimiser ce problème, nous avons essayé de remplacer l'acide chlorhydrique par un acide faible, l'acide acétique (AA, $pK_a = 4.75$). Nous avons donc enregistré des CV et CVF à une UME en carbone dans une solution contenant 2 mM / 1 mM HPTS/BQ, en rajoutant progressivement AA, Figure V.3.

Comme on peut le voir, l'ajout d'acide acétique diminue drastiquement l'hystérésis des CVF mesurés (comparer Figure V.2b et Figure V.3b). Cependant, l'ajout d'AA à la solution provoque aussi l'apparition de la même pré-vague que celle observée avec l'ajout d'HCl pour acidifier la solution. Cela indique que la protonation de BQ^- par AA a lieu de façon significative, en dépit du fait que BQH^- soit un acide légèrement plus fort que l'acide acétique (pK_a estimé (BQH^-/BQ^-) = 4.1 contre 4.75 pour AA). Néanmoins, il est possible d'augmenter la concentration en AA jusqu'à ce que le CV ne présente plus qu'une seule vague (la pré-vague), le CV et le CVF devenant de ce fait similaires en forme (Figure V.3e et Figure V.3f). Il est notable que l'intensité du signal de fluorescence atteinte alors est environ 10 fois supérieure à celle mesurée lorsque HCl a été utilisé pour acidifier la solution. Ce résultat bénéfique est dû au fait que l'espèce AA étant un acide faible, elle rentre moins en compétition avec HPTS pour la protonation de BQ^{2-} et BQH^- que ne le faisait H^+ .

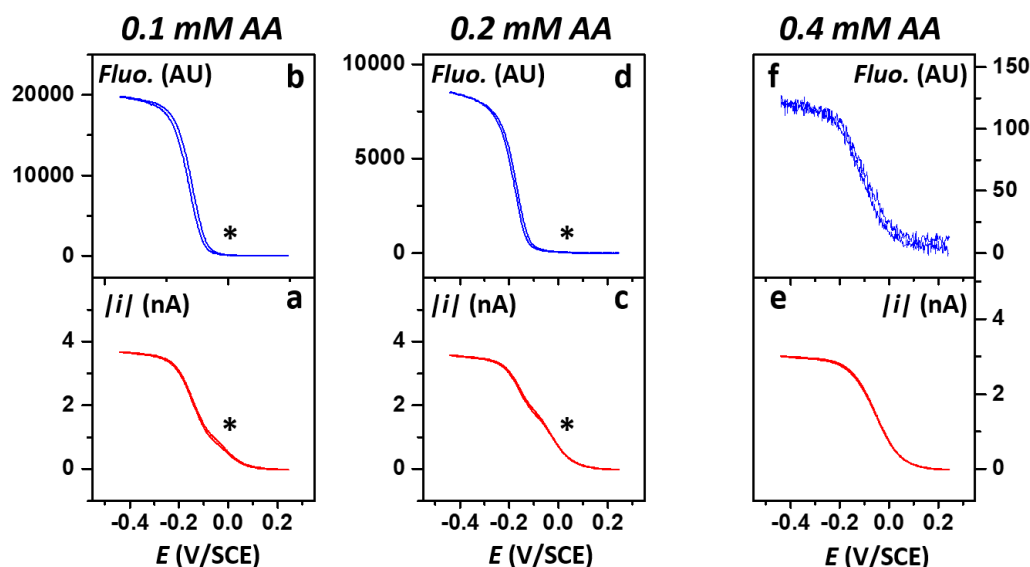


Figure V.3. Voltammétrie et voltfluorométrie cyclique du système fluorogénique HPTS/BQ. Effet d'ajout d'acide acétique (AA). (a, c, e) : CV de 1 mM BQ en présence de 2 mM HPTS et d'une quantité variable d'AA à une UME en carbone de 25 μm de diamètre. (b, d, f) : CVF enregistrés simultanément. La concentration en AA ajouté est indiquée au-dessus de chaque couple de CV/CVF. L'astérisque désigne la position de la pré-vague discutée dans le texte. Electrolyte aqueuse 0.1 M KCl, vitesse de balayage de 0.01 Vs^{-1} .

Par conséquent, nous avons démontré qu'une émission de fluorescence indirecte, modulée par le changement de pH local due à une réaction faradique à une UME, peut mener à la mesure de signaux de fluorescence et de courant étroitement similaires. Plus précisément, pour le système HPTS/BQ, nous avons identifié des conditions expérimentales qui garantissent simultanément la génération d'une seule vague de courant associée à un signal de fluorescence corrélé en forme, assez intense et sans hystérésis, Figure V.3e et V.3f.

Nous avons ensuite examiné la possibilité d'utilisation de la version optimisée de ce système pour convertir une réaction d'oxydation générique en fluorescence.

3. Conversion d'une réaction électrochimique oxydative générique en émission de fluorescence par le système HPTS/BQ optimisé

Pour effectuer cette conversion, le compartiment de la contre-électrode du dispositif convertisseur décrit au chapitre précédent a été rempli d'une solution de 0.1 M KCl contenant 2 mM HPTS, 1 mM BQ, et 0.4 mM AA. La solution a été préalablement dégazée à l'argon, mais le flux d'argon au-dessus a été coupé pendant les mesures pour éviter l'influence de la convection sur l'hystérésis de la fluorescence. Une UME en carbone de 25 μm de diamètre a été utilisée comme contre-électrode. Le compartiment de l'électrode de travail a été rempli

d'une solution aqueuse de 0.1 M NaClO₄ contenant 1 mM de ferrocène diméthanol (Fc_{di}OH). Une UME en platine de 25 µM de diamètre a constitué l'électrode de travail.

Le voltammogramme cyclique enregistré à l'électrode de travail et la fluorescence simultanément mesurée à la contre-électrode (CE), sont représentés en fonction du potentiel de l'électrode de travail (WK) en Figure V.4a et V.4b respectivement.

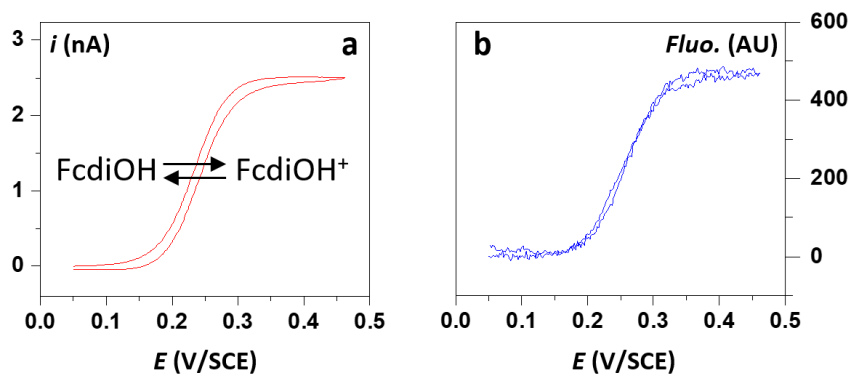


Figure V.4. Conversion d'un courant faradique anodique en émission de fluorescence, par le système HPTS/BQ/AA optimisé. L'oxydation du ferrocène diméthanol (Fc_{di}OH) à l'électrode de travail sous contrôle potentiostatique est couplée à une émission de fluorescence due à la réduction de la benzoquinone en présence d'HPTS et d'acide acétique à la contre-électrode. (a) Voltammogramme cyclique à l'UME électrode de travail en platine de 25 µm de diamètre. (b) Signal de fluorescence enregistré simultanément à l'UME contre-électrode en carbone de 25 µm de diamètre. Les compartiments de l'électrode de travail et de la contre-électrode contenaient respectivement 1 mM Fc_{di}OH dans une solution de 0.1 M NaClO₄, et 1 mM BQ, 2 mM HPTS, 0.4 mM AA dans une solution aqueuse de 0.1 M KCl. Vitesse de balayage de 0.01 Vs⁻¹.

On peut voir que le CV correspondant à l'oxydation du Fc_{di}OH à l'électrode de travail, et le CVF généré par le couple moléculaire HPTS/BQ à la contre-électrode, sont très similaires en forme. Ce résultat démontre que le système HPTS/BQ/AA, une fois optimisé, peut être utilisé comme transducteur fluorogénique efficace dans notre schéma de conversion, permettant la conversion de courants d'oxydation générés à une électrode sous contrôle potentiostatique en émission de fluorescence ne présentant aucune hystérésis. Comparé au système résaurine/résorufine utilisé précédemment, le système HPTS/BQ/AA élimine le problème d'hystérésis de la fluorescence sans avoir recours à la convection. Cela permet en premier lieu un suivi plus fidèle du courant par le signal de fluorescence. En second lieu, en évitant l'accumulation d'espèces fluorescentes au voisinage de l'électrode, on s'attend à ce que ce nouveau système confère une meilleure résolution temporelle (c.-à-d. bande passante) à notre dispositif de conversion courant/fluorescence.

Dans le but de valider cette hypothèse, nous avons réalisé des mesures en chronoampérométrie à l'aide de notre dispositif configuré tel que décrit ci-dessus. Le compartiment de l'électrode de travail contenant du Fc_{di}OH et le comportement de la contre-électrode le système HPTS/BQ. Une série d'impulsions brèves (0.1 s) en potentiel de +0.05 à

+0.45 V/SCE ont été appliquées à l'UME de travail pour déclencher puis stopper l'oxydation du FcdiOH. Le courant et le signal de fluorescence, générés à l'électrode de travail et à la contre-électrode, respectivement, ont été enregistrés simultanément et sont portés en fonction du temps en Figure V.5. Deux configurations expérimentales ont été étudiées : en absence d'acide acétique ajouté dans le compartiment de la contre-électrode (Figures V.5a,b,c), et en présence de 0.4 mM d'acide acétique (système optimisé, Figure V.5a',b',c').

Comme on peut le voir, dans les deux cas, les impulsions en potentiel ont provoqué la

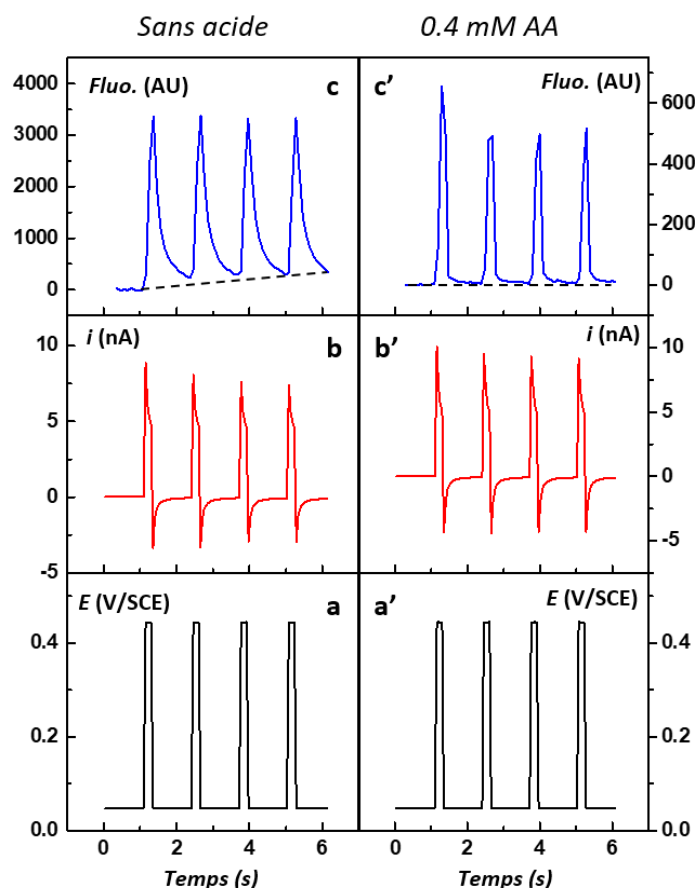


Figure V.5. Conversion d'un courant faradique anodique transitoire en émission de fluorescence, par le système HPTS/BQ non-optimisé et optimisé, mettant en évidence le gain en bande passante apporté par l'ajout d'acide acétique. A gauche (a, b, c), sans ajout d'acide. A droite (a', b', c') en présence de 0.4 mM d'acide acétique. (a, a') : une série de quatre brèves impulsions en potentiel (0.1 s) appliquées à l'UME électrode de travail plongée dans une solution contenant FcdiOH. (b, b') : courants transitoires résultants. (c, c') : Emission de fluorescence correspondante enregistrée à l'UME contre-électrode plongée dans une solution contenant le mélange HPTS/BQ. Les compartiments de l'électrode de travail et de la contre-électrode contenaient respectivement 1 mM FcdiOH dans une solution aqueuse de 0.1 M NaClO₄, et 1 mM BQ, 2 mM HPTS dans une solution de 0.1 M KCl. La contre-électrode était une UME en carbone de 25 μm de diamètre.

génération de courants transitoires similaires (Figure V.5b et V.5b') indiquant que l'oxydation du FcdiOH a bien été déclenchée puis stoppée alternativement. En examinant les Figures V.5c et V.5c', on peut voir qu'un intense signal en fluorescence corrélé au courant transitoire est mesuré, en l'absence et en présence d'acide acétique. Cela dit, on peut aussi constater que le

signal transitoire en fluorescence enregistré en l'absence d'acide est caractérisé par une augmentation rapide suivie par un déclin beaucoup plus lent. Le déclin du signal de fluorescence se poursuit même au-delà du moment où le potentiel est ramené à 0.05V et où l'oxydation du FcdiOH a cessé.

De plus, à cause de ce lent déclin diffusif, le signal de fluorescence ne parvient pas à zéro dans la période temporelle de 1.5 s qui sépare deux impulsions successives. Un tel comportement est une démonstration claire de l'accumulation de l'espèce PTS^- au voisinage de la contre-électrode et de sa lente dispersion par diffusion/convection (Figure AV.1a).

Si on analyse maintenant les données acquises en présence d'acide acétique, on voit qu'au contraire de ce qui est observé sans acide, la fluorescence retombe rapidement à zéro quand le potentiel de la WK est ramené à 0.05 V, c.-à-d. quand l'oxydation du FcdiOH est stoppée. Cela montre que le système HPTS/BQ/AA optimisé permet la conversion de courants en fluorescence à une échelle temporelle au moins aussi courte que 0.1 s. Ce résultat important ouvre la voie à la détection d'événements de courte durée générant de faibles courants faradiques en signaux de fluorescence plus faciles à détecter. En effet, au-delà d'une sensibilité accrue, ce mode de détection, n'ayant pas les mêmes contraintes technologiques que les montages à transimpédance classiquement employés pour quantifier les petits courants, peut potentiellement offrir une meilleure bande passante que ceux-ci.

4. Conversion d'une réaction électrochimique réductive générique en fluorescence en utilisant l'Amplex Red comme rapporteur

Au chapitre précédent [3], et jusque-là dans le présent chapitre, nous avons démontré que des réactions oxydatives génériques pouvaient être converties en émission de fluorescence. Mais la question de savoir si des réactions réductives peuvent être transduites de la même manière subsiste encore. Pour y répondre nous avons choisi l'Amplex Red (AR) comme rapporteur électro-fluorogène anodique.

Le comportement de l'AR en électrochimie couplée à la microscopie de fluorescence a été décrit récemment par Bouffier et al. [9]. Ces auteurs ont montré que l'Amplex Red, non-fluorescent, pouvait être irréversiblement oxydé à une électrode pour former l'espèce très fluorescente résorufine (Schéma V.3).

Nous avons d'abord réalisé une brève étude en voltammétrie et voltfluorométrie cyclique de l'Amplex Red (0.25 mM dans 0.1 M tampon PBS pH = 7.4) à une UME en platine de 25

μm de diamètre. Les CV et CVF enregistrés simultanément ont montré que l'oxydation de l'AR à l'UME débute autour de +0.35 V/SCE et est associée à une intense émission de fluorescence, due à la production de résorufine, Figure AV.3 [9], les CV et CVF étant, c'est heureux, très similaires en forme.

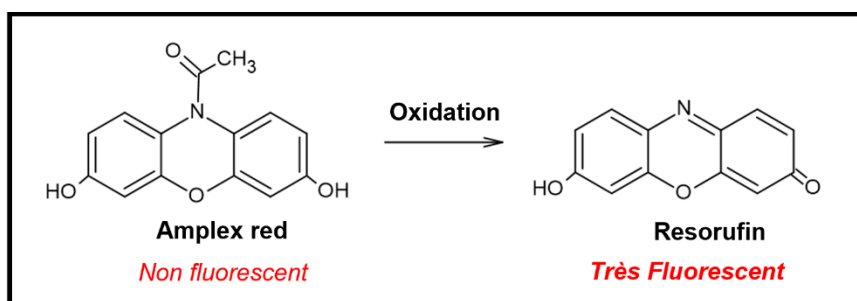


Schéma V.3. Schéma global de l'oxydation fluorogénique de l'Amplex Red, non-fluorescent, en résorufine très fluorescente.

Ensuite, nous avons placé l'AR (0.25 mM dans 0.1 M tampon PBS pH = 7.4) dans le compartiment de la contre-électrode de notre système de conversion et nous avons placé du rutheniumhexaammine(III) (RuHex), un composé réductible modèle, dans le compartiment de l'électrode de travail. L'électrode de travail et la contre-électrode étaient constituées par des UME de 25 μm , en or et en platine respectivement. Le potentiel de l'électrode de travail a été balayé négativement, de +0.15 V/SCE à -0.24 V/SCE et retour à +0.15 V/SCE. Le CV à la WK et le CVF à la contre-électrode ainsi enregistrés simultanément sont présentés en Figure V.6a et V.6b respectivement.

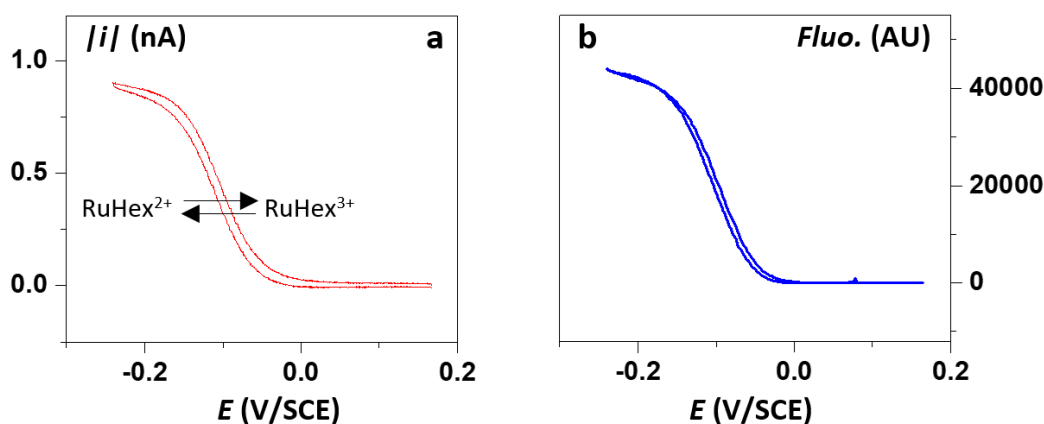


Figure V.6. Conversion d'un courant faradique cathodique en émission de fluorescence. La réduction du rutheniumhexaammine(III) (RuHex), à l'électrode de travail sous contrôle potentiostatique, a été couplée à une émission de fluorescence due à l'oxydation de l'Amplex Red à la contre-électrode. (a) Voltammogramme cyclique du RuHex à l'UME électrode de travail en or de 25 μm de diamètre. (b) Signal de fluorescence enregistré simultanément à l'UME contre-électrode en platine de 25 μm de diamètre. Les compartiments de l'électrode de travail et de la contre-électrode contenaient respectivement 0.5 mM RuHex dans une solution aqueuse de 0.1 M KCl, et 0.25 mM Amplex Red dans un tampon de 0.1 M PBS pH = 7.4. Vitesse de balayage de 0.01 Vs^{-1} .

On peut voir sur le CV, que le courant correspondant à la réduction à un électron du RuHex à l'électrode de travail est associé à la génération d'un très intense signal de fluorescence à la contre-électrode. Les signaux en courant et en fluorescence présentent une très bonne similitude en forme, ce qui démontre la possibilité de conversion d'un courant faradique réducteur d'une espèce générique mesuré à une UME en émission de fluorescence. Il est à noter que pour obtenir un tel signal en fluorescence sans hystérésis, un flux d'argon d'une intensité suffisante doit être maintenu au-dessus du compartiment de la contre-électrode pendant la mesure, pour éviter l'accumulation de résorufine. Ce flux doit aussi être maintenu car l'Amplex Red tend à se photo-oxyder spontanément sous illumination en présence d'oxygène, ne serait-ce qu'à l'état de traces en solution [10]. Cela dit, l'avantage principal de l'utilisation de l'Amplex Red dans notre système est la très grande intensité de fluorescence générée. Si on se réfère à la Figure V.6, on peut voir qu'un courant d'1 nA est converti en une intensité de 40000 unités arbitraires (AU). Si on considère que le montage non optimisé que nous utilisons actuellement permet de façon stable la détection de 10 AUs, on peut immédiatement envisager que des courants de l'ordre de 1 pA peuvent facilement être détectés par mesure de signaux de fluorescence en utilisant l'Amplex Red comme rapporteur.

5. Un courant capacitif peut-il aussi être converti en fluorescence ?

En vue de la mesure de courants transitoires et de leur fluorescence associée, nous nous sommes demandé si un courant purement capacitif pouvait aussi être converti en fluorescence par notre schéma de conversion, de la même manière que les courants faradiques. Notre dispositif reposant sur le déclenchement d'une réaction faradique fluorogénique à la contre-électrode, cela revient à se demander si une telle réaction peut être couplée à un processus de charge de la double couche électrochimique à l'électrode de travail. Le couplage entre ces deux phénomènes est à première vue contre-intuitif, car dans le cas de la réaction faradique un échange d'électrons a lieu entre les espèces en solution et l'électrode, alors que pour un processus de charge capacitif les électrons ne franchissent pas l'interface électrode/solution (Figure V.7).

Pour répondre à cette interrogation expérimentalement, nous avons utilisé une surface conductrice en silicium, recouverte d'une couche isolante en Si/SiO₂ comme électrode de travail dans notre montage. A une telle électrode, le transfert faradique d'électrons est totalement bloqué. De plus, le compartiment de l'électrode de travail ne contenait pas d'espèce redox mais seulement l'électrolyte (0.1 M NaClO₄). Le compartiment de la contre-

électrode contenait une solution aqueuse de 0.25 mM Amplex Red dans un tampon PBS 0.1 M pH = 7.4. Une UME en carbone de 25 μm de diamètre a été utilisée comme contre-électrode. Les capacités de la double couche électrochimique de la WK et de la CE étaient d'environ 30 nF et 0.1 nF, respectivement. Une telle asymétrie garantit que le courant capacitif généré à l'électrode de travail ne peut pas être uniquement contrebalancé par un chargement capacitif à la contre-électrode.

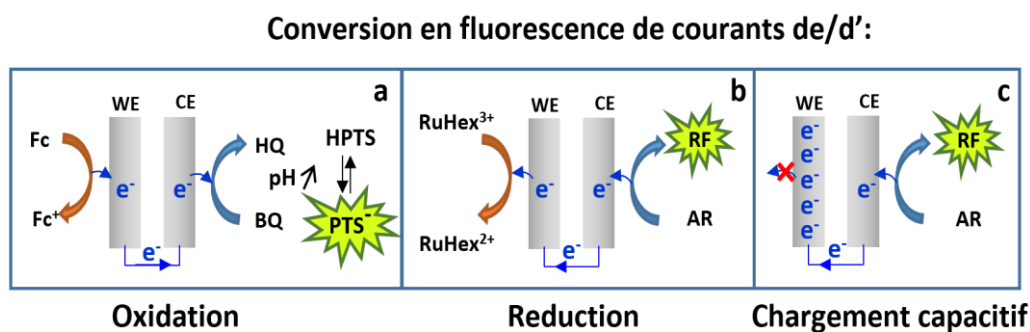


Figure V.7. Principe de conversion de courants de diverses natures, générés à l'électrode de travail, en émission de fluorescence à la contre-électrode. (a) Courant faradique oxydatif, p.ex. l'oxydation du ferrocène, couplée à la réduction de la benzoquinone transduite en fluorescence par l'HPTS. (b) Courant faradique réductif, p.ex. réduction du RuHex, couplée à l'oxydation fluorogène de l'Amplex Red (AR). (c) Courant de charge capacitif cathodique, couplé à l'oxydation de l'AR.

En balayant le potentiel de l'électrode de travail, à 0.01 Vs^{-1} , nous avons obtenu le CV représenté en Figure V.8a. Le signal de fluorescence correspondant, enregistré simultanément à l'UME contre-électrode est représenté en Figure V.8b. Le potentiel de la contre-électrode E_{CE} (Figure V.8c) et sa dérivée (Figure V.8d) sont aussi représentés.

Comme on peut le voir, le CV est parfaitement rectangulaire, ce qui indique qu'à cause de la couche épaisse de SiO_2 recouvrant l'électrode de travail, un courant purement capacitif y est généré. Malgré cela, si on compare la Figure V.8a et V.8b, on voit que lorsque le potentiel est balayé cathodiquement, un signal de fluorescence intense est généré à la contre-électrode. A l'opposé, lorsque le sens de balayage du potentiel est inversé, le signal de fluorescence décroît rapidement à zéro. Un tel comportement indique que durant le balayage cathodique du potentiel, au moins une partie du courant capacitif mesuré à l'électrode de travail a été contrebalancé par le courant anodique dû à l'oxydation de l'Amplex Red à la contre-électrode. Durant le balayage retour, le courant capacitif à l'électrode de travail est devenu anodique et ne pouvait donc pas être compensé par l'oxydation de l'Amplex Red, qui donc a immédiatement cessé et par conséquent la fluorescence s'est éteinte rapidement. Ce déroulement peut être confirmé par l'examen des variations du potentiel de la contre-électrode enregistrées durant le CV, Figure V.8c et V.8d.

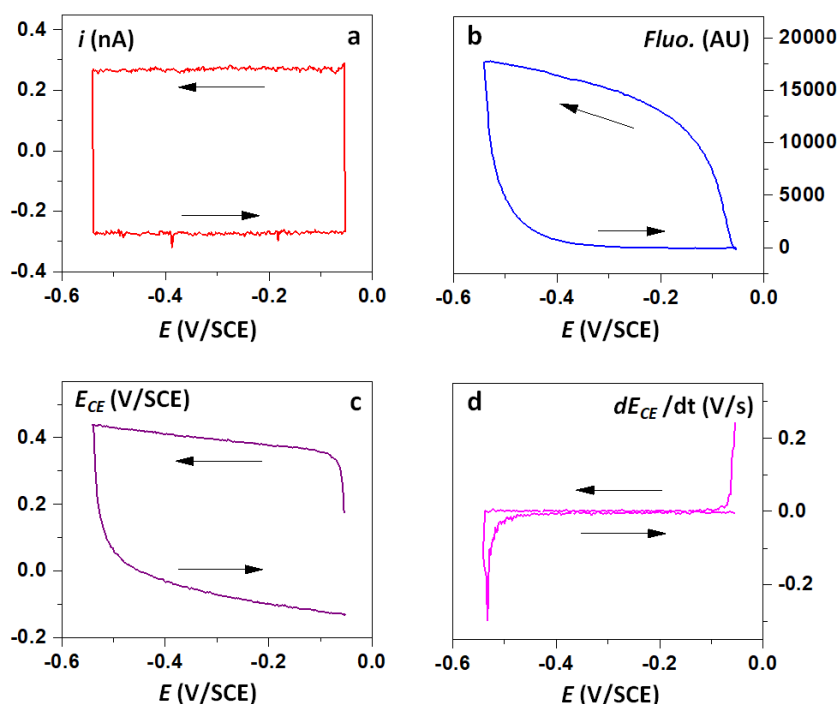


Figure V.8. Conversion d'un courant capacitif en émission de fluorescence. (a) CV purement capacitif enregistré à une électrode de travail en Si/SiO₂ (surface de 2 cm², capacité C = 30 nF) dans une solution électrolyte de 0.1 M NaClO₄. (b) Signal de fluorescence correspondant enregistré simultanément à l'UME contre-électrode en carbone de 25 μm de diamètre (C = 0.1 nF) immergée dans une solution d'Amplex Red. (c) Potentiel de la contre-électrode (E_{CE}) mesuré pendant le CV. (d) Dérivée temporelle du potentiel de la contre-électrode. Le compartiment de la contre-électrode contenait 0.25 mM AR dans du tampon PBS 0.1 M pH = 7.4. Vitesse de balayage 0.01 Vs⁻¹. La polarité du courant a été inversée.

On peut en effet observer qu'au début du balayage, le potentiel de la contre-électrode augmente rapidement, à une vitesse instantanée dE_{CE}/dt de l'ordre de quelques centaines de millivolts par seconde. Ce changement abrupt de la valeur de E_{CE} génère un courant capacitif anodique à la contre-électrode qui contrebalance exactement le courant de charge initial à l'électrode de travail. Cependant, une fois que le potentiel atteint +0.35 V/SCE, qui correspond au début de l'oxydation de l'Amplex Red (Figure AV.3), le potentiel de la contre-électrode se stabilise quasiment, et ne variant que très lentement, à environ 2 mV/s. Après l'inversion du sens de balayage, on voit que le potentiel de la contre-électrode varie initialement rapidement, pour générer assez de courant capacitif permettant de contrebalancer le courant de l'électrode de travail. Ensuite E_{CE} varie beaucoup plus lentement et tend vers -0.1 V/SCE, indiquant qu'à ce potentiel une réaction réductive non-définie se produit à la contre-électrode.

Ces observations démontrent qu'un courant capacitif généré à l'électrode de travail peut à l'évidence être contrebalancé par un courant faradique à la contre-électrode. Ce couplage entre une réaction faradique se produisant à une électrode et un effet de charge capacitif se

produisant à une autre électrode n'a été que rarement observé directement. Autant que nous le sachions, un tel cas n'a été décrit qu'une seule fois dans la littérature, par Bard et al. [11]. Ces auteurs ont observé la génération d'une réaction faradique d'électrochimiluminescence à une électrode de travail couplée au chargement capacitif de la contre-électrode. Depuis, il a été démontré de manière théorique qu'un tel « couplage capacitif » était nécessaire pour permettre le cyclage redox d'une molécule unique entre deux électrodes [12]. Plus généralement, il a été souligné que ce phénomène, négligé aux échelles usuelles, devenait incontournable pour l'interprétation des expériences de nano-électrochimie à l'échelle de la molécule unique [13].

Pour ce qui nous concerne, nous avons démontré qu'un courant capacitif peut tout à fait être transduit en émission de fluorescence par notre système de conversion. Cependant, nous avons également vu que les signaux de courant et de fluorescence ne présentent alors pas une similitude parfaite en forme (comparer Figure V.8a et V.8b). Cela est dû au fait que lorsque le potentiostat ajuste le potentiel de la contre-électrode, il génère un courant capacitif qui peut être suffisant pour contrebalancer une partie du courant généré à l'électrode de travail, jusqu'à ce que le potentiel de la contre-électrode atteigne une valeur où la réaction faradique fluorogénique est déclenchée. Dans le cas général, les courants capacitifs peuvent donc contribuer à la génération de fluorescence, en parallèle aux courants faradiques, mais dans une mesure qui dépend du système expérimental étudié. Par exemple, pour les courants transitoires représentés en Figure V.5, nous avons démontré que la contribution de courants capacitifs existait, mais était négligeable (voir Figure AV.4).

6. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons confirmé qu'un courant faradique cathodique généré à une électrode sous contrôle potentiostatique pouvait être quantitativement couplé à une émission de fluorescence par une espèce fluorogénique à la contre-électrode, en utilisant le montage simple présenté dans le chapitre précédent. Nous avons abordé expérimentalement certaines des limites de cette configuration et étendu ses possibilités. Nous avons notamment identifié l'accumulation d'espèces fluorescentes dans le champ de vue du microscope à épifluorescence comme un phénomène parasite, qui limite notablement la bande passante du processus de conversion courant/fluorescence. Nous avons montré qu'une telle accumulation pouvait être grandement et simplement atténuée par une légère convection de la solution, par exemple en libérant un faible flux de gaz inerte au-dessus de la solution.

Nous avons aussi démontré la possibilité d'utilisation dans notre schéma de conversion d'un système basé sur un rapporteur fluorogénique modulé par le pH, le système HPTS/BQ. Nous avons montré que ce système pouvait être rendu insensible au problème d'accumulation de fluorescence, par l'addition d'un acide dans la solution. Cependant, nous avons aussi mis en évidence que l'ajout d'acide pouvait induire à la fois un changement préjudiciable du chemin réactionnel de la réduction de BQ et une diminution de l'intensité de la fluorescence. Néanmoins, nous avons montré que si un acide faible est utilisé pour acidifier la solution, des conditions optimales peuvent être trouvées où la conversion en fluorescence de courants faradiques stationnaires et transitoires peut être réalisée.

L'utilisation de notre système de conversion a été étendue à la conversion en fluorescence de courants faradiques anodiques, par l'utilisation de l'Amplex Red comme rapporteur fluorogénique. Nous avons observé que ce système générait des signaux de fluorescence particulièrement intenses, permettant l'obtention d'un indice de conversion (indicatif) de 40000 AU par nA. Enfin, nous avons voulu savoir si un courant purement capacitif pouvait également être converti en un signal de fluorescence. Nous avons montré que c'était effectivement le cas, et ce faisant, nous avons décrit un cas rarement observé de couplage entre une réaction faradique à une électrode et un processus purement capacitif à une autre électrode.

Des perspectives ouvertes par les résultats rapportés dans ce chapitre, celle de convertir de *petits courants transitoires* en signaux lumineux nous a paru particulièrement attractive. Aussi avons cherché en priorité à améliorer les performances de notre convertisseur en termes de bande passante, laissant l'accroissement de sa sensibilité pour plus tard.

Notre objectif immédiat est de mettre à profit la possibilité de convertir des courants transitoires en signaux de fluorescence pour la détection de la collision de nanoparticules avec des microélectrodes. Il s'agit là d'une thématique d'actualité en nanoélectrochimie, pour laquelle se fait sentir un besoin de techniques permettant la mesure de petits courants, allant de quelques dizaines de picoampères au nanoampère, donc déjà à portée de notre dispositif, avec une bande passante élevée. Il faut pour cela être capable de résoudre en temps les multiples collisions *répétées et rapides* (probablement séparées de 10-100 μ s, d'après des simulations) de nanoparticules individuelles avec l'électrode, qui, faute d'une bande passante supérieure à ~ 10 kHz, ne sont pas correctement résolues par les mesureurs de courant commerciaux. Aussi chercherons nous à savoir si la conversion en fluorescence de la collision des nanoparticules

par notre dispositif permet d'atteindre (ou d'approcher) la bande passante requise pour la détection d'évènements de collisions multiples de particules uniques.

Nous voulons également explorer la possibilité de remplacer l'émission de fluorescence à la contre électrode, comme mécanisme de transduction courant/lumière, par la génération d'électrochimiluminescence (ECL) à cette même électrode. En effet en ECL les espèces émettrices de lumière sont par nature transitoires, c'est à dire que leur durée de vie est très limitée. On s'attend donc à ce que cela réduise très fortement l'accumulation spatiale de luminescence au voisinage de l'électrode, améliorant à priori d'autant la bande passante de notre convertisseur.

Références du chapitre

- [1] M. Yang, C. Batchelor-Mcauley, E. Kätelhön, and R. G. Compton, “Reaction Layer Imaging Using Fluorescence Electrochemical Microscopy,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 12, pp. 6870–6877, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b01360.
- [2] M. Quan, D. Sanchez, M. F. Wasylkiw, and D. K. Smith, “Voltammetry of Quinones in Unbuffered Aqueous Solution: Reassessing the Roles of Proton Transfer and Hydrogen Bonding in the Aqueous Electrochemistry of Quinones,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 42, pp. 12847–12856, Oct. 2007, doi: 10.1021/ja0743083.
- [3] R. Djoumer *et al.*, “Converting Any Faradaic Current Generated at an Electrode under Potentiostatic Control into a Remote Fluorescence Signal,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 10, pp. 6775–6782, May 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00851.
- [4] X. Gao, J. Lee, and H. S. White, “Natural Convection at Microelectrodes,” *Anal. Chem.*, 1995, doi: 10.1021/ac00105a011.
- [5] N. Baltes, L. Thouin, C. Amatore, and J. Heinze, “Imaging concentration profiles of redox-active species with nanometric amperometric probes: Effect of natural convection on transport at microdisk electrodes,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2004, doi: 10.1002/anie.200352662.
- [6] C. Amatore, C. Pebay, L. Thouin, A. Wang, and J. S. Warkocz, “Difference between ultramicroelectrodes and microelectrodes: Influence of natural convection,” *Anal. Chem.*, 2010, doi: 10.1021/ac101210r.
- [7] S. M. Oja, J. P. Guerrette, M. R. David, and B. Zhang, “Fluorescence-Enabled Electrochemical Microscopy with Dihydroresorufin as a Fluorogenic Indicator,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 12, pp. 6040–6048, 2014, doi: 10.1021/ac501194j.
- [8] V. Sundaresan *et al.*, “Visualizing and Calculating Tip-Substrate Distance in Nanoscale Scanning Electrochemical Microscopy Using 3-Dimensional Super-Resolution Optical Imaging,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 922–928, Jan. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04073.
- [9] P. Lefrançois *et al.*, “Direct oxidative pathway from amplex red to resorufin revealed

- by: In situ confocal imaging,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 37, pp. 25817–25822, 2016, doi: 10.1039/c6cp04438g.
- [10] B. Zhao, F. A. Summers, and R. P. Mason, “Photooxidation of Amplex red to resorufin: Implications of exposing the Amplex red assay to light,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 53, no. 5, pp. 1080–1087, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.034.
- [11] C.-Y. Liu and A. J. Bard, “Electrochemistry and Electrogenenerated Chemiluminescence with a Single Faradaic Electrode,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 16, pp. 5339–5343, Aug. 2005, doi: 10.1021/ac050389e.
- [12] S. W. Feldberg and M. A. Edwards, “Current Response for a Single Redox Moiety Trapped in a Closed Generator-Collector System: The Role of Capacitive Coupling,” *Anal. Chem.*, 2015, doi: 10.1021/ac504375j.
- [13] A. Oleinick, I. Svir, and C. Amatore, “A few key theoretical issues of importance in modern molecular electrochemistry,” *Current Opinion in Electrochemistry*. 2019, doi: 10.1016/j.coelec.2018.10.008.

Annexe du chapitre V

1. Réduction de BQ en présence d'HPTS, résultats de simulation

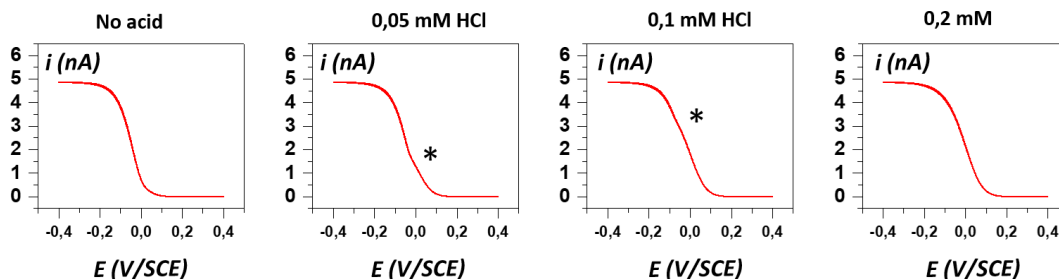


Figure AV.1. Voltammogrammes simulés correspondant à la réduction de BQ (1 mM) en présence d'HPTS (2 mM) à une électrode de travail de 25 µm de diamètre, pour différentes concentrations en HCl ajoutées. On voit que l'apparition de la pré-vague (indiquée par un astérisque), observée expérimentalement, est bien reproduite par la simulation. La polarité du courant a été inversée.

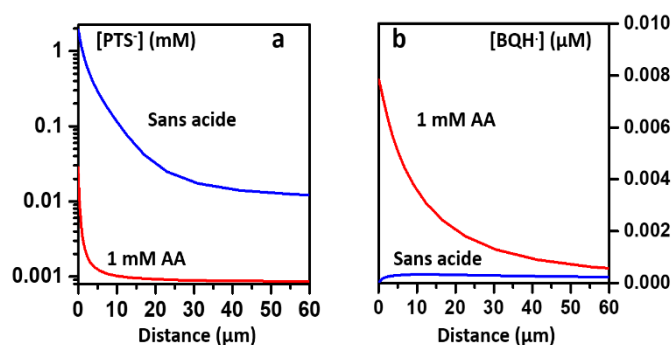


Figure AV.2. Résultats de simulation de la réduction de BQ (1 mM) en présence d'HPTS (2 mM) à une électrode de travail de 25 µm de diamètre. (a) Profil de concentration de l'espèce fluorescente PTS^- produite à l'électrode, en l'absence (courbe bleue) et en présence (courbe rouge) d'1 mM d'acide acétique. (b) Profil de concentration de l'espèce BQH^- . $E = -0.3 \text{ V/SCE}$.

La Figure AV.2a représente les profils de diffusion des espèces PTS^- produites à une électrode de 25 µm de diamètre, dans une solution d'HPTS/BQ, en présence et en l'absence d'acide acétique (AA), calculés par le logiciel DigiElch. Nous observons qu'en l'absence d'acide, la couche de diffusion des espèces PTS^- s'étend au-delà de 20 µm, tandis qu'en présence d'AA la couche de réaction n'est que de quelques µm d'épaisseur. Un tel résultat illustre la réduction de l'accumulation de PTS^- en présence d'acide, qui mène à une réduction de l'hystérésis sur les CVF.

La Figure AV.2b représente les profils de diffusion de l'espèce BQH^- produite dans les mêmes conditions. On peut observer que l'addition d'un acide à la solution HPTS/BQ provoque l'apparition de BQH^- , mettant en évidence que le mécanisme de réduction suit alors le chemin bleu représenté dans le Schéma V.2 du chapitre V.

2. Voltammétrie et voltfluorométrie cycliques du système fluorogénique Amplex Red

Nous avons enregistré simultanément des voltammogrammes et voltfluorogrammes cycliques à une UME en platine de 25 μm de diamètre dans une solution de 0.25 mM Amplex Red, dans un montage à 3 électrodes classique, où la fluorescence est suivie à l'électrode de travail.

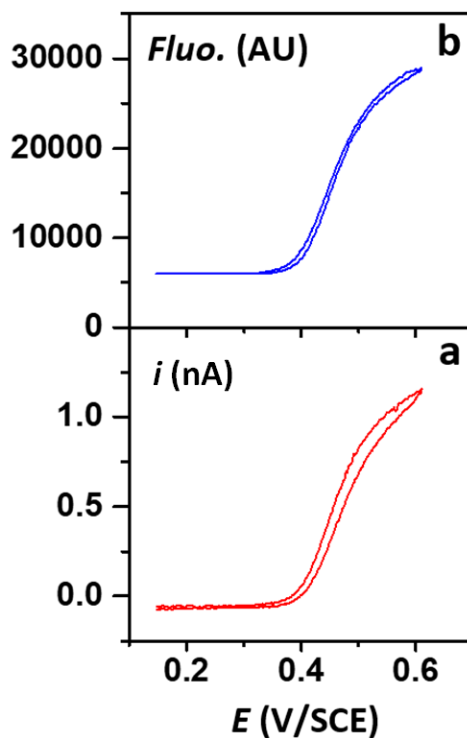


Figure AV.3. Voltammétrie et voltfluorométrie du système fluorogénique Amplex Red. (a) Voltammogramme cyclique (CV) d'une solution contenant 0.25 mM Amplex Red à une UME en platine de 25 μm de diamètre. Electrolyte : tampon PBS pH = 7.4. (b) Voltfluorogramme enregistré simultanément au CV.

3. Conversion d'un courant faradique en émission de fluorescence, contribution du courant capacitif

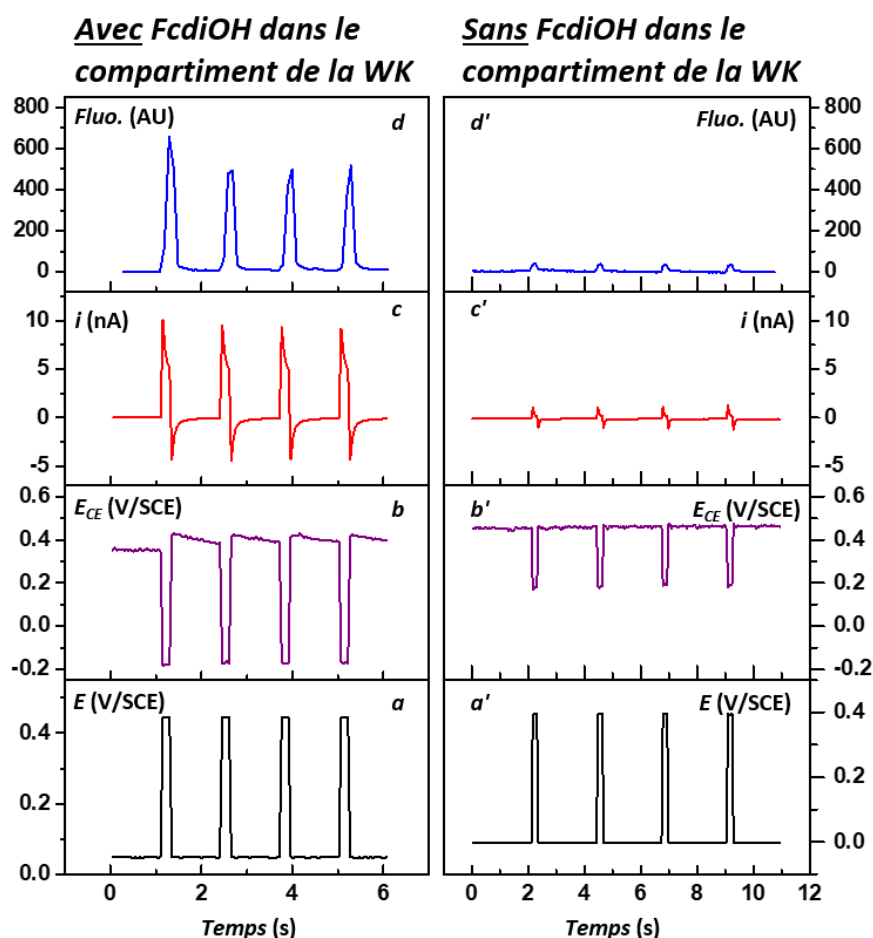


Figure AV.4. Conversion d'un courant faradique transitoire en émission de fluorescence, par le système HPTS/BQ optimisé. Le compartiment de l'électrode de travail contenait : (Gauche) 1 mM ferrocène diméthanol dans une solution de 0.1 M NaClO₄. (Droite) seulement 0.1 M NaClO₄. (a-a') Série de quatre impulsions en potentiel appliquées à l'électrode de travail de 25 μ m de diamètre en platine. (b-b') Variations résultantes du potentiel de la contre électrode E_{CE} . (c-c') Variations du courant à l'électrode de travail. (d-d') Variations de l'émission de fluorescence correspondante, enregistrées à la contre-microélectrode. Le compartiment de la contre électrode contenait 1 mM benzoquinone, 2 mM HPTS dans une solution de 0.1 M KCl et 0.4 mM acide acétique. La contre électrode était une UME en carbone de 25 μ m de diamètre.

En présence d'1 mM ferrocène diméthanol (FcdiOH) dans le compartiment de l'électrode de travail (courbes a,b,c,d), des impulsions anodiques en potentiel appliquées à l'électrode de travail génèrent un courant de l'ordre de quelques nA, correspondant à l'oxydation du FcdiOH (Figure AV.4c). Simultanément, le potentiel de la contre électrode E_{CE} a chuté brusquement à - 0.17 V/SCE (Figure AV.4b). Cette valeur de potentiel se situe bien dans la zone de réduction de BQ (cf. Figure V.1), s'ensuit d'intenses pics de fluorescence (Figure AV.4d).

En l'absence de ferrocène diméthanol (courbes a',b',c',d') un courant purement capacitif de faible intensité est enregistré à l'électrode de travail (en b'). La valeur de E_{CE} n'atteint que + 0.18 V/SCE (en b'), un potentiel où la réduction de BQ débute à peine. En ont résulté des pics d'émissions de fluorescence de faible intensité (en d').

En comparant les figures AV.4d et AV.4d', on voit que l'émission de fluorescence due au couplage capacitif est beaucoup plus faible que celle associée à l'oxydation du ferrocène diméthanol. Par conséquent, les variations de fluorescence présentées en Figure V.5 convertissent essentiellement le courant d'oxydation du ferrocène diméthanol et ne sont que marginalement affectées par les effets capacitifs.

Chapitre VI

**Convertir un courant faradique généré à une
électrode sous contrôle potentiostatique en une
émission lumineuse par électrochimiluminescence
(ECL)**

Convertir un courant faradique généré à une électrode sous contrôle potentiostatique en une émission lumineuse par électrochimiluminescence (ECL)

1. Introduction

Ce court chapitre a pour but d'évoquer des résultats préliminaires utilisant l'électrochimiluminescence (ECL) comme alternative à la fluorescence redox dans le schéma de conversion d'un courant faradique en un signal lumineux simultané. L'ECL désigne les phénomènes d'émission de lumière à la surface d'une électrode, initiés par un transfert d'électron et impliquant une série de réactions en phase homogène produisant *in fine* une molécule dans un état excité luminescent [1]. Les systèmes ECL les plus couramment employés sont ceux fonctionnant avec l'emploi d'un luminophore et d'un co-réactif en solution, selon un mécanisme qui entraîne intrinsèquement le « confinement spatial » de l'espèce émettrice de photons au sein d'une couche réactionnelle étroite, très proche du plan de l'électrode [2]. En effet, puisque le temps de déclin à l'état excité du luminophore est généralement de l'ordre de quelques dizaines de nano-secondes, il n'a donc « pas le temps » de s'accumuler au voisinage lointain de l'électrode et d'y émettre le photon. Comme évoqué précédemment pour le système fluorogénique HPTS/BQ/AA, c'est exactement cet effet-là qui est recherché pour bénéficier d'une bonne « bande passante » dans le schéma de conversion courant/lumière. Par ailleurs, ces processus ne requérant aucune source de lumière excitatrice, le problème du « background » lumineux résiduel est minime en ECL, contrairement à la mesure d'une fluorescence en champs lointain. En misant sur ces mérites, une récente preuve de principe, publiée par l'équipe de Bo Zhang dans une configuration à électrochimie bipolaire, a montré qu'il peut être viable d'utiliser l'ECL comme signal lumineux rapportant la détection d'événements faradiques transitoires [3]. Aussi, en vue de mettre au point un schéma de conversion courant/ECL par le biais de notre configuration potentiostatique plus universelle, un travail prospectif a été récemment initié.

Deux systèmes ECL modèles à co-réactif sont proposés, d'abord le mélange contenant le complexe luminophore tris(bipyridine)ruthénium(+II) et le co-réactif tripropylamine (système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$), qui produit en électrooxydation l'espèce à l'état excité $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ émettant un photon à $\lambda = 630 \text{ nm}$ [2], puis un second système constitué d'un dérivé du luminol appelé L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)-

dione), dont la dégradation par oxydation à l'électrode en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit une espèce émissive d'un photon à $\lambda = 450 \text{ nm}$ [4]. Pour établir une preuve de principe qu'une émission ECL peut retranscrire de manière conforme un faible signal faradique, on s'appuie en premier lieu, comme cela a été fait pour les systèmes électrofluorogéniques, sur la mesure, en condition stationnaire par CV « lent », du courant produit par le système ECL à une UME placée en électrode de travail, et simultanément de l'intensité lumineuse capturée optiquement à la surface.

2. Suivi de l'ECL produite à une UME par le système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$

Le couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ est le système ECL de référence présentant la plus forte efficacité d'émission en milieu aqueux, et il a de ce fait été utilisé à d'innombrables reprises notamment pour des applications électroanalytiques [1],[5]. Les aspects mécanistiques fondamentaux de cette ECL anodique ont fait l'objet dès les années 1990 d'études approfondies, notamment par l'équipe d'Allen J. Bard. Plusieurs mécanismes aboutissant à la génération du signal ECL sont évoqués, dépendant fortement des conditions expérimentales (nature de l'électrode, rapport des concentrations en complexe luminophore/co-réactif, pH, potentiel appliqué). Deux mécanismes dits à « oxydation réductrice » sont d'intérêt ici, montrés Figure VI.1 [6], se basant sur l'oxydation concomitante à l'électrode du luminophore et du co-réactif en milieu tamponné à pH proche de 7.

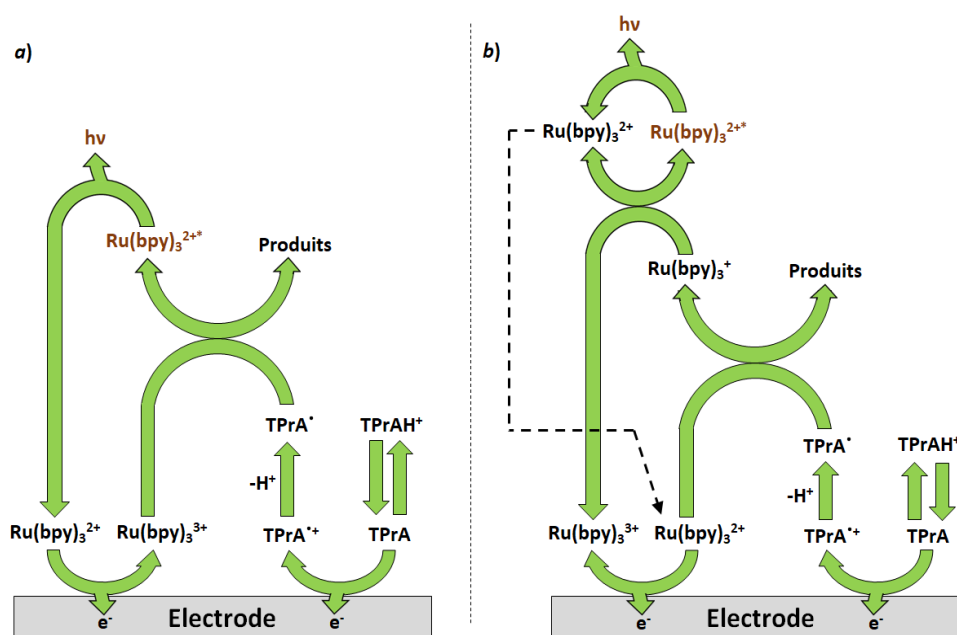


Figure VI.1. Schémas représentant les deux principaux mécanismes ECL du système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$

Par la voie décrite Figure VI.1a, l'application d'un potentiel suffisamment anodique oxyde le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et la TPrA en espèces, respectivement $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ et $\text{TPrA}^{\cdot+}$. Après déprotonation du radical cation en espèce TPrA^{\cdot} fortement réductrice, cette dernière réduit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ en produisant l'espèce à l'état excité $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ luminescente, donnant lieu à l'émission ECL. Un second mécanisme, présenté Figure VI.1b, montre que le radical TPrA^{\cdot} électrogénéré par oxydation de TPrA pourrait directement réduire le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^+$. L'émission ECL se produit alors par une réaction d'annihilation entre l'état + I et + III du complexe, qui aboutit à la production de l'état luminescent $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$.

Pour l'acquisition courant/ECL avec ce système, la surface d'une UME de 25 μm fabriquée en carbone graphitique est observée à travers une cellule liquide à fond plat transparent via l'objectif 40X d'un microscope inversé, équipé d'une caméra CMOS. La Figure VI.2 montre l'allure du CV et du « voltECLuminogramme » simultané acquis à 0,01 V/sec à l'UME, placée dans typiquement un tampon phosphate à 0,1 M à pH = 7,4 contenant 1 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 100 mM de TPrA.

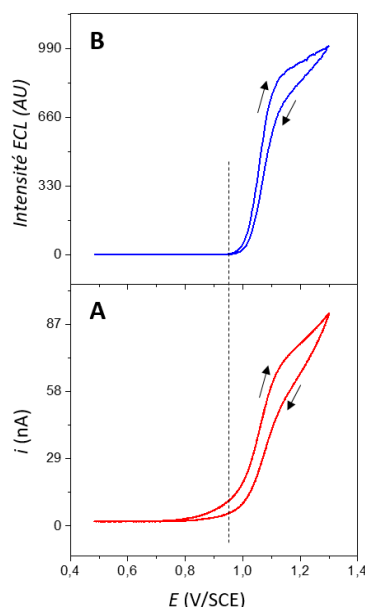


Figure VI.2. (A) CV sur une UME en carbone de 25 μm de diamètre en présence de 1 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 100 mM TPrA. (B) Intensité ECL mesurée simultanément. Conditions : 0.1 M tampon phosphate (pH = 7.4), vitesse de balayage 10 mVs^{-1} . La ligne verticale en pointillés marque le potentiel seuil de l'émission ECL.

Au cours du balayage anodique (aller) du potentiel, de + 0,3 à 1,3 V/SCE, le courant faradique (tracé en rouge) commence à croître à partir de +0,75 V/SCE sous la forme d'une pré-vague, attribuée à l'oxydation de TPrA. Le courant augmente nettement ensuite à partir de + 0,95 V, du fait de l'oxydation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, jusqu'à atteindre un pseudo-plateau

d'intensité au-delà de 70 nA. Etant donné que dans cette fenêtre de potentiel commence vraisemblablement l'oxydation des molécules d'eau, le courant ne se stabilise pas en un vrai plateau stationnaire mais a plutôt un aspect pentu.

Sur la courbe du suivi de l'intensité ECL (tracé en bleu) au cours du CV, aucune émission lumineuse n'est mesurée au niveau de la pré-vague du TPrA, l'ECL n'étant significativement générée qu'à partir de la montée abrupte en courant correspondant à l'oxydation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, au-delà de + 0,95 V. Un aspect à souligner est que l'intensité ECL mesurée lors du balayage de potentiel retour est très légèrement inférieure à celle du balayage aller, comme cela peut l'être pour le signal en courant sur le CV à cause de la contribution capacitive au courant global d'électrode. Comme montré avec le système fluorogénique optimisé BQ/HPTS/AA, ce résultat se produit quand le mécanisme réactionnel permet de confiner le luminophore aux abords de l'UME, en évitant son accumulation au voisinage lointain de la surface qui se manifeste sinon par une hystérèse diffusionnelle « inverse ». A la pré-vague près, les deux signaux, en courant faradique et en ECL, sont donc relativement conformes. Cependant, dans l'optique d'utiliser, dans le schéma du convertisseur, ce signal ECL anodique comme *rapporteur* (à la CE) d'un courant cathodique de faible intensité mesuré à WK (voir configuration convertisseur courant/lumière), l'existence de la pré-vague d'oxydation de TPrA non génératrice de lumière pose problème. En effet, un signal en courant d'intérêt de quelques nA à la WK se verrait alors compensé par ce seul courant de pré-vague à la CE, sans que le potentiel de cette dernière n'ait besoin d'être amené par le potentiostat à une valeur plus anodique capable de produire l'ECL. Pour éviter cela, on a cherché à savoir si l'apparition de cette pré-vague faradique peut être évitée, en jouant simplement sur les conditions expérimentales, comme le rapport des concentrations molaires en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et TPrA ou le pH de la solution. Aucune situation favorable n'a pu être obtenue, la diminution de la pré-vague vue dans certains cas s'accompagnant inévitablement d'une chute drastique de l'intensité ECL. En changeant la nature de l'électrode, en utilisant par exemple des UME en métal noble comme l'or ou le platine à la place du graphite, s'ajoute alors du courant faradique, en aval de la vague ECL à 0,95 V, lié à la croissance électrochimique d'une couche d'oxyde. Ces essais sur le système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ /TPrA méritent peut-être plus d'investigations, mais étant donné que le second système ECL, présenté ci-après, apparaît *immédiatement* plus prometteur, nos efforts se sont surtout portés sur ce dernier.

3. Suivi de l'ECL produite à une UME par le système L-012/H₂O₂

Le composé L-012, qui est un dérivé du luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) bien connu en chimiluminescence, participe à une réaction ECL anodique, en milieu neutre ou basique et en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), libérant un photon dans le bleu ($\lambda = 450$ nm). Sans que l'on en connaisse encore trop les raisons, l'efficacité du processus ECL du L-012 est réputée bien supérieure à celle utilisant le luminol. Une autre raison de son usage prédominant sur le luminol en électrochimie (bio)analytique est qu'il fonctionne à pH physiologique. Partant de considérations mécanistiques analogues à l'ECL du luminol [7], un mécanisme simplifié de la réaction en milieu basique est montré Figure VI.3.

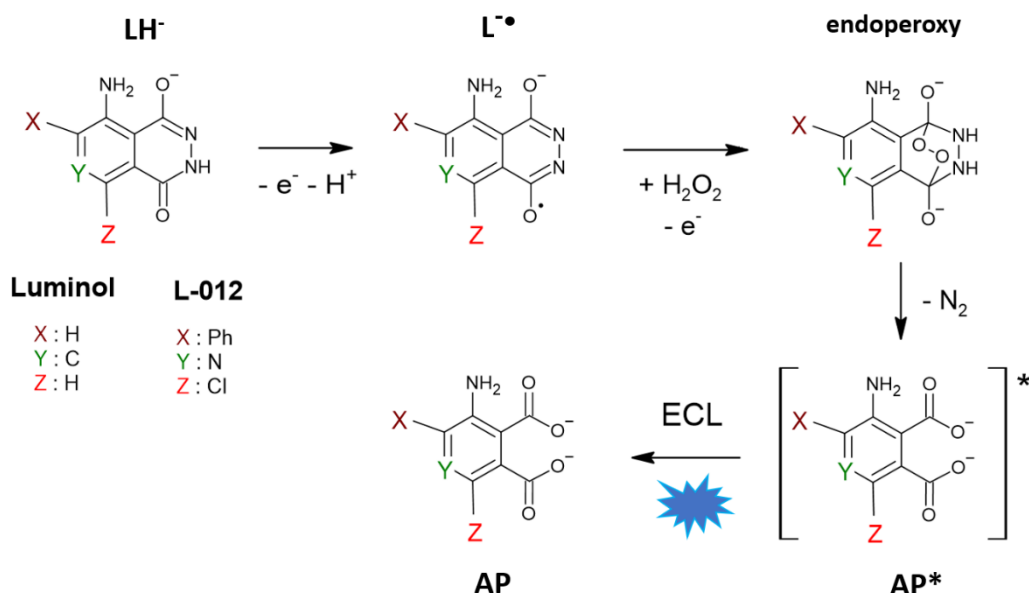


Figure VI.3. Mécanisme simplifié du processus ECL du luminol ou son dérivé L-012 en présence de H₂O₂ en milieu basique.

L'émission ECL se produit après oxydation à l'électrode de la forme déprotonée de la molécule (LH⁻), conduisant à un intermédiaire radical anion (L^{•-}), qui, sous l'action d'espèces réactives de l'oxygène produites à partir de l'oxydation de H₂O₂, donne un second intermédiaire à pont endoperoxy, se dégradant finalement par la perte d'un équivalent de diazote en anion aminophthalate (AP) généré à l'état excité. Le retour à l'état fondamental de AP* provoque l'émission lumineuse à 450 nm.

La Figure VI.4 montre l'allure du CV et du « voltECLuminogramme » simultanés acquis à 0,01 V/sec à une UME de carbone (25 μ m de diamètre) dans une solution de tampon carbonate à pH = 10 contenant 1 mM de L-012 et 1 mM de H₂O₂.

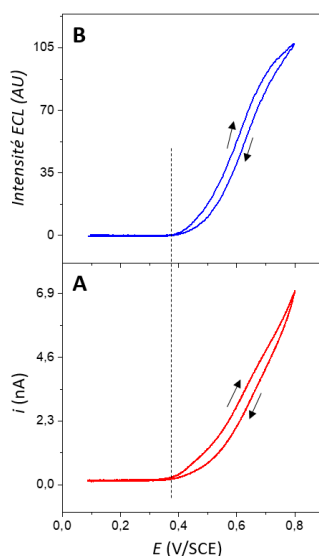


Figure VI.4. (A) CV sur une UME en carbone de 25 μm de diamètre enregistré en présence de 1 mM L-012 et 1 mM H_2O_2 . (B) Intensité ECL mesurée simultanément à la surface de l'UME. Conditions : 0.1 M tampon carbonate (pH = 10), vitesse de balayage 10 mVs^{-1} . La ligne verticale en pointillés marque le potentiel seuil de l'émission ECL.

Le CV se présente sous la forme d'une montée constante du courant d'oxydation, qui démarre à partir de + 0,38 V/SCE, associé à l'oxydation du L-012 et/ou de H_2O_2 . On remarque que l'allure du CV obtenu n'est pas sigmoïdale, le courant continuant d'augmenter au lieu de former un plateau stationnaire, pour une raison non définie à ce stade. Sur ce point, nous avons remarqué qu'en augmentant la concentration en H_2O_2 (par exemple à 10 mM), la réponse en courant de l'électrode se dégrade à chaque cycle de potentiel supplémentaire, et particulièrement lorsque le potentiel appliqué dépasse 0,6 V/SCE. Ce phénomène est mis sur le compte de la possible « passivation » anodique de la surface de graphite, dont l'origine pourrait être la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Nous choisissons donc de limiter la concentration en H_2O_2 à 1 mM.

Le suivi de l'ECL émise simultanément à l'UME pendant le CV, présenté Figure VI.4B, montre un signal dont l'allure est très similaire à celle du CV, se présentant sans hystérésis « inverse » entre les balayages aller et retour, une caractéristique remarquable qui est donc commune aux deux systèmes ECL étudiés ici. La simultanéité des signaux en courant et en ECL est de très bon augure pour envisager le développement d'une transduction courant/ECL de signaux faradiques de quelques nA (ou moins) par ce système L-012/ H_2O_2 . Le seul bémol est ici que l'intensité lumineuse émise est moindre que pour le système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$, ce qui était attendu au regard de l'efficacité ECL comparée des deux systèmes, et entraîne que le facteur de sensibilité de conversion sera de fait moins élevé. Augmenter la concentration en

L-012 au-dessus de 1 mM ne permet pas, comme nous l'avons essayé, de produire plus de lumière à l'électrode.

Pour démontrer que le système L-012/H₂O₂ peut retranscrire de manière conforme, par une émission ECL à la CE, tout courant électrochimique cathodique produit par une réaction « classique » à la WK, nous utilisons pour ce faire le ruthéniumhexaamine(III) (ou RuHex) comme espèce redox d'intérêt.

Dans le schéma du convertisseur (voir Figure IV.2, chapitre IV), le compartiment de la WK contient une solution de 1 mM de RuHex dans 0.1 M KCl, et celui de la CE le mélange de 1 mM en L-012 et 1 mM de H₂O₂ dans le tampon carbonate à 0.1 M. La WK est une UME d'or de diamètre 25 µm, celle en CE restant l'électrode de carbone graphitique employée en partie 2 du présent chapitre. La Figure VI.5A montre le CV, d'allure sigmoïdale, typiquement obtenu à 0,01 V/sec dans la solution de RuHex, entre + 0,15 et – 0,24 V/SCE, de courant de plateau légèrement supérieure à 4 nA. L'intensité ECL mesurée simultanément à la CE est, comme on peut l'observer en Figure VI.5B, en quasi parfaite conformité avec le CV. Ceci est confirmé par le tracé quasi linéaire de l'intensité ECL en fonction du courant montré en Figure VI.5C. Ce résultat valide l'emploi de ce système ECL pour la conversion simultanée de courants faradiques. En comparaison avec les résultats de transduction par fluorescence redox, l'absence d'effet de dispersion diffusionnelle de l'espèce émettrice de photons au voisinage lointain de l'UME, qui est propre aux systèmes ECL, permet de convertir un courant faradique stationnaire de faible intensité en émission lumineuse sans nul besoin d'avoir à corriger un effet hystérésis « inverse » sur le signal lumineux.

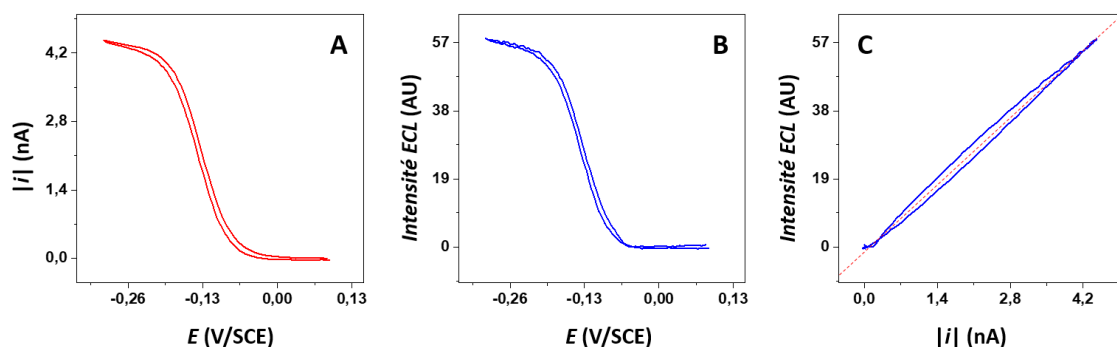


Figure VI.5. Conversion d'un courant faradique cathodique en émission ECL. (A) Voltammogramme cyclique du RuHex à une UME électrode de travail en or de 25 µm de diamètre. (B) Intensité ECL enregistrée simultanément à une UME contre-électrode en carbone de 25 µm de diamètre. (C) Intensité ECL en fonction du courant de la WK. Les compartiments de l'électrode de travail et de la contre-électrode contenaient respectivement 1 mM RuHex dans une solution aqueuse de 0.1 M KCl, et 1 mM L-012, 1 mM H₂O₂ dans un tampon carbonate 0.1 M pH = 10. Vitesse de balayage de 0.01 V s⁻¹.

Ce résultat prometteur, associé à un très bon rapport signal/bruit et une excellente reproductibilité des signaux, nous encourage désormais à mettre au point une méthode de détection de signaux faradiques transitoires associés à la collision aléatoire de nanoparticules (NP) à une UME, par le biais d'une transduction ECL.

4. Couplage de collisions de nanoparticules de platine à une UME polarisée avec une émission ECL indépendante par le système L-012/H₂O₂.

Le concept d'électrochimie dite « à nano-impact », qui a donné lieu à de très nombreux travaux ces dernières années, consiste à mesurer le courant faradique signalant un événement de collision d'une nanoparticule à la surface d'une UME. Ce domaine récent de la nanoélectrochimie analytique permet, par une approche expérimentale très simple, de caractériser la réactivité électrochimique de nanoparticules et autres nano-objets à l'échelle de l'entité unique.

Pour démontrer la faisabilité du schéma de conversion courant/ECL utilisant le système L-012/H₂O₂, un système modèle de collision a été choisi, celui des NP de platine sur UME de carbone. En milieu légèrement acide, et à potentiel légèrement cathodique (-0,5 V/SCE), « l'impact » d'une NP catalyse localement la réduction de protons en dihydrogène, ce qui se traduit par un « pic » de courant faradique distinguable au-dessus du courant de « background » de l'UME de carbone, matériau inerte vis-à-vis de la réduction des protons au potentiel d'électrode choisi. Le mécanisme de cette collision/catalyse est a priori multi-étapes, donnant d'abord lieu à une phase d'adsorption des atomes d'hydrogène, suivi de la combinaison de deux atomes pour libérer H₂ [8].

Pour l'expérience de collision de NP de platine sur UME de carbone, la stabilité de la solution colloïdale est indispensable. L'électrolyte et le pH ont été ici choisis selon des préconisations de la littérature : la concentration en protons dans la solution doit être inférieure à 1 mM [9], et sa force ionique doit être faible pour éviter l'agrégation des NP (chargées négativement par les ions citrate adsorbés à leur surface) [10]. L'amplitude des pics en courant peut être prédite par l'équation $i_{pic} = 4 \pi \ln(2) nFD_{proton}C_{proton}a_{NP}$, (équation I.2, chapitre I, pour une électrode sphérique, $D = 9.3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), la surface de la NP de platine en contact avec la WK en carbone servant d'électrode nanométrique de forme sphérique. De même, la fréquence des collisions f_{col} peut être calculée par $f_{col} = 4 D_{NP}C_{NP}r_{UME}N_a$, avec $D_{NP} = 6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ le coefficient de diffusion des NP, C_{NP} leur

concentration molaire, r_{UME} le rayon de l'UME, et N_a le nombre d'Avogadro. Nous avons employé une suspension commerciale de NP de platine (70 nm de diamètre, stabilisées par des groupements citrate), diluée à 2 pM de NP dans une solution de dihydrogencitrate de sodium à 10 mM dont le pH est ajusté à 4 par ajout de soude pour remplir les conditions mentionnées ci-dessus (voir partie expérimentale pour plus de détails). Avec ces conditions expérimentales avec une UME de 8 μm de diamètre, les formules de calculs ci-dessus prédisent des pics d'une amplitude moyenne de ~ 25 pA, espacés l'un de l'autre de ~ 10 secondes en moyenne.

La Figure VI.6A représente une mesure réalisée avec un mesureur de courant Keithley 420 dont le filtre est ajusté à 1 ms, avec les paramètres décrits ci-dessus, sur 160 secondes. L'UME en carbone (8 μm de diamètre) utilisée a été polarisée à -0.5 V/SCE.

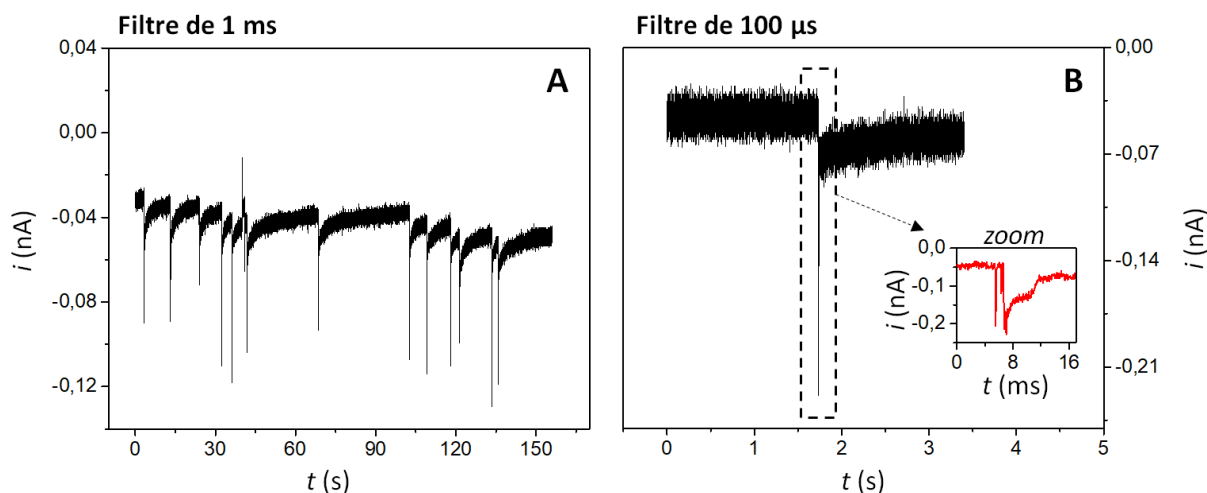


Figure VI.6. Pics en courant générés par la collision de NP de platine sur une UME en carbone de 8 μm de diamètre. (A) sur 160 secondes. (B) pic unique résolu en temps. Solution de 10 mM de sodium dihydrogencitrate dont le pH a été ajusté à 4 par ajout de soude (3.6 ml) et 0.4 ml de la solution mère de NP de platine pour une concentration en NP de 2 pM. Potentiel appliqué -0.5 V/SCE. Mesure effectuée par Keithley 420 avec un filtre calibré à 1 ms (A) et 100 μs (B).

La Figure VI.6A montre qu'on obtient des pics dus à la collision catalytique des NP de platine à l'UME, réguliers et de quelques dizaines de pA espacés d'une dizaine de secondes. En Figure VI.6B, est montré un événement de collision unique, mesuré avec une bande passante plus élevée (10 kHz, filtre de 0.1 ms). A cette échelle de temps, on peut en enregistrer la structure fine, qui montre d'abord la présence de 2 à 3 pics très brefs, suivis d'un pallier de décroissance lente du courant durant quelques msec.

Une fois obtenues des conditions d'observation reproductibles de multiples signaux de collision, nous avons renouvelé cette acquisition mais en l'associant cette fois au schéma convertisseur ECL, le compartiment de la WK contenant la solution de nanoparticules et celui de la CE le système L-012/H₂O₂. Nous avons utilisé une WK et une CE en carbone de 8 et 25 μm de diamètre, respectivement. Le temps d'intégration de la caméra CCD, utilisé pour détecter le signal ECL est de 100 ms et le filtre du mesureur de courant a été ajusté à 100 Hz. La Figure VI.7A et B montre un exemple de signaux de courant et ECL corrélés obtenus suite à la collision de nanoparticules à la WK, l'ECL étant produite à la CE.

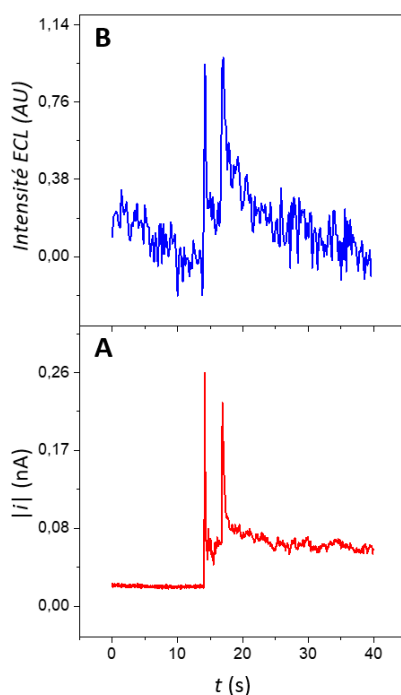


Figure VI.7. Couplage du courant généré par la collision de nanoparticules de platine (70 nm de diamètre) à une électrode de travail (A), avec une émission ECL à la contre-électrode (B). Le compartiment de l'électrode de travail contient une solution aqueuse de 10 mM ($\text{Na}^+ \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7^-$) dont le pH a été ajusté à 4.1 par ajout de soude (3.2 ml) et 0.8 ml de la solution mère de NP de platine pour une concentration en NP de 4 pM, et le compartiment de la contre-électrode contient 1 mM L-012 et 1 mM H₂O₂ dans un tampon carbonate (pH = 10). Potentiel appliqué -0.5 V/SCE. WK et CE en carbone de 8 μm et 25 μm de diamètre respectivement.

La corrélation temporelle entre les deux signaux est assez remarquable, ce qui signifie que le système ECL est capable de s'ajuster très rapidement aux variations rapides du courant, pour en retranscrire la dynamique.

5. Conclusions

A notre connaissance, nous tenons là la toute première démonstration expérimentale de la conversion d'un phénomène redox transitoire, signalant la collision de nanoparticules à une

électrode sous contrôle potentiostatique, en une émission lumineuse distante, fidèle et simultanée. Cependant, afin d'améliorer la résolution temporelle pour permettre de bien distinguer les étapes faradiques de l'événement, dont certains sont très rapides (à la dizaine ou centaine de μsec), nous pensons utiliser un tube photomultiplicateur (PMT) comme détecteur optique, étant donné qu'il offre une bande passante supérieure à celle d'une caméra, limitée à quelques msec au mieux par le « temps d'intégration ». Le PMT étant un amplificateur photo-électronique, il pourrait également permettre un gain en sensibilité dans la conversion courant/lumière. Cette sensibilité étant également dépendante de l'efficacité avec laquelle on est capable de collecter les photons ECL produits à l'UME, qui est assez limitée en microscopie en « champ lointain », une configuration opto-électrochimique employant une UME « transparente » pourra à l'avenir être envisagée.

Références du chapitre

- [1] Z. Liu, W. Qi, and G. Xu, “Recent advances in electrochemiluminescence,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 10, pp. 3117–3142, 2015, doi: 10.1039/C5CS00086F.
- [2] A. Chovin, P. Garrigue, P. Vinatier, and N. Sojic, “Development of an Ordered Array of Optoelectrochemical Individually Readable Sensors with Submicrometer Dimensions: Application to Remote Electrochemiluminescence Imaging,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 2, pp. 357–364, Jan. 2004, doi: 10.1021/ac034974w.
- [3] P. A. Defnet and B. Zhang, “Detection of Transient Nanoparticle Collision Events Using Electrochemiluminescence on a Closed Bipolar Microelectrode,” *ChemElectroChem*, vol. 7, no. 1, pp. 252–259, Jan. 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/celec.201901734>.
- [4] H. Zhu, D. Jiang, and J.-J. Zhu, “High-resolution imaging of catalytic activity of a single graphene sheet using electrochemiluminescence microscopy,” *Chem. Sci.*, vol. 12, no. 13, pp. 4794–4799, 2021, doi: 10.1039/D0SC06967A.
- [5] X. Ma *et al.*, “Rational Design of Electrochemiluminescent Devices,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 54, no. 14, pp. 2936–2945, Jul. 2021, doi: 10.1021/acs.accounts.1c00230.
- [6] W. Miao, J.-P. Choi, and A. J. Bard, “Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)₃²⁺)/Tri-n-propylamine (TPrA) System Revisited A New Route Involving TPrA^{•+} Cation Radicals,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 48, pp. 14478–14485, Dec. 2002, doi: 10.1021/ja027532v.
- [7] C. A. Marquette and L. J. Blum, “Electro-chemiluminescent biosensing,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 390, no. 1, pp. 155–168, 2008, doi: 10.1007/s00216-007-1631-2.
- [8] P. A. Defnet, C. Han, and B. Zhang, “Temporally-Resolved Ultrafast Hydrogen Adsorption and Evolution on Single Platinum Nanoparticles,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 6, pp. 4023–4030, Mar. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b05463.
- [9] Z. Xiang *et al.*, “Electrochemical Dynamics of a Single Platinum Nanoparticle Collision Event for the Hydrogen Evolution Reaction,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol.

57, no. 13, pp. 3464–3468, Mar. 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201712454>.

- [10] D. A. Robinson, A. M. Kondajji, A. D. Castañeda, R. Dasari, R. M. Crooks, and K. J. Stevenson, “Addressing Colloidal Stability for Unambiguous Electroanalysis of Single Nanoparticle Impacts,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 13, pp. 2512–2517, Jul. 2016, doi: [10.1021/acs.jpcllett.6b01131](https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01131).

Annexe du chapitre VI

1. ECL résiduelle d'une solution de L-012 sans ajout du co-réactif H₂O₂

L'ECL produite au cours d'un CV à 0,01 V/sec à une UME de carbone dans une solution contenant du L-012 sans ajout d'H₂O₂ est montrée Figure AVI.1 (1 mM de L-012 dans un tampon carbonate pH = 10, UME de 25 μ m de diamètre). Les tracés A-B et A'-B' sont le courant et l'intensité ECL mesurés avec la solution respectivement non désaérée et après désaération 20 min à l'argon. Les courants faradiques mesurés dans les deux cas sont très similaires, tandis que les intensités sont faibles. Cependant, avant désaération, la présence en quantité non négligeable de dioxygène dissous dans la solution provoque une ECL résiduelle, en forme de vague sigmoïdale très peu intense, qui s'estompe nettement après désaération quasi-complète du milieu à l'argon.

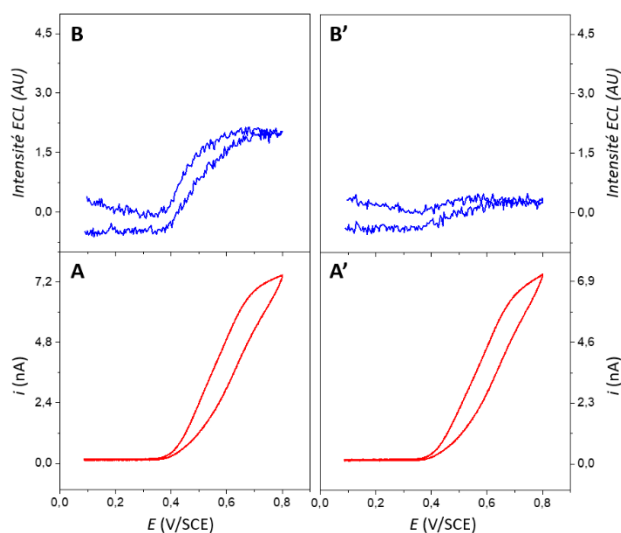


Figure AVI.1. Effet du dioxygène dissout présent naturellement dans la solution contenant L-012 sur l'intensité ECL mesurée. Sont représentés, le courant et l'intensité ECL, mesurés avant, (A), (B), et après, (A'), (B'), désoxygénation de la solution par bullage d'argon. 1 mM L-012 dans un tampon carbonate (pH = 10). Electrode de travail en carbone de 25 μ m de diamètre, vitesse de balayage 0,01 V/s⁻¹.

2. Réduction des protons sur UME de carbone vs. platine

La réaction électrochimique de réduction des protons en dihydrogène en milieu acide pH = 4,1, est observée sur UME de carbone et de platine (25 μm de diamètre chacune). Les CV respectifs, par scan cathodique de potentiel à 0,01 V/sec entre + 0,5 et -0,5 V/SCE, sont montrés Figure AVI.2. Sur l'UME de carbone (tracé en rouge), le CV est purement capacitif, la réduction des protons n'étant pas observée dans la zone de potentiel explorée où l'UME reste inerte vis-à-vis des protons. Sur l'UME de platine en revanche (tracé en noir), montré ici dans un milieu non désaéré à l'argon, on observe, outre l'apparition d'un plateau de courant (~ 3 nA), attribué à la réduction du dioxygène résiduel dissout, une augmentation soudaine du courant cathodique, à partir de -0,46 V/SCE, correspondant à la réduction des protons, au potentiel prédit thermodynamiquement ($E = -0,059 \text{ pH V/ESH}$) pour cette réaction. Pour l'expérience de collision, l'UME de carbone sera ainsi polarisée à -0,5 V/SCE, pour que chaque collision d'une NP de platine à sa surface, jouant temporairement le rôle d'une nanoélectrode active vis-à-vis des protons, produise un signal faradique de réduction [1].

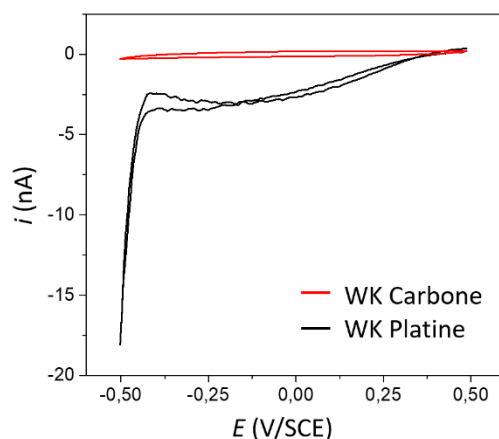


Figure AVI.2. CV sur UME en carbone (trait rouge) et en platine (trait noir) mesurés dans un milieu acide (pH = 4,1) contenant 10 mM de sodium dihydrogénéocitrate. UMEs de 25 μm de diamètre. Vitesse de balayage 0,01 Vs^{-1} .

- [1] J. M. Kahk, N. V Rees, J. Pillay, R. Tshikhudo, S. Vilakazi, and R. G. Compton, "Electron transfer kinetics at single nanoparticles," *Nano Today*, vol. 7, no. 3, pp. 174–179, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.04.005>.

Chapitre VII

**Approche purement électronique pour la mesure de
courants ultra-faibles : Amplificateur
transimpédance à contre-réaction capacitive**

Approche purement électronique pour la mesure de courants ultra-faibles : Amplificateur transimpédance à contre-réaction capacitive

1. Introduction

Dans ce chapitre nous présentons une approche purement électronique pour la mesure de courants ultra-faibles. Le but sera de réaliser un appareil adapté à des expériences en microscopie à force atomique couplées à la microscopie électrochimique à « médiateur lié » (Mt/AFM-SECM), où des courants de l'ordre du fA doivent être mesurés avec une bande passante de 0-10 Hz [1]. Nous espérons une amélioration en sensibilité et/ou en bande passante par rapport à l'électromètre actuel utilisé pour réaliser ce type d'expériences, fabriqué aussi par notre équipe.

La recherche de méthodes permettant l'amélioration de la qualité de mesure (sensibilité et bande passante) de courants faibles a fait et fait toujours l'objet de nombreuses études avec des critères fortement dépendants de l'application visée. Un compromis doit être pris entre tous ces critères, qui peuvent être une sensibilité et/ou une bande passante accrues, une large gamme de mesure, miniaturisation, portabilité, etc. Afin de répondre au mieux aux charges de l'application visée. Le Tableau VII.1 résume des études parmi les plus marquantes concernant la mesure de courants faibles qu'on peut trouver dans la littérature.

Tableau VII.1. Travaux parmi les plus marquants en mesure de courants faible dans la littérature

Application	Gamme de mesure	Sensibilité maximale/ bande passante	Architecture	Réf
Non précisé	pA-fA,	1 fA/ 0.01 Hz	Préamplificateur, ATI-R*	[2]
Electrochimie biomoléculaire	nA-<pA	<pA/10 kHz, 10 fA/ 1 Hz	ATI-C**	[3]
Electrochimie	25 nA-1fA	1.5 fA/ 0.1 Hz	Préamplificateur, ATI-R	[4]
Non précisé	pA	100 pA/ 3.34 kHz	ATI-R	[5]
Electrochimie, circuits à basse consommation	nA	50 nA/ 1 kHz	ATI-C	[6]
Détection de radiations	μA-fA	1 fA/ 0.01 Hz	ATI-C	[7]
Détection de radiations	nA-fA	10 fA/ 0.1 Hz	ATI-R	[8]

*ATI-R : Amplificateur transimpédance à contre-réaction résistive.

**ATI-C : Amplificateur transimpédance à contre-réaction capacitive.

En électrochimie et de manière générale, la mesure de courants faibles est réalisée par l'emploi d'un amplificateur transimpédance à contre-réaction résistive (ATI-R) [2] (Figure VII.1a), ou plus rarement capacitive (ATI-C) [3] (Figure VII.1b). D'autres approches comme l'utilisation d'un préamplificateur de courant pour minimiser le bruit des étages en cascade [4], ou l'emploi d'un « modulateur temps-continu sigma-delta en mode courant » [9] ont aussi été proposés.

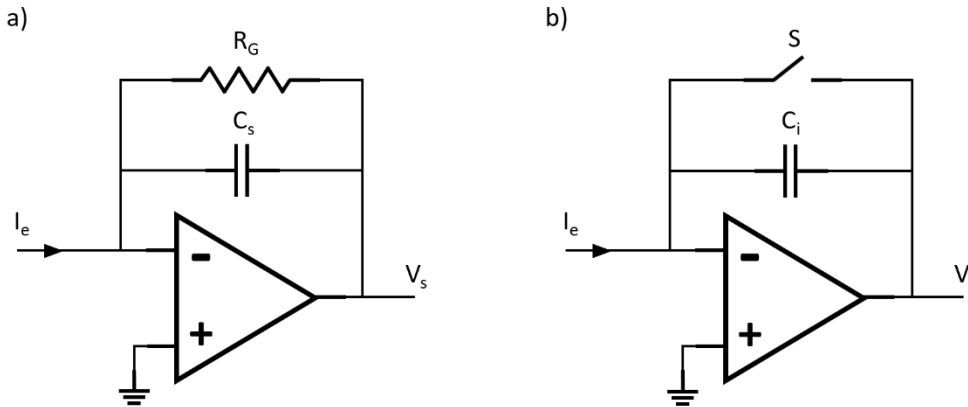


Figure VII.1. Schémas basiques d'amplificateurs transimpédance à contre-réaction a) résistive (ATI-R) et b) capacitive (ATI-C).

L'ATI-R est le plus utilisé et le plus populaire dû à sa simplicité et facilité d'utilisation. A la base de la quasi-totalité des potentiostats commerciaux, il est à ce jour le montage utilisé dans notre laboratoire. Il consiste en un amplificateur opérationnel et une résistance de rétroaction R_G qui définit son gain (Figure VII.1a). Un condensateur C_s doit souvent être connecté en parallèle à R_G pour stabiliser le circuit et pour en compenser en partie la capacité parasite d'entrée [10]. Pour une bande de fréquences utile considérée de 0 à 10 Hz, sa fonction de transfert peut être définie simplement par $V_s/I_e = -R_G$. Le bruit électronique dans le circuit est dominé par le bruit thermique de R_G , et le bruit référé en courant en entrée $\overline{i_{br,e}}$ est défini par :

$$\overline{i_{br,e}} = \sqrt{\frac{4kT}{R_G \Delta t}} \quad (VII.1)$$

Où k est la constante de Boltzmann, T la température absolue et $\Delta t = R_G C_s$, la constante temporelle de la mesure.

On constate que pour minimiser le bruit du circuit il faut une valeur de R_G la plus élevée possible. En pratique on utilise $R_G \geq 10^{11} \Omega$. Mais, pour de telles valeurs la constante

temporelle du circuit devient élevée et se rapproche de la seconde, même en minimisant C_S la capacité parasite (en parallèle à C_S) devient prépondérante et limite inévitablement la bande passante de l'électromètre. Cette capacité parasite peut être compensée pour améliorer la bande passante [5] mais au prix d'ajout d'autres sources de bruit.

De manière moins fréquente, l'ATI-C est aussi utilisé pour la mesure de courants en électrochimie, souvent dans des appareils expérimentaux adaptés à des contraintes de mesure spécifiques [3], [6], [11], [12], quelques appareils commerciaux l'utilisent aussi comme Axopatch 200B. Le montage présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes de mesure. Notamment, il offre une meilleure performance en termes de bruit dans le cas des courants ultra-faibles [13] (ce qui est notre cas), et il est souvent choisi pour éviter les difficultés d'intégration de résistances de valeurs élevées en technologie CMOS dans diverses applications [11], [14], [15]. En effet, l'intégration de condensateurs est plus facile, nécessite moins d'espace et est moins coûteuse. Ce montage permet aussi généralement une meilleure bande passante comparé à l'ATI-R [13].

Le désavantage principal des amplificateurs transimpédance à contre-réaction capacitive est le phénomène de saturation qui se produit inévitablement lors de l'intégration sur C_i d'un courant continu, même très faible, à l'entrée de l'électromètre (Figure VII.1b). Deux approches peuvent être considérées pour pallier cet inconvénient. L'une est l'emploi d'une méthode dite discrète (MD) où la charge accumulée sur C_i est réinitialisée par la fermeture de l'interrupteur S périodiquement [12], et l'autre est une méthode continue (MC) utilisant un filtre en rétroaction pour éliminer la composante continue du courant à l'entrée de l'électromètre [16]. En MD inévitablement les mesures sont obtenues en une séquence de valeurs discrètes ce qui limite la bande passante. Au contraire, en MC il a été montré qu'on pouvait obtenir une très grande bande passante et une grande gamme dynamique [17], [18], mais l'ajout du filtre détériore la performance en bruit du circuit, ce qui est dommageable particulièrement pour la mesure de courants ultra-faibles.

Dans notre cas, le montage ATI-C en MD est le plus adapté. En effet, la discrétisation des mesures et la limitation de la bande passante (qui peut être calibrée à 10 Hz) ne pose pas de problème. En référence [15] des courants aussi faibles que 1 fA ont été mesurés avec une très grande précision par cette configuration en intégrant le signal sur 100 secondes. Nous ne pouvons pas nous permettre une intégration du signal sur une si longue période, mais cela démontre le potentiel du montage.

Nous avons donc réalisé un ATI-C en mesure discrète et comparé ses performances à celles de l'électromètre ATI-R utilisé jusque-là dans nos expériences et réalisé dans le cadre de cette thèse aussi. Pour tenter d'obtenir des performances améliorées par rapport aux appareils similaires reportés dans la littérature, nous y avons intégré quelques subtilités de conception et de fabrication et une nouvelle méthode de mesure.

2. Fonctionnement de l'ATI-C idéal

Si l'interrupteur S est fermé (Figure VII.1b), le circuit est au repos, la tension aux bornes du condensateur de rétroaction C_i est nulle, la tension de sortie V_s est donc nulle également, le montage avec rétroaction sur l'entrée négative de l'amplificateur étant linéaire. A l'ouverture de S , le condensateur C_i intègre le courant d'entrée. La tension en sortie $V_s(t)$, étant égale à celle aux bornes du condensateur, est donc continue, aussi $V_s(0) = 0$, et $V_s(t)$ est définie par :

$$V_s(t) = -\frac{1}{C_i} \int_0^{T_{int}} i_e(t) dt, \quad (VII.2)$$

où T_{int} est le temps d'intégration.

En appliquant la transformée de Laplace à l'équation (VII.2) on obtient la fonction de transfert suivante, composée d'un terme en $1/s$ pour une intégration sur un temps infini et d'un second terme, en $(1 - \exp(-T_{int} \cdot s))$, pour traduire la fenêtre temporelle d'intégration [11] :

$$\frac{V_s(s)}{I_e(s)} = \frac{1}{C_i s} (1 - e^{-T_{int} s}), \quad (VII.3)$$

La réponse fréquentielle du circuit est similaire à un filtre passe-bas de premier ordre avec une fréquence de coupure $f_c = 1/(2 T_{int})$.

Pour estimer le bruit dans le circuit nous avons adapté l'étude réalisée dans la référence [13]. Nous ignorons ici aussi le bruit de commutation du condensateur de rétroaction KT/C en admettant qu'on ne mesure la tension de sortie que pendant sa phase stable après l'ouverture de S . Pour la même raison nous ne considérons pas le bruit généré pendant le temps de réinitialisation du circuit. La densité spectrale du bruit en courant pendant la phase d'intégration peut être estimée à partir de l'équation VII.3 par :

$$\overline{i_{br,int}} = e_M \left(\frac{Y_M}{T_{int} s} (1 - e^{-T_{int} s}) \right) \left[\frac{A}{\sqrt{H_z}} \right] \quad (VII.4)$$

Où e_M est le bruit d'entrée référence de l'AOp, et Y_M l'admittance équivalente du circuit d'entrée. Y_M dépendra donc de l'interface connectée à l'entrée de l'ATI-C. L'interface d'entrée génère aussi un bruit propre qu'on peut noter $\overline{i_{br,M}}$. Le bruit total pendant l'intégration peut être

$$\text{approximé par } \overline{i_{br,tot}} = \sqrt{(\overline{i_{br,int}})^2 + (\overline{i_{br,M}})^2}.$$

La Figure VII.2 représente un schéma temporel typique d'une étape de mesure. Nous effectuons une mesure sur une courte période $\Delta t = t_2 - t_1$, avec $t_2 > t_1$, durant laquelle le courant est considéré constant. La tension V_s mesurée à l'instant t_2 s'exprime alors par :

$$V_s = V_{s0} - \left(\frac{\Delta t}{C_i}\right) I_e, \quad (VII.5)$$

Avec V_{s0} la tension de sortie du circuit à l'instant t_1 . Dans un circuit parfait, et si t_1 est l'instant où l'interrupteur S passe de l'état fermé à l'état ouvert, V_{s0} sera nulle. En pratique l'ouverture de S induit des perturbations : bruit de commutation, injection de charges de S dans C_i , et tension d'offset de l'AOp utilisé, reportés dans la littérature comme majoritairement à l'origine d'un saut en potentiel observé [12].

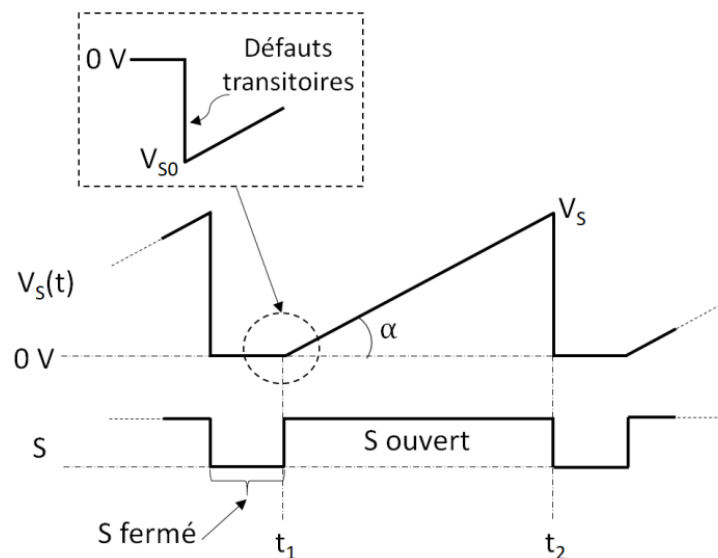


Figure VII.2. Schéma temporel général d'une étape de mesure discrète avec un ATI-C.

Le ratio $\Delta t/C_i$ est le gain de transimpédance G , exprimé usuellement en volts/ampères ou par équivalence en ohms. Par exemple pour $\Delta t = 0,1$ s et $C_i = 1$ pF, $G = 10^{11}$ V/A ou 100 GΩ. Avec ces paramètres, un courant de 1 fA sera traduit en une tension de 0.1 mV en sortie, une amplification supplémentaire en cascade est donc nécessaire pour mesurer des courants aussi faibles sur une période aussi courte.

Le courant I_e est proportionnel à la pente ($\tan(\alpha)$) de la droite en tension obtenue pendant le temps de mesure. Nous verrons plus tard qu'une alternative au calcul du courant par l'équation VII.5 permet une meilleure précision de mesure.

3. L'amplificateur transimpédance à contre-réaction capacitive proposé

Notre but est la réalisation d'un ATI-C avec des composants discrets disponibles chez les distributeurs et qui puisse rivaliser avec les performances de l'électromètre utilisé actuellement au laboratoire pour la réalisation des expériences en Mt/AFM-SECM. Le schéma général du système de mesure est représenté en Figure VII.3.

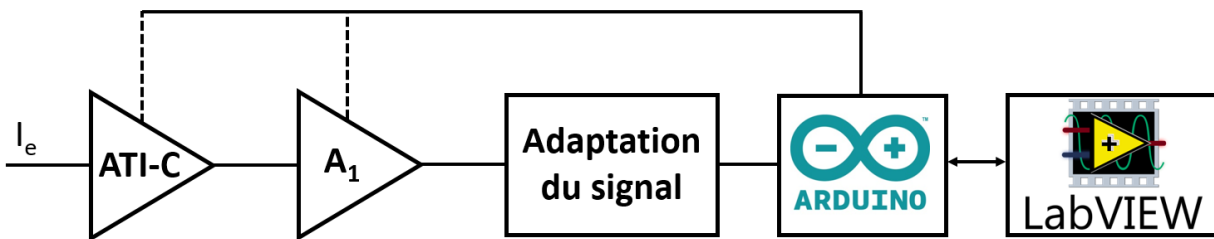


Figure VII.3. Schéma général du système de mesure proposé.

Le courant est d'abord intégré par le premier étage ATI-C (représenté en Figure VII.1b) puis amplifié par un deuxième étage A_1 . Nous utilisons une carte 'Arduino Due' pour la conversion analogique-numérique et le contrôle de la mesure. Un étage entre A_1 et la carte Arduino est nécessaire pour adapter la tension de sortie de l'amplificateur à l'entrée de la carte de mesure. Une application LabVIEW pilote la carte Arduino et permet l'affichage et l'enregistrement des données (Voir la partie 1 de l'annexe du chapitre pour plus de détails).

Pour réaliser un appareil de mesure de courants dans la gamme du fA, il y a plusieurs règles à suivre impérativement. D'abord, l'amplificateur opérationnel (AOp) du montage ATI-C doit présenter un courant d'entrée I_b le plus faible possible (< 100 fA en pratique). De plus, l'entrée négative de l'ATI-C doit être parfaitement isolée, aussi le montage ne peut pas être assemblé classiquement sur un circuit imprimé (CI) en fibre de verre, dont l'isolation électrique est insuffisante. Une option est d'utiliser un CI en téflon, plus isolant, mais la manière la plus simple d'éviter les fuites par le CI est de réaliser les connexions « en l'air », en particulier l'entrée négative de l'AOp [10]. Le contact des éléments connectés à l'entrée de l'ATI-C avec des substances *à priori* isolantes comme un flux de soudure ou de la colle peut également générer des courants de fuite importants, donc il est nécessaire que le circuit soit totalement propre. Le gain de transimpédance $\Delta t/C_i$ doit être assez élevé pour permettre la détection de

courants faibles, pour des courants de l'ordre du fA un gain supérieur à 10^{11} est nécessaire. Enfin, l'ensemble du circuit de mesure et de la cellule électrochimique doit être placé dans une cage de Faraday (boite métallique connectée à la masse) pour être protégé des perturbations électromagnétiques extérieures.

Pour une meilleure performance, il peut être intéressant d'utiliser un câble triaxial bas bruit [10]. Un condensateur C_i avec une dérive en température minimale est aussi préférable. L'interrupteur S doit présenter une grande résistance à l'état ouvert (R_{off}) pour limiter les courants de fuite pendant la phase d'intégration, et une résistance à l'état fermé (R_{on}) la plus faible possible pour minimiser le bruit ajouté au circuit pendant la phase de réinitialisation. La densité de bruit en courant N_{ibr} , la tension d'offset V_{os} , le gain différentiel A_{v0} et le taux de réjection du mode commun CMRR de l'amplificateur opérationnel choisi sont aussi des paramètres à prendre en compte.

La Figure VII.4 représente l'amplificateur transimpédance complet avec le deuxième étage d'amplification A_1 . S_e est un interrupteur permettant de mesurer le courant d'offset du circuit quand il est à l'état ouvert, ce courant doit être soustrait du courant total mesuré (avec S_e fermé). Le circuit de test sera évoqué plus loin dans le chapitre.

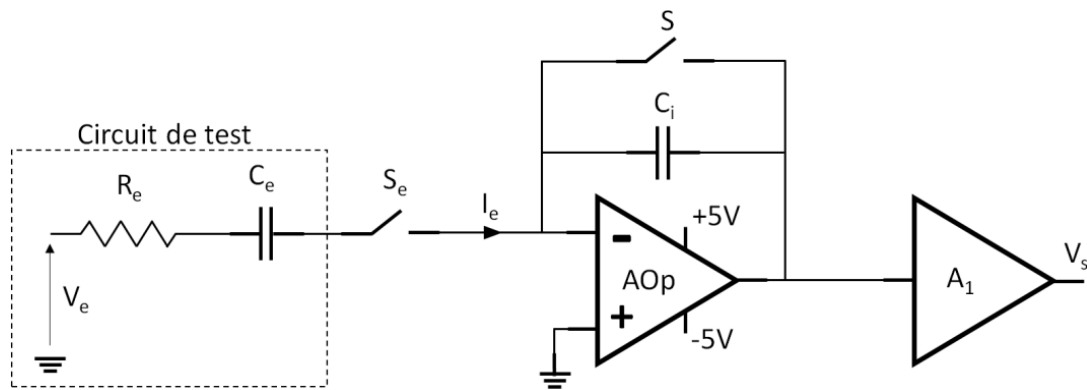


Figure VII.4. Schéma détaillé de l'ATI-C réalisé avec l'étage d'amplification supplémentaire A_1 et un circuit de test utilisé pour valider le fonctionnement du montage.

Le Tableau VII.2 résume les composants sélectionnés pour la réalisation du circuit de mesure représenté en Figure VII.4.

Tableau VII.2. Composants sélectionnés pour réaliser l'électromètre

Elément	Référence	Description et caractéristiques utiles
AOp	ADA4530-1	$I_b \leq 20$ fA, $N_{ibr} = 0,07$ fA/ $\sqrt{\text{Hz}}$ à 0.1 Hz, $V_{os} < 40$ μ V, $A_{v0} = 150$ dB, CMRR = 114 dB, alimentation ± 8 V maximum

C_i	C0603C508C5GACTU : condensateur céramique C0G	Capacité : 0,5 pF, variation de capacité en fonction de la température : 30 ppm/°C
S, S_e	CRR05-1A	$R_{on} = 250 \text{ m}\Omega$, $R_{off} \geq 10^{12} \Omega$, capacité $\sim 0,3 \text{ pF}$
A_1	PGA103	Amplificateur d'instrumentation à gain variable de $G_1 = 1, 10 \text{ et } 100$.

Il est à noter que l'interrupteur S présente une capacité non négligeable qui devra être ajoutée à la capacité C_i (en parallèle) pour le calcul de la valeur du courant mesuré.

Parallèlement, la carte Arduino est programmée pour commander les interrupteurs, réaliser la conversion analogique-numérique (12 bits) et communiquer les données à l'application LabVIEW. Le schéma temporel détaillé d'une étape de mesure avec l'appareil réalisé est représenté en Figure VII.5.

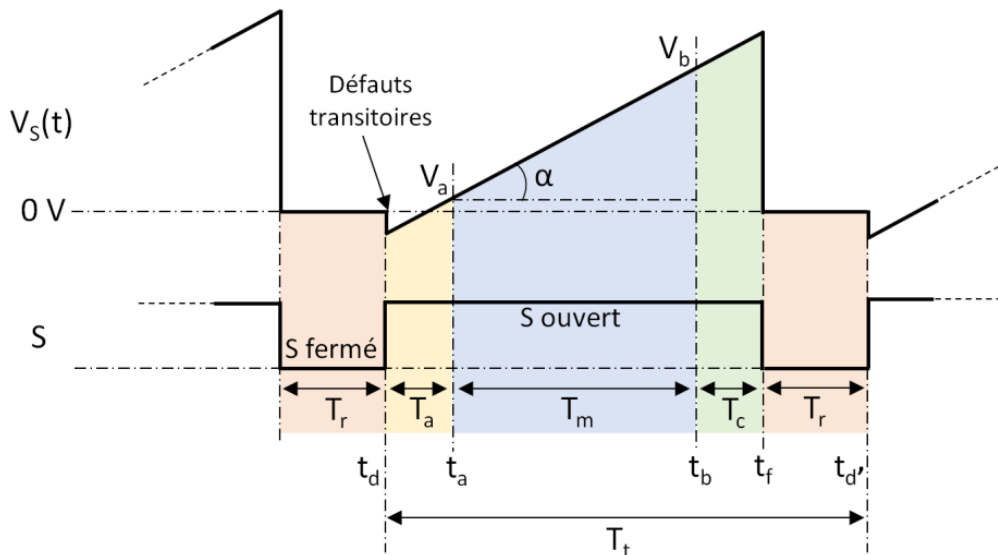


Figure VII.5. Schéma détaillé d'une étape de mesure avec l'électromètre.

Avec :

- T_t , durée totale d'une étape de mesure.
- t_d , instant d'ouverture de l'interrupteur S .
- t_a , début de la mesure.
- t_b , fin de la mesure.
- t_f , fermeture de S , réinitialisation de V_S .
- t_d' , début d'un nouveau cycle de mesure.
- T_r , durée de réinitialisation du circuit.

- T_a , temps d'attente.
- T_m , durée de la mesure.
- T_c , durée de calcul de la valeur du courant.
- V_a , valeur de V_s à l'instant t_a .
- V_b , valeur de V_s à l'instant t_b .
- $\tan(\alpha) = I_e/C_i = (V_b - V_a)/T_m$, pente du potentiel mesuré.

Il faut se rendre compte qu'une vraie mesure à des niveaux de courant aussi faibles que le fA est bruitée et présente des perturbations sur la pente à l'ouverture de S notamment, ce qui explique la nécessité d'introduction du temps d'attente T_a pour s'en prémunir. La valeur de I_e peut être calculée simplement à partir des valeurs de tensions V_a et V_b mesurées à des temps précis espacés d'une durée T_m , par la relation :

$$I_e = \frac{-(V_b - V_a) C_i}{T_m}, \quad (VII.6)$$

Néanmoins, la pente étant très faible et le signal bruité, il est difficile de mesurer des courants de l'ordre du fA de cette manière. Nous proposons une méthode pour faire cette mesure qui consiste à échantillonner continuellement à une fréquence fixe f_e la tension de sortie V_s sur toute la durée T_m et calculer la pente P de la droite de régression obtenue par la méthode des moindres carrés (équation VII.7).

$$P = \frac{I_e}{C_i} = \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})(V_i - \bar{V})}{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2} = \frac{n \sum_{i=1}^n t_i V_i - \sum_{i=1}^n t_i \sum_{i=1}^n V_i}{n \sum_{i=1}^n t_i^2 - (\sum_{i=1}^n t_i)^2} \quad (VII.7)$$

Où i est l'indice du point mesuré de coordonnées (V_i, t_i) , n le nombre de points échantillonnés, et \bar{t}, \bar{V} sont respectivement, la moyenne des intervalles temporels entre deux points échantillonnés et la moyenne des valeurs de tension de sortie, mesurés sur un nombre de points n . Si on se réfère à la Figure VII.5, alors $V_1 = V_a$, $V_n = V_b$, $t_1 = t_a$, $t_n = t_b$.

La carte Arduino effectue le calcul de la pente à partir des points échantillonnés sur la durée T_m et transmet la valeur calculée au programme LabVIEW qui en déduit la valeur du courant. Le temps de calcul T_c dépend du nombre de points échantillonnés et donc de la durée de la mesure T_m (0.05 à 1 s) et de la fréquence d'échantillonnage f_e (1 à 30 kHz), il peut atteindre une dizaine de millisecondes.

Le fonctionnement de l'appareil réalisé a été validé en appliquant une tension V_e sur le circuit de test décrit en Figure VII.4, avec $C_e = 0,3 \text{ pF}$ et $R_e = 100 \text{ } \Omega$. Le circuit composé de R_e et C_e agit en différentiateur, permettant de générer un courant constant de valeur contrôlée à partir d'une rampe de tension.

4. Caractérisation expérimentale de l'appareil réalisé

La Figure VII.6 représente une allure typique de la tension de sortie analogique V_s de l'appareil en l'absence de signal d'entrée (S_e ouvert) en temps réel enregistrée à l'aide d'un oscilloscope, elle peut être comparée au Schéma représenté en Figure VII.5.

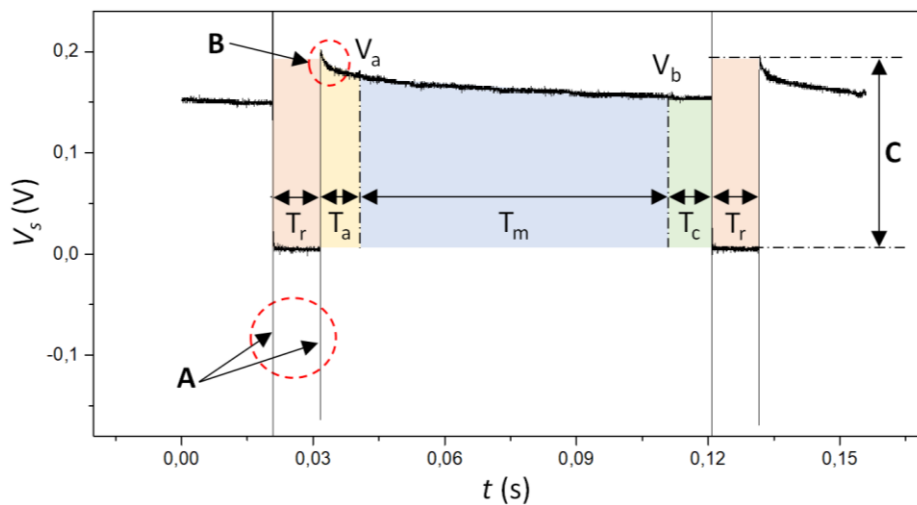


Figure VII.6. Mesure de la tension de sortie V_s en temps réel en l'absence de signal d'entrée (S_e ouvert). $T_a = 10 \text{ ms}$, $T_m = 70 \text{ ms}$, $T_c = 10 \text{ ms}$, $T_r = 10 \text{ ms}$, $G_I = 1$.

Des défauts sont nettement visibles sur cette figure, repérés par les lettres A, B et C. (A) indique des pics en potentiel de courte durée intenses qui peuvent atteindre plusieurs centaines de millivolts, que l'on attribue à la variation de champ électromagnétique générée par la bobine de l'interrupteur S au moment de son ouverture et de sa fermeture. Ces pics sont gênants puisqu'ils peuvent provoquer la saturation de l'AOp pour $G_I > 1$ mais ne perturbent pas directement la mesure. (B) met en évidence une non linéarité au début de la mesure qui oblige l'introduction du temps d'attente T_a , ce qui diminue le temps de mesure T_m et donc la précision de mesure en est affectée. (C) correspond à un décalage en potentiel reproductible d'environ 150 mV à 200 mV mesuré lorsque l'interrupteur S est ouvert, s'annulant lorsqu'il est fermé, qui est certainement dû à la charge injectée par l'interrupteur S au moment de son ouverture couplée à la tension d'offset de l'AOp [12]. Ce décalage nous empêche d'utiliser un gain G_I de 100 sans saturer complètement le circuit et donc affecte aussi la précision de mesure.

Remplacer l'interrupteur S par un interrupteur CMOS pourrait régler une partie de ces problèmes.

De plus, la pente de la réponse pendant le temps de mesure T_m correspond à l'intégration d'un courant de fuite de plus de 100 fA, beaucoup plus important que les courants d'offset et de polarisation de l'amplificateur utilisé (typiquement ± 1 fA, maximum ± 20 fA) malgré les précautions de montage, donc d'autres courants de fuite sont impliqués ici.

Pour tenter de minimiser ces effets, nous avons fait varier les paramètres de mesure dont la durée de réinitialisation T_r que nous avons finalement diminuée à 0.5 ms. Dans cette configuration, la non linéarité au début de la mesure diminue fortement ce qui nous a permis de diminuer T_a à 2 ms et le courant de fuite mesuré est inférieur à 20 fA ce qui est plus en accord avec ce qui pouvait être attendu, comme on peut le voir sur la Figure VII.7.

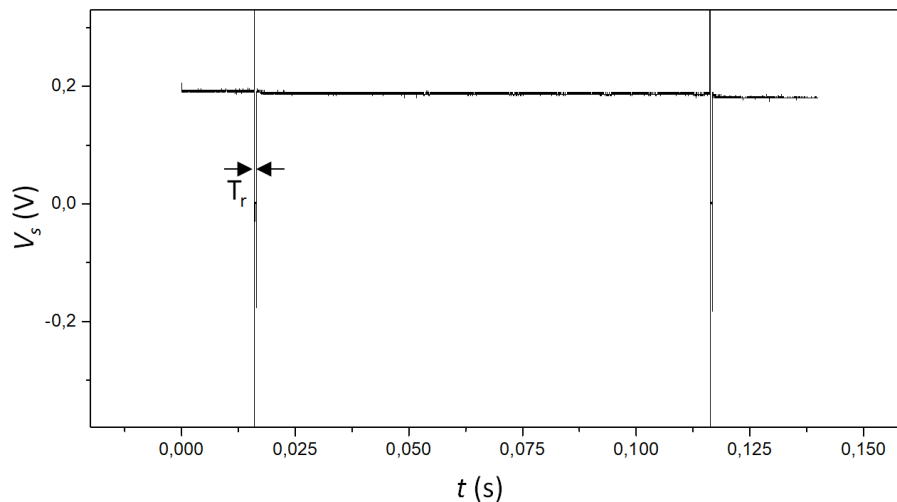


Figure VII.7. Mesure de la tension de sortie V_s en temps réel. $T_a = 2$ ms, $T_t = 100$ ms, $T_r = 0.5$ ms, $G_I = 1$, $f_e = 10$ kHz.

Par contre, les pics en potentiel mesurés à la commutation de S sont toujours présents ainsi que le décalage en tension lorsque l'interrupteur S est ouvert. D'autres essais d'amélioration se sont avérés infructueux pour l'instant (voir la partie 2 de l'annexe du chapitre), et ces défauts quoique limitants, n'étant pas rédhibitoires dans un premier temps, nous avons décidé d'effectuer des mesures pour évaluer les performances du circuit.

Pour valider la méthode de mesure et le traitement de la réponse, nous avons appliqué une tension V_e triangulaire de fréquence 0.5 Hz pour générer un courant $I_e = 10$ fA crête à crête (cc) de forme carrée à l'entrée de l'électromètre. Cette mesure et toutes les mesures à l'exception de celles de courants de fuite, sont réalisées avec S_e fermé.

La Figure VII.8a et la Figure VII.8b représentent le résultat de la mesure, soit l'estimation de la pente du signal de sortie pendant le temps T_m après chaque étape de mesure en chaque point représenté sur les courbes, en exploitant la méthode des moindres carrés (équation VII.7), et seulement deux points mesurés (équation VII.6), respectivement.

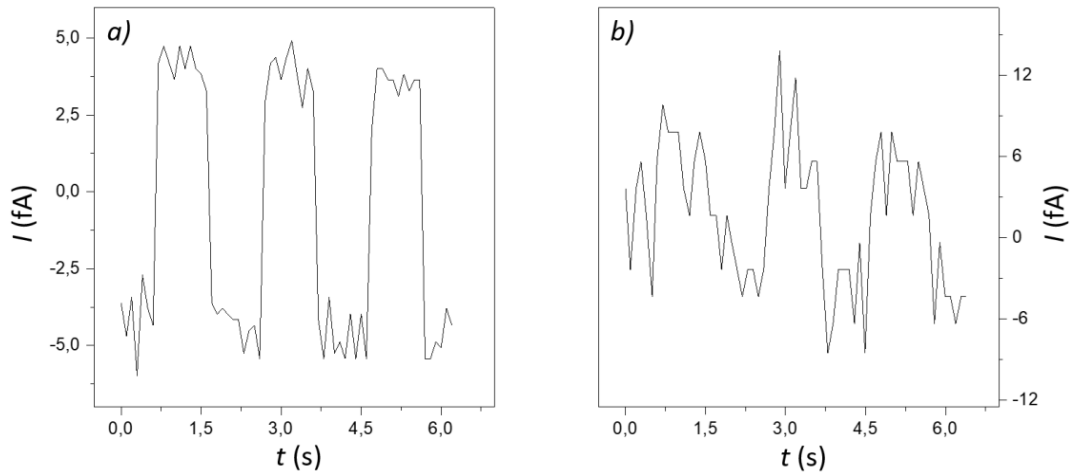


Figure VII.8. Comparaison entre l'exploitation de la mesure d'un signal en courant carré ± 5 fA, 0.5 Hz, par la méthode des moindres carrés et une méthode de mesure classique. a) Mesure de la pente par la méthode des moindres carrés (eq. VII.7), $f_e = 10$ kHz. b) Méthode de mesure classique (eq. VII.6). $T_t = 100$ ms, $G_I = 10$. Courant d'offset compensé.

Du fait de l'importante amélioration de la précision qu'elle apporte sur l'évaluation de la pente et donc du courant, et le temps de calcul n'étant pas critique ici, nous avons utilisé ce traitement par la méthode des moindres carrés par la suite.

La Figure VII.9 représente deux mesures d'un courant de 10 fA crête à crête avec un gain du deuxième étage $G_I = 1$ (gauche) et $G_I = 10$ (droite). Les deux mesures ont ici été réalisées avec une durée de mesure totale $T_t = 50$ ms.

Ces deux mesures montrent la nécessité d'amplifier la tension à la sortie de l'ATI-C pour la mesure de faibles courants, où un courant de 10 fA, intégré sur une durée $T_m < 50$ ms, se traduit par un différentiel de tension en sortie du circuit inférieur à 0.7 mV pour un gain $G_I = 1$. Dans ce cas, la précision de mesure est limitée par la résolution du convertisseur analogique numérique (ADC) qui est de 0.8 mV, et l'offset en tension lorsque S_e est ouvert ne permet pas d'utiliser un gain $G_I = 100$. On peut voir néanmoins qu'un gain $G_I = 10$ permet de mesurer un courant de 10 fA avec un temps total de mesure aussi court que 50 ms.

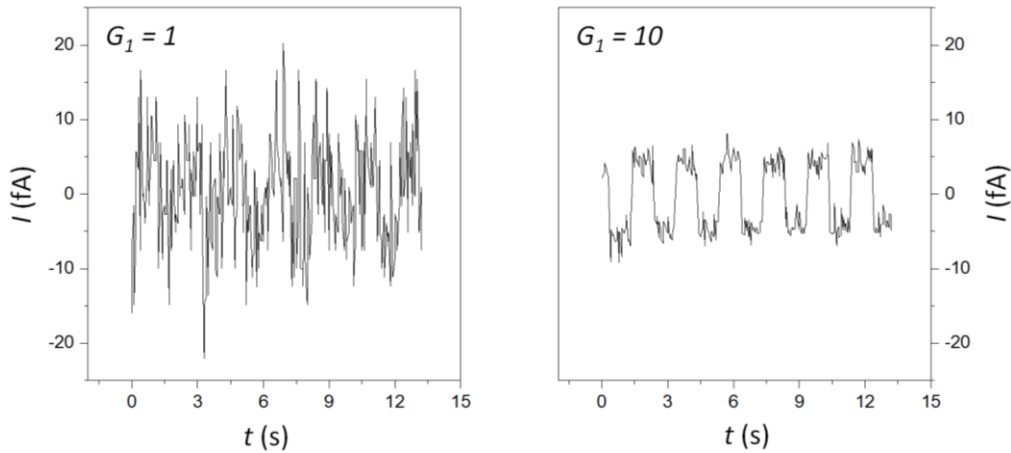


Figure VII.9. Mesures d'un signal en courant carré ± 5 fA, 0.5 Hz, avec un gain sur le deuxième étage $G_I = 1$ (gauche) et $G_I = 10$ (droite). $T_I = 50$ ms, $f_e = 10$ kHz. Courant d'offset compensé.

Nous avons aussi voulu connaître l'impact de la fréquence d'échantillonnage f_e sur la précision de mesure, en appliquant le même signal en entrée que pour la mesure précédente (Figure VII.9). Les résultats obtenus avec différentes valeurs de f_e sont représentés en Figure VII.10.

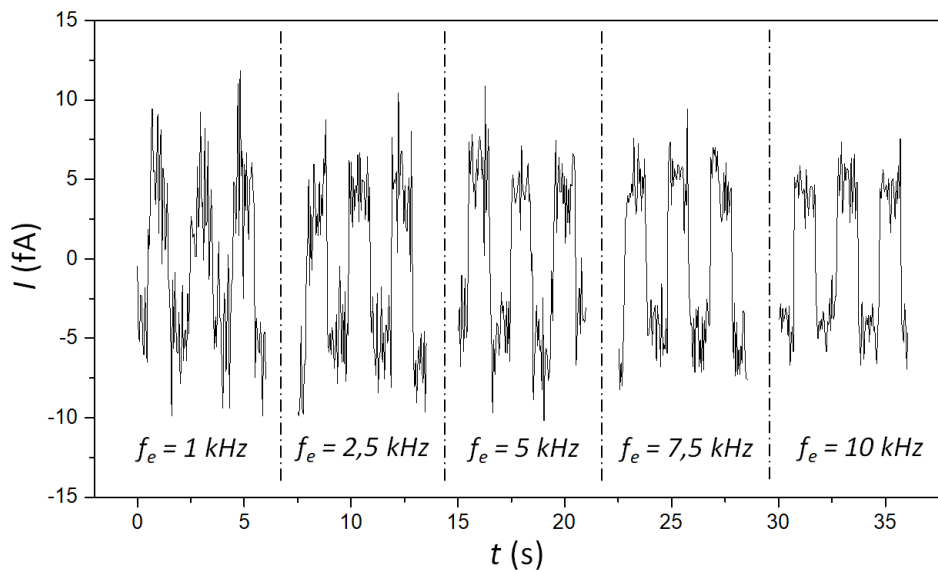


Figure VII.10. Mesures d'un signal en courant carré ± 5 fA, 0.5 Hz, avec différentes valeurs de f_e . $T_I = 50$ ms, $G_I = 10$. Courant d'offset compensé.

Une amélioration notable est visible avec l'augmentation de la fréquence d'échantillonnage. Pour toutes les mesures à suivre nous avons donc utilisé le gain $G_I = 10$ et la fréquence d'échantillonnage la plus élevée possible dont la valeur maximale a été augmentée à 30 kHz, pour optimiser les performances de l'appareil.

Nous avons comparé ces performances avec celles de l'électromètre transimpédance à contre-réaction résistive utilisé actuellement dans nos expériences. Notamment, nous avons

estimé le bruit en courant du montage ATI-C réalisé et de l'ATI-R en calculant la valeur efficace (RMS) des signaux mesurés sans courant injecté en entrée du circuit ($V_e = 0$), en fonction de la bande passante des circuits respectifs. La Figure VII.11 représente ces calculs pour différentes fréquences de coupure de l'ATI-C ($f_c = 1/(2 T_t)$) et de l'ATI-R ($f_c = 1/(2 \pi R_G C_s)$). Pour ce dernier, deux valeurs du couple (R_G, C_s) ont été utilisées (100 G Ω , 0.5 pF) et (10 G Ω , 2.2 pF) pour des fréquences de coupure de 3 Hz et 7.5 Hz respectivement.

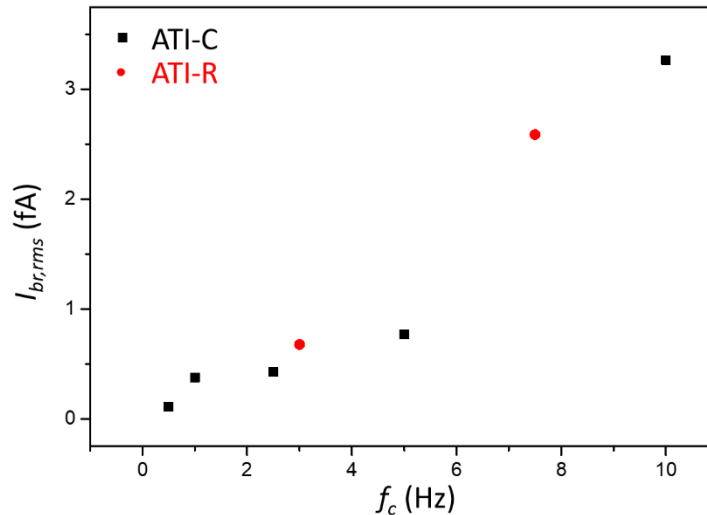


Figure VII.11. Bruit RMS en sortie de l'électromètre ATI-C réalisé (points noirs) et de l'ATI-R classique (points rouges) pour différentes valeurs de f_c . S_e fermé, $V_e = 0$.

La performance globale en bruit de l'ATI-C apparaît très proche de celle de l'ATI-R. Jusqu'à $f_c = 5$ Hz, le bruit RMS mesuré est inférieur au fA et augmente logiquement avec la bande passante de la mesure pour atteindre 3 fA environ à $f_c = 10$ Hz.

Un autre paramètre de comparaison important entre l'ATI-C et l'ATI-R est leurs réponses respectives à des signaux 'rapides' (jusqu'à 5 Hz). Nous avons réalisé des mesures avec les deux montages, soumis en entrée à un courant de forme carrée à différentes fréquences. Les résultats sont représentés en Figure VII.12. Pour chaque signal en entrée testé d'une fréquence/amplitude données, nous avons calibrés les deux appareils avec les paramètres qui reproduisent le signal le plus fidèlement et avec le minimum de bruit. Par exemple pour un signal en entrée de 5 fA crête à crête d'une fréquence de 0.2 Hz, nous avons calibré l'ATI-C sur un temps total de mesure $T_t = 0.33$ s et l'ATI-R sur son gain le plus élevé ($R_G = 100$ G Ω , $C_s = 0.5$ pF), pour obtenir les meilleurs résultats.

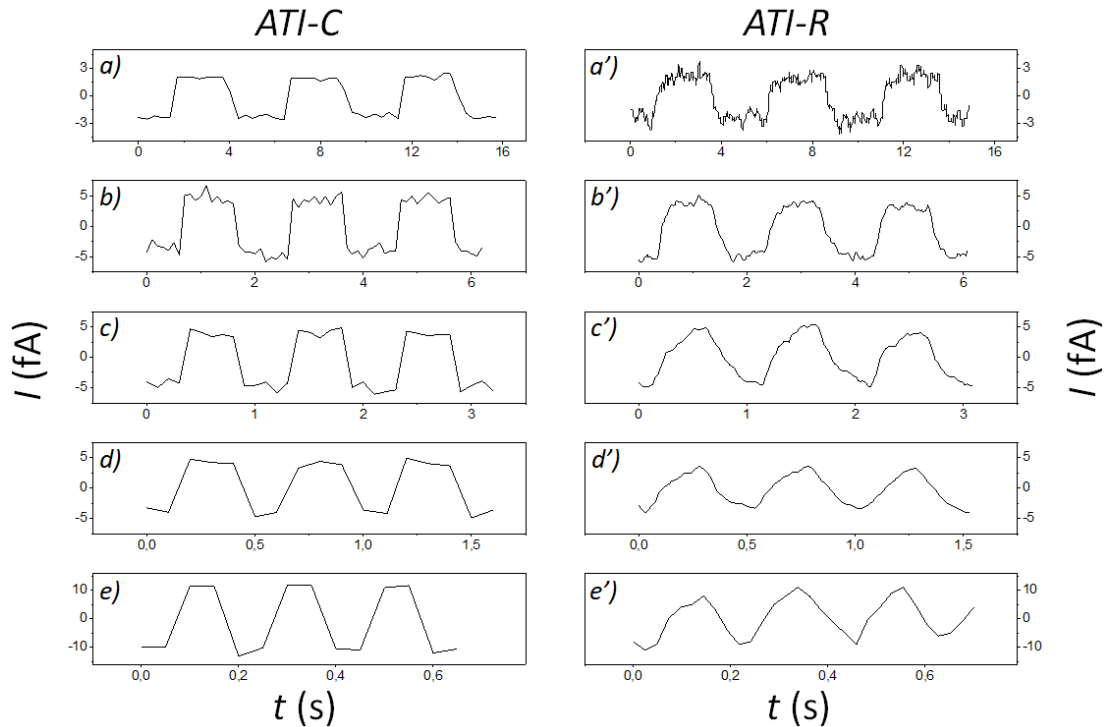


Figure VII.12. Réponse de l’ATI-C (à gauche, $f_e = 30$ kHz, $G_I = 10$) et de l’ATI-R (à droite) à des courants de forme carrée à différentes fréquences et amplitudes. a), a’) $I_e = 5$ fA cc à 0.2 Hz. b), b’) $I_e = 10$ fA cc à 0.5 Hz. c), c’) $I_e = 10$ fA cc à 1 Hz. d), d’) $I_e = 10$ fA cc à 2 Hz. e), e’) $I_e = 24$ fA cc à 5 Hz. a) $T_i = 0.33$ s. b), c), d) $T_i = 0.1$ s. e) $T_i = 0.05$ s. a’), b’), c’), d’) $R_G = 100$ G Ω . e’) $R_G = 10$ G Ω . Courant d’offset compensé.

Globalement, les performances de l’ATI-C sont meilleures que celles de l’ATI-R. Si on compare a) et a’) où la fréquence de I_e est ‘faible’ (0.2 Hz), les deux montages reproduisent plus ou moins la forme carrée du courant d’entrée mais l’ATI-C présente moins de bruit. On voit qu’on mesure 5 fA crête à crête très facilement. Pour les mesures suivantes, l’ATI-C reproduit plus fidèlement la forme du signal d’entrée. A partir de 2 Hz en fréquence d’entrée, l’ATI-R avec $R_G = 100$ G Ω ne suit plus et l’amplitude du courant mesuré est atténuée. A 5 Hz, l’amplitude mesurée par le montage avec cette résistance est très faible, nous avons donc utilisé $R_G = 10$ G Ω . L’ATI-C réalisé atteint sa limite aussi à cette fréquence, à une fréquence plus élevée le signal en courant sera fortement déformé, le nombre de points échantillonnés par période du signal étant trop faible.

5. Conclusions

Nous avons ainsi réalisé un électromètre basé sur un amplificateur transimpédance à contre-réaction capacitive pouvant mesurer des courants de l’ordre du fA en un temps d’intégration court (≤ 1 s) avec succès. Nous avons amélioré légèrement les mesures dans cette gamme de courants par rapport à l’ATI-R utilisé jusqu’à présent par notre équipe en Mt/AFM-SECM. Le

bruit global enregistré sur l'ATI-C est comparable à celui enregistré sur l'ATI-R et les signaux mesurés par le montage réalisé sont plus fidèles et plus représentatifs des courants injectés pour de faibles valeurs, grâce au mécanisme d'intégration. La méthode de calcul de la valeur du courant choisie (calcul de la pente par la méthode des moindres carrés) s'est avérée bien meilleure que le calcul simple par double échantillonnage basé sur l'équation VII.6. Il s'agit du premier prototype de l'appareil réalisé et il peut encore être amélioré de plusieurs manières. Le relais utilisé pour réinitialiser le circuit (l'interrupteur S) perturbe fortement la tension de sortie, nous réfléchissons à plusieurs pistes dont l'utilisation d'un interrupteur CMOS comme ADG602 qui pourrait diminuer ces perturbations et permettre d'obtenir un signal de sortie plus stable ainsi que l'utilisation d'un gain G_I de 100 minimisant ainsi l'impact de la résolution du convertisseur analogique numérique. Les problèmes d'oscillation du contact perturbant le signal mesuré pourraient aussi être minimisés voire supprimés. Néanmoins, un interrupteur CMOS ajouterait du bruit au circuit et il faudra comparer les améliorations par rapport aux limitations associées à cette potentielle solution. Isoler le relais électromagnétiquement pourrait aussi diminuer l'influence des perturbations enregistrées sur les mesures. Une investigation plus avancée de l'influence des défauts associés à l'amplificateur opérationnel sur le décalage en tension notamment, critique pour l'utilisation d'un gain élevé, pourrait peut-être également ouvrir des pistes d'amélioration, selon leur origine et possibilité de compensation analogique. A défaut ou en complément d'augmenter le gain, l'utilisation d'un ADC avec une meilleure résolution pourrait aussi améliorer la précision des mesures. Enfin, la capacité de rétroaction C_i peut être remplacée par une variante plus stable en température et plus précise.

Références du chapitre

- [1] L. Nault *et al.*, “Electrochemical atomic force microscopy imaging of redox-immunomarked proteins on native potyviruses: From subparticle to single-protein resolution,” *ACS Nano*, vol. 9, pp. 4911–4924, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b00952.
- [2] C. Krause, D. Drung, and H. Scherer, “Measurement of sub-picoampere direct currents with uncertainties below ten attoamperes,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 88, no. 2, p. 024711, Feb. 2017, doi: 10.1063/1.4975826.
- [3] M. Carminati, G. Ferrari, and M. Sampietro, “Attofarad resolution potentiostat for electrochemical measurements on nanoscale biomolecular interfacial systems,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 80, no. 12, p. 124701, Dec. 2009, doi: 10.1063/1.3245343.
- [4] M. Carminati, G. Ferrari, D. Bianchi, and M. Sampietro, “Femtoampere integrated current preamplifier for low noise and wide bandwidth electrochemistry with nanoelectrodes,” *Electrochim. Acta*, vol. 112, pp. 950–956, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.03.093>.
- [5] “Note: Expanding the bandwidth of the ultra-low current amplifier using an artificial negative capacitor,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 87, no. 4, p. 046102, Apr. 2016, doi: 10.1063/1.4946766.
- [6] R. G. Kakerow, H. Kappert, E. Spiegel, and Y. Manoli, “Low-power Single-chip CMOS Potentiostat,” in *Proceedings of the International Solid-State Sensors and Actuators Conference - TRANSDUCERS '95*, 1995, vol. 1, pp. 142–145, doi: 10.1109/SENSOR.1995.717115.
- [7] S. K. Mohanan, H. Boukabache, D. Perrin, and U. R. Pfeiffer, “Comparative Analysis of Ultra-Low Current Measurement Topologies With Implementation in 130 nm Technology,” *IEEE Access*, vol. 9, pp. 63855–63864, 2021, doi: 10.1109/ACCESS.2021.3074464.
- [8] R. Fitzgerald *et al.*, “The next generation of current measurement for ionization chambers,” *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 163, p. 109216, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109216>.
- [9] M. Rajabzadeh, D. Djekic, M. Haeberle, J. Becker, J. Anders, and M. Ortmanns, *Comparison Study of Integrated Potentiostats: Resistive-TIA, Capacitive-TIA, CT $\Sigma\Delta$ Modulator*. 2018.
- [10] A. Mortuza *et al.*, “Pico-current Measurement Challenges and Remedies: A Review,” *Univers. J. Eng. Sci.*, vol. 5, pp. 57–63, Nov. 2017, doi: 10.13189/ujes.2017.050401.
- [11] A. Gore, S. Chakrabarty, S. Pal, and E. Alocilja, “A Multi-channel Femtoampere-sensitivity Conductometric Array for Biosensing Applications,” *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*,

- vol. Suppl, pp. 6489–6492, Feb. 2006, doi: 10.1109/IEMBS.2006.260865.
- [12] G. D. Koutilellis, A. Economou, and C. E. Efstathiou, “A potentiostat featuring an integrator transimpedance amplifier for the measurement of very low currents—Proof-of-principle application in microfluidic separations and voltammetry,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 87, no. 3, p. 034101, Mar. 2016, doi: 10.1063/1.4942915.
- [13] D. Kim, B. Goldstein, F. Sigworth, and E. Culurciello, “Noise Analysis and Performance Comparison of Low Current Measurement Systems for Biomedical Applications,” *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 7, pp. 52–62, Feb. 2013, doi: 10.1109/TBCAS.2012.2192273.
- [14] S. Shahdoost, A. Medi, and N. Saniei, “Design of low-noise transimpedance amplifiers with capacitive feedback,” *Analog Integr. Circuits Signal Process.*, vol. 86, no. 2, pp. 233–240, 2016, doi: 10.1007/s10470-015-0669-x.
- [15] E. Voulgari, M. Noy, F. Anghinolfi, F. Krummenacher, and M. Kayal, “Utopia: a Nine Decade Femtoampere Sensitivity Current Digitizer and its Application in Ionizing Radiation Monitoring,” *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, vol. PP, p. 1, Feb. 2018, doi: 10.1109/TNS.2018.2803339.
- [16] G. Ferrari and M. Sampietro, “Wide bandwidth transimpedance amplifier for extremely high sensitivity continuous measurements,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 78, no. 9, p. 094703, Sep. 2007, doi: 10.1063/1.2778626.
- [17] G. Ferrari, F. Gozzini, A. Molari, and M. Sampietro, “Transimpedance Amplifier for High Sensitivity Current Measurements on Nanodevices,” *Solid-State Circuits, IEEE J.*, vol. 44, pp. 1609–1616, Jun. 2009, doi: 10.1109/JSSC.2009.2016998.
- [18] M. Crescentini, M. Bennati, M. Carminati, and M. Tartagni, “Noise Limits of CMOS Current Interfaces for Biosensors: A Review,” *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 8, pp. 278–292, Apr. 2014, doi: 10.1109/TBCAS.2013.2262998.

Annexe du chapitre VII

1. Complément d'informations sur la construction de l'appareil réalisé

Dans cette section, plus de détails sont fournis sur la construction et le fonctionnement des différentes parties du système de mesure réalisé.

Tous les composants actifs dont les amplificateurs sont alimentés par une alimentation linéaire bipolaire commerciale à ± 5 V. La carte Arduino est alimentée par câble USB.

Le circuit d'adaptation mentionné dans le manuscrit (Figure VII.3) permet de convertir la plage de tension de sortie V_s (± 5 V) en une tension de 0 – 3.3 V adaptée à l'entrée de l'Arduino (Figure AVII.1).

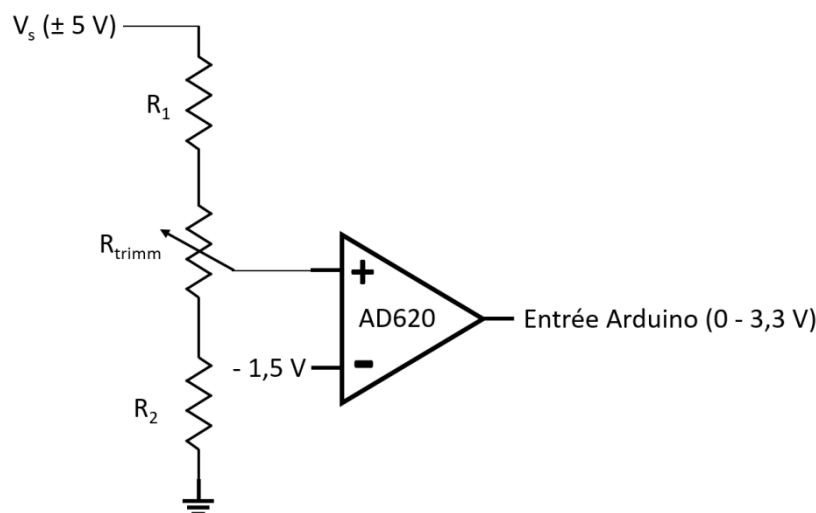


Figure AVII.1. Circuit d'adaptation de la tension de sortie V_s en une tension de 0 – 3.3 V adaptée à l'entrée de l'Arduino. $R_1 = 4.9$ k Ω , $R_2 = 1.5$ k Ω , $R_{trimm} = 2$ k Ω . Le gain de l'AD620 est de 1.

Il est composé d'un diviseur de tension (division par 3) connecté à l'entrée d'un amplificateur différentiel (AD620) sur lequel une tension de 1.5 V est ajoutée à la tension de sortie du diviseur de tension.

La Figure AVII.2 est une photo montrant la disposition des différents composants du premier étage du circuit (l'ATI-C).

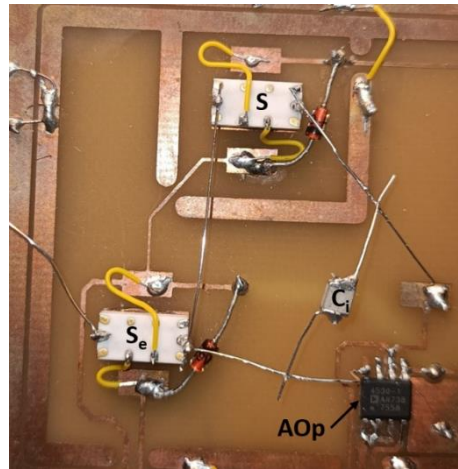


Figure AVII.2. Disposition réelle des composants constituant l'ATI-C. Toutes les connexions à l'entrée de l'AOp sont reliées « en l'air ».

Sur ce circuit, l'entrée de l'AOp et toutes les connexions reliées à elle sont volontairement « en l'air », non connectées au substrat (PCB), afin d'éviter l'injection de courants parasites pouvant atteindre plusieurs pA. Les interrupteurs S et S_e sont collés à l'envers sur le PCB pour permettre leur soudure en l'air facilement. Tous les composants et le PCB ont été nettoyés avec des lingettes essuyieuses de précision imbibées d'éthanol avant et après les soudures.

L'interface Labview qui commande l'appareil réalisé est représentée en Figure AVII.3.

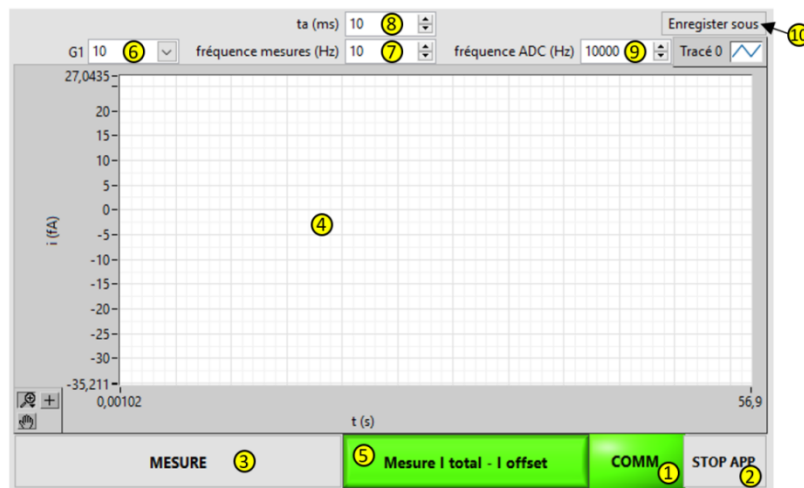


Figure AVII.3. Interface LabVIEW utilisée pour communiquer avec l'appareil réalisé. Communication par USB.

Elle assure la communication avec la carte Arduino via USB. Les points numérotés représentent :

1. Vérification de la connexion à la carte Arduino (fonction communication).
2. Arrêt de l'application.
3. Démarrer/arrêter une mesure.
4. Affichage des données.
5. Choix : mesurer le courant d'offset ou le courant utile (courant total – courant d'offset).
6. Définition du gain du deuxième étage G_I .
7. Définition de la fréquence de mesure $f_i = 1/T_i$.
8. Définition du temps d'attente T_a .
9. Définition de la fréquence de conversion analogique numérique f_e .
10. Enregistrement des données.

La transmission des données par la carte Arduino se fait point par point avec une fréquence de transmission maximale de 20 Hz (fréquence de mesure maximale implémentée sur l'appareil).

La Figure AVII.4 représente l'algorithme simplifié d'une étape de mesure au niveau de la carte Arduino. Chaque étape fournit une valeur du courant qui est transmise à l'application LabVIEW.

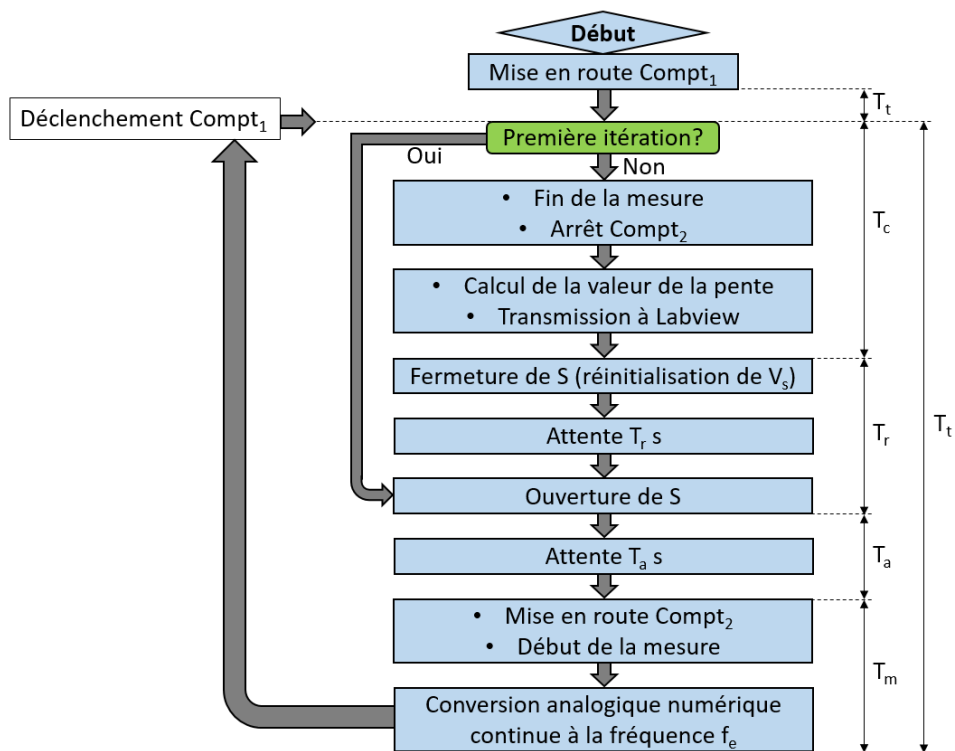


Figure AVII.4. Algorithme simplifié d'une étape de mesure au niveau de l'Arduino.

Deux compteurs en interruption sont utilisés. Le premier (Compt₁) est programmé pour déclencher une interruption périodique de période T_t qui marque le début d'une nouvelle étape de mesure. Le deuxième (Compt₂) est utilisé pour réaliser la conversion analogique numérique de la tension V_s à des temps précis, à la fréquence f_e . A chaque interruption provoquée par le compteur Compt₂, une conversion est réalisée. La mesure commence à la réception par USB de la commande associée, et continue jusqu'à la réception de la commande 'arrêt de la mesure'. Tous les paramètres de mesure apparaissant en Figure AVII.3 sont définis avant la mesure et ne peuvent pas être modifiés pendant.

2. Analyse des perturbations enregistrées sur la tension V_s pendant les mesures

Comme présenté dans le manuscrit, nous avons réussi à minimiser le courant de fuite anormalement élevé que nous avons enregistré sur nos premières mesures avec l'appareil en diminuant le temps de réinitialisation du circuit à 0.5 ms. Cependant, le saut en potentiel lié vraisemblablement à une injection de charges à l'ouverture de l'interrupteur S et/ou à la tension d'offset de l'AOp, et les pics mesurés à la commutation de S sont toujours présents. Dans cette partie, nous allons apporter plus d'éléments sur ces phénomènes et essayer de les analyser plus en profondeur.

La Figure AVII.5a représente la tension de sortie V_s obtenue sur la durée d'une étape de mesure. La Figure AVII.5b est un zoom sur la période où l'interrupteur S est commuté.

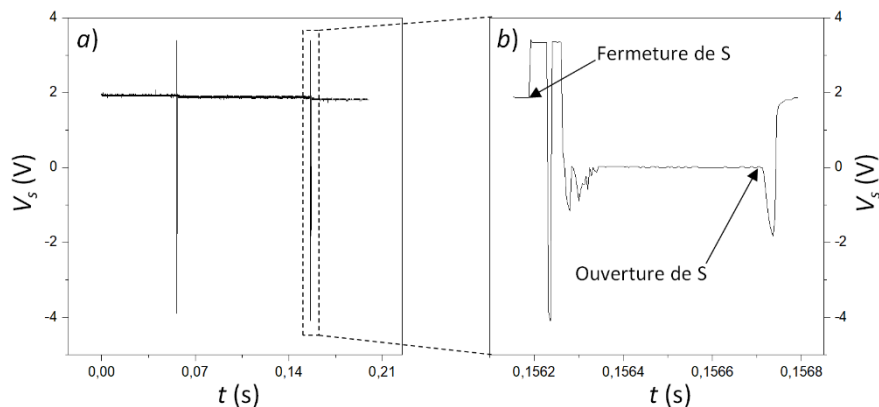


Figure AVII.5. Illustration des perturbations mesurées sur la tension de sortie V_s à la commutation de S. a) Tension de sortie obtenue sur une étape de mesure complète. b) Zoom à partir de la Figure AVII.5a sur la période où S est fermé puis ouvert. $T_t = 100$ ms, $G_I = 10$.

A la fermeture de S pour commander la remise à zéro, des oscillations apparaissent, visibles sur la Figure VII.5, qui provoquent la saturation de l'AOp aussi bien sur les potentiels positifs que négatifs (alimentation ± 5 V) avant que la valeur de la tension de sortie ne se stabilise à

0 V. Heureusement, ces oscillations sont assez brèves (150 μ s) et ne provoquent pas le dysfonctionnement de l'AOp. Nous les attribuons à la commande de fermeture du relai Reed par champ électromagnétique généré par la bobine constitutive, dont l'isolation n'est pas parfaite [1].

A l'ouverture de S , quand la bobine de l'interrupteur est déconnectée (interrupteur normalement ouvert), une forte impulsion inductive négative (100 V à 200 V), se produit au niveau de la bobine permettant la déconnection très rapide du contact. Cette impulsion peut grandement perturber les mesures, pour la diminuer nous avons rajouté une diode de roue libre en parallèle à la bobine de l'interrupteur (Figure AVII.6) qui diminue l'amplitude de l'impulsion à une dizaine de volts, mais cet ajout augmente le temps de déconnection du contact. Ici ce temps reste raisonnable pour notre application ($\sim 50 \mu$ s). A défaut, une diode zener peut être ajoutée en série avec la diode de roue libre permettant de diminuer ce temps. Avec ça, un régime transitoire est quand même observé, quoique moindre par rapport à celui observé à la fermeture de S , ce qui est cohérent dans le cas du contact choisi, normalement ouvert de sorte qu'aucune action de commande n'est appliquée sur le relais dans cette phase de mesure, permettant de limiter le bruit associé. Ainsi, un seul pic négatif est observé, qui cette fois-ci ne provoque pas la saturation de l'AOp, avant que le potentiel ne se stabilise à environ 2 V, soit 0,2 V en sortie de l'étage d'intégration. Cet offset est dû à priori à l'injection de charges par l'interrupteur S et à la tension d'offset de l'AOp discutées dans le manuscrit.

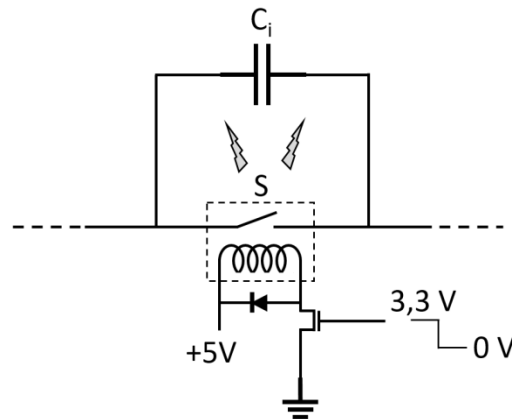


Figure AVII.6. Illustration de l'influence des variations de champ électromagnétique générées par l'interrupteur S sur la tension V_s mesurée.

Considérant l'origine de ces effets, nous avons pu vérifier que l'ajout d'une résistance de 1 k Ω en série avec l'interrupteur S permettait d'amortir légèrement les pics et oscillations à la fermeture de l'interrupteur, mais l'AOp sature toujours et le pic à l'ouverture est toujours présent (Figure AVII.7). L'ajout d'une résistance en série avec la capacité d'intégration C_i n'a

pas induit de changement notable sur les perturbations mesurées. Aussi, il a été décidé à ce stade, de procéder aux essais de mesure de courant, en dégagant en perspectives des voies d'améliorations à étudier ultérieurement à partir des résultats préliminaires obtenus dans le cadre de ce travail de thèse.

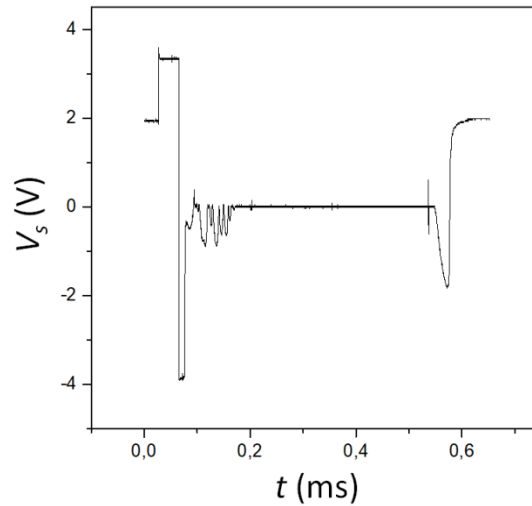


Figure AVII.7. Illustration des perturbations mesurées sur la tension de sortie V_s à la commutation de S avec l'ajout d'une résistance de $1\text{ k}\Omega$ en série avec l'interrupteur. $T_i = 100\text{ ms}$, $G_I = 10$.

- [1] S. Electronics, "Reed switches used in reed relay application," [Online]. Available: <https://standelectronic.com/reed-relays/reed-switches-used-in-a-reed-relay-application/>.

Conclusion générale et perspectives

Conclusions

Nous avons exploré dans ce travail deux stratégies expérimentales distinctes destinées à repousser les limites de la mesure de courants électrochimiques ultra-faibles.

La première approche, entièrement originale, repose sur la conversion des courants électrochimiques générés à une microélectrode sous contrôle potentiostatique en une émission lumineuse, pouvant à priori être mesurée bien plus sensiblement qu'un courant. Plusieurs schémas de conversion, ayant chacun ses avantages propres ont été proposés. Le premier est basé sur le couplage entre événements faradiques à l'électrode de travail et génération de molécules fluorescentes à la contre-électrode. Nous avons validé le principe de ce dispositif pour traduire en fluorescence des réactions faradiques aussi bien anodique que cathodique, en choisissant une espèce fluorogène reportrice adéquate. Incidemment, nous avons montré qu'un courant capacitif à l'électrode pouvait également être transduit de la sorte, mettant ainsi en évidence un phénomène de couplage entre courant capacitif et faradique, rarement observé jusqu'ici. Pour ces expériences de preuves de principes, des courants de l'ordre du nA ont été ainsi convertis et mesurés, mais nous pensons que le couplage courant/fluorescence est à même d'accroître la sensibilité des mesures en électrochimie bien au-delà, sachant que chaque molécule fluorescente produite à la contre-électrode peut émettre une multitude de photons avant de « disparaître », par blanchiment ou diffusion. La contrepartie à cette sensibilité potentielle est l'accumulation de l'espèce fluorescente au voisinage de l'électrode, qui limite la bande passante de la mesure. C'est pour remédier à cela que nous avons cherché dernièrement à remplacer la fluorescence par l'électrochimiluminescence (ECL) comme source de signal lumineux associé à la génération de petits courants. Les expériences de preuve de concept ont été concluantes et ont montrées une linéarité remarquable entre courant et émission ECL, associée à une absence complète d'accumulation de l'espèce luminescente devant se traduire par une amélioration de la bande passante de la mesure, par rapport à la transduction par fluorescence. Le plus faible nombre de photons émis en ECL devrait pouvoir être en partie compensé par l'emploi d'un photomultiplicateur ultra-sensible comme détecteur optique.

La seconde approche, moins exploratoire et « révolutionnaire » que la première, mais pouvant répondre plus immédiatement aux besoins de mesure de l'équipe, a consisté en la mise au point d'un électromètre basé sur un amplificateur transimpédance à contre-réaction

Conclusion générale

capacitive. Le premier prototype est capable de mesurer des courants de l'ordre du fA et rivalise déjà avec les performances de l'ATI-R utilisé dans nos expériences en Mt/AFM-SECM, ainsi qu'avec celles d'appareils similaires reportés dans la littérature.

Perspectives

Nous pensons que, bien qu'encore non optimisé, notre dispositif de conversion courant/ECL doit permettre d'acquérir des données inédites dans le domaine de l'électrochimie de « nano-impacts ». En effet, les résultats préliminaires décrits au chapitre VI du manuscrit ont montré qu'il présente d'ores et déjà une sensibilité et une bande passante suffisante pour transduire des événements individuels de collision de nanoparticules de platine en un événement ECL simultanée. Nous souhaitons à court terme poursuivre ces études, avec ce même système, pour acquérir des données plus robustes, et aussi mettre en évidence l'apport en bande passante de la détection « lumineuse » de collision. Nous espérons ainsi mieux résoudre la structure fine des pics d'émission, révélant toute la complexité du comportement dynamique des particules lors de la collision catalytique.

Nous voulons également adapter notre système de conversion à la détection d'événements anodiques, telle que l'électro-dissolution de nanoparticules d'argent lors de collisions. Il nous faudra auparavant adapter notre convertisseur courant/ECL à la détection de courants anodiques. Nous nous appuyerons pour cela sur le phénomène d'émission cathodique d'ECL par le L-012, récemment rapporté par l'équipe de Neso Sojic de l'université de Bordeaux, et qui implique l'emploi du fer (ou d'inox) comme matériau d'électrode [1].

Nous voulons également simplifier notre montage convertisseur, afin de le rendre plus utilisable en pratique, en développant des opto-électrodes fibrées (utilisées comme contre-électrodes), qui permettraient d'acheminer la lumière ECL directement vers un PMT, sans en passer par un microscope. Ainsi il suffirait de relier, par un simple pont ionique, n'importe quelle cellule électrochimique où se produit un événement faradique d'intérêt à une électrode, à un compartiment mobile comprenant le système ECL et l'opto-électrode reliée à un PMT pour enregistrer un signal lumineux traduisant sensiblement le processus électrochimique étudié.

Il va de soi que ces différents développements très concrets seront également l'occasion d'améliorer la sensibilité de la conversion vers la mesure de courants d'intensités toujours décroissantes, et que nous chercherons à mettre en évidence la limite ultime de ce dispositif.

Enfin, nous pensons qu'une certaine marge de progression reste également possible quant à la sensibilité de l'électromètre à contre-réaction capacitive que nous avons réalisé. Nous

Conclusion générale

espérons en améliorer les performances, notamment par le remplacement ou « l'optimisation » de l'interrupteur de remise à zéro. Il paraît même raisonnable d'envisager, à court terme, de faire de cet appareil le mesureur de courant dédié à nos mesures ultimes en microscopie Mt/AFM-SECM.

- [1] M. Feng, A. L. Dauphin, L. Bouffier, F. Zhang, Z. Wang, and N. Sojic, "Enhanced Cathodic Electrochemiluminescence of Luminol on Iron Electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 49, pp. 16425–16431, Dec. 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c03139.

Conclusion générale

Partie expérimentale

1. Produits et solutions

Origine des produits

La Résazurine, RZ (BioReagent, d'une pureté de ~80%), la Résorufine, RF (95%), le 1-1'-ferrocènediméthanol, FcdiOH (97%), la p-benzoquinone, BQ (99.5%), le 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic sel trisodique acide, HPTS (96%), l'Amplex Red, AR (98%), le chlorure d'hexaammineruthenium(III), RhHex (98%), Le tris(2,2'-bipyridine)dichloro-ruthénium(II), $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (99%) et la tripropylamine, TPrA (98%), ont été achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés tel que reçus. Le L-012, 8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)-dione, (FUJIFILM Wako Pure Chemicals, 90%) a été acheté chez FUJIFILM et utilisé sans purification supplémentaire. La solution de nanoparticules (NP) de platine (NanoXact, 70 nm, 0.05 mg/ml, dans 2 mM citrate) a été achetée chez NanoComposix. Les solutions diluées d'acide chlorhydrique (HCl) et d'acide acétique (AA) ont été préparées à partir de produits concentrés à 1 M (TitriNorm VWR Chemicals).

Préparation des tampons et solutions

Toutes les solutions et électrolytes ont été préparés avec une eau ultra-pure (Milli-Q Millipore de résistivité $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Le tampon carbonate (0.1 M, pH = 10) a été préparé avec 60 mM de sodium bicarbonate (NaHCO_3) et 40 mM de sodium carbonate (Na_2CO_3). Le tampon PBS (0.15 M NaCl, pH = 7.4) a été préparé avec 10 mM de phosphate de monopotassium (KH_2PO_4), 0.15 M de chlorure de sodium (NaCl) et 8.4 mM de soude (NaOH). Le tampon phosphate (0.1 M, pH = 7.4) a été préparé avec 23 mM de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) et 77 mM d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4). La solution contenant l'Amplex Red a été préparée en solubilisant d'abord la molécule à 10 mM dans 0.25 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO), puis mélangée au tampon PBS, dans une fiole de 10 ml. La solution $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ a été préparée en partant d'une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dans le tampon phosphate à laquelle la TPrA sous forme liquide, non soluble à ce pH a été ajoutée. Pour dissoudre la TPrA, nous avons acidifié la solution avec de l'acide phosphorique (H_3PO_4) ajouté progressivement sous agitateur magnétique et contrôlé par pH mètre jusqu'à arriver à un pH inférieur à 3, puis le pH est ramené à sa valeur initiale en ajoutant de la soude. La solution de NP de platine est préparée avec 3.6 ml d'une solution de 10 mM sodium dihydrogénéocitrate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$) pH = 3.8, dont le pH a été ajusté à 4 en y

ajoutant de la soude, et 0.4 ml de la solution commerciale contenant les NP (2 mM citrate), pour une concentration en NP de 2 pM.

2. Simulations

Les CV et CVF, à des électrodes micrométriques et millimétriques, ont été simulées à l'aide des logiciels DigiElch professional V7 et COMSOL Multiphysic 4.4, respectivement.

3. Dispositifs techniques et appareillage

Cellule électrochimique

Une photographie de la cellule électrochimique utilisée pour nos expériences de couplage luminescence/courant et un schéma explicatif de son utilisation sont représentés ci-dessous.

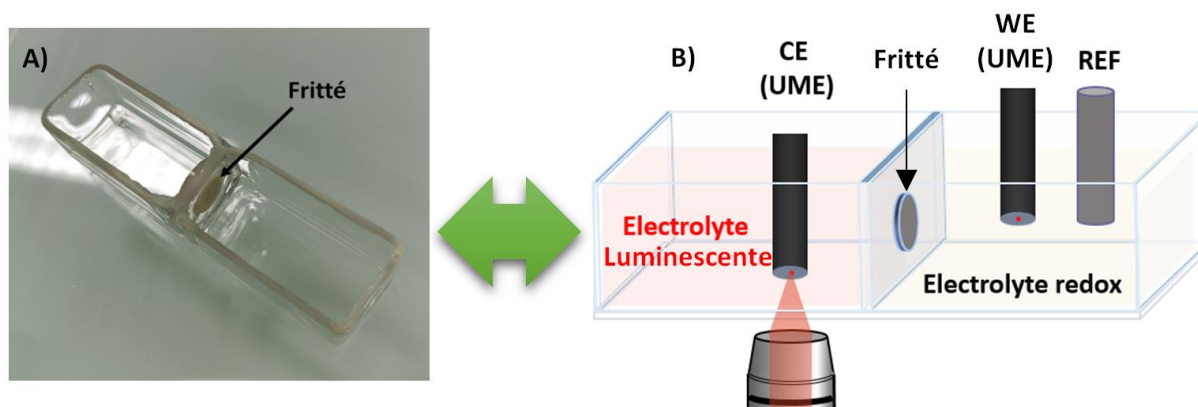


Figure E1. Cellule électrochimique utilisée pour le couplage luminescence/courant.

La cellule a été fabriquée par le verrier de l'université. Elle est constituée de deux compartiments en verre d'une contenance d'environ 5 ml chacun séparés par un fritté fondu dans le verre. Le fond de la cellule est transparent et fin pour une observation optimale de l'électrode à travers, via l'objectif du microscope inversé. La contre-électrode est placée dans l'un des compartiments de la cellule avec l'électrolyte contenant l'espèce luminescente, à une distance du fond d'environ 500 μm , ajustée par un micromanipulateur (Sutter Instruments). Le champ optique de l'objectif du microscope est focalisé à la surface de cette électrode comme illustré en Figure E1B. L'électrode de travail et l'électrode référence sont placées dans l'autre compartiment avec l'électrolyte contenant l'espèce d'intérêt dont on veut étudier la réaction.

Les expériences en configuration classique (chapitre IV, Figure IV.3) ont été réalisées dans une cellule à compartiment unique à fond transparent. Dans ce cas l'objectif du microscope est focalisé sur l'électrode de travail.

Electrodes

L'électrode de référence utilisé pour toutes les expériences réalisées dans cette thèse est une électrode Dri-ref (Ag/AgCl, KCl 3M, Dri-ref-2SH, WPI). Tous les potentiels reportés dans ce travail sont exprimés par rapport à l'électrode de référence au calomel saturée en KCl (SCE), de potentiel + 0.05V/Dri-ref. Toutes les expériences en configuration classique (voir chapitre IV, Figure IV.3) ont été réalisées avec un fil de platine comme CE. Toutes les UME utilisées en tant que WK ou CE ont été fabriquées au LEM dans le cadre de cette thèse.

Fabrication d'ultra-micro électrodes (UME) :

Les électrodes en carbone de 25 μm de diamètre ont été réalisées selon une procédure en 9 étapes, détaillées ci-après et illustrée en Figure E2, mise au point spécifiquement lors de ce travail de thèse.

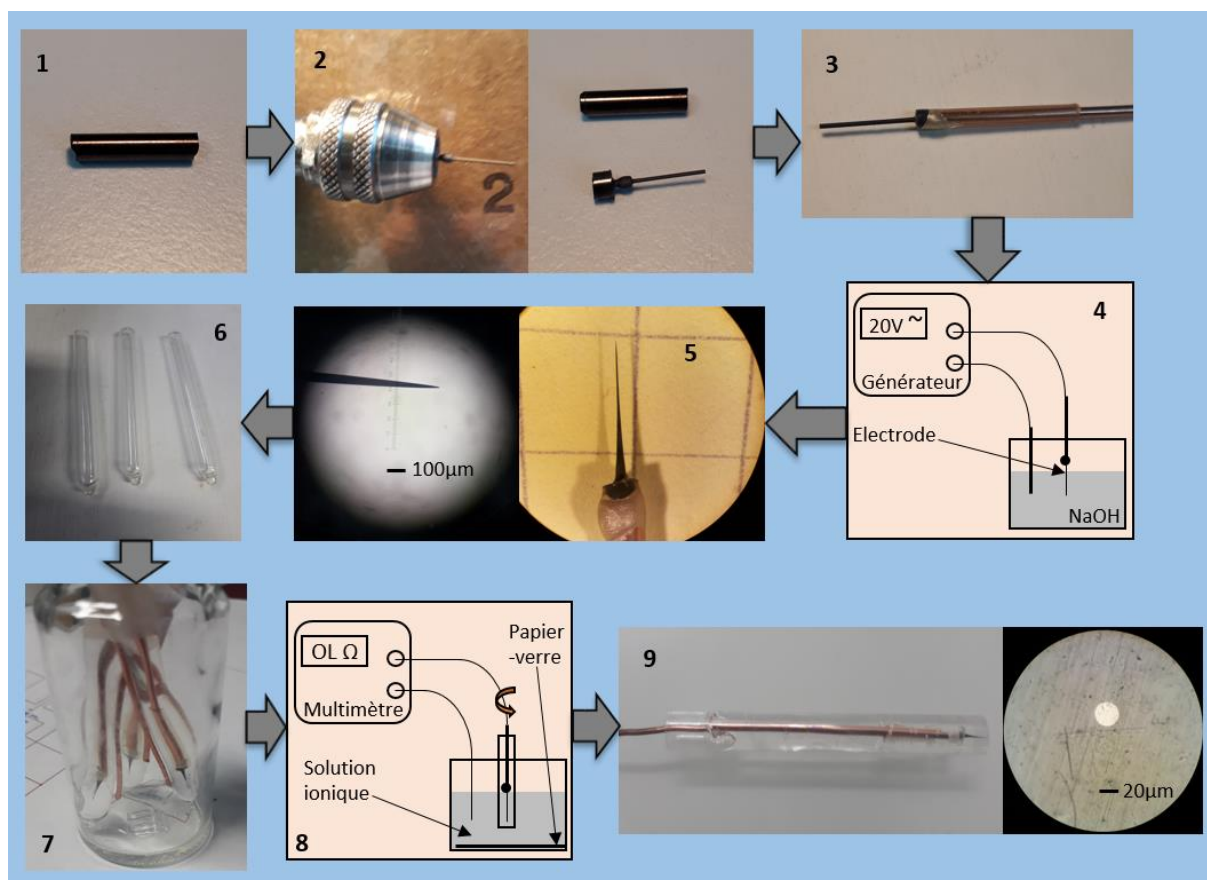


Figure E2. Etapes de fabrication d'UME en carbone vitreux de 25 μm de diamètre, numérotées de 1 à 9.

- 1- Un barreau de carbone Tokai, de 2,5 mm de diamètre, est découpé sur ~2 cm.
- 2- Le barreau est fixé dans un mandrin de perceuse, pour pouvoir réduire son diamètre à 1 mm environ par action rotative sur du papier abrasif.
- 3- Le barreau est connecté à un fil de cuivre à l'aide d'une colle conductrice à l'argent, séchée à l'air chaud à 300°C.
- 4- L'extrémité du barreau, de diamètre réduit à ~1 mm, est plongée dans une solution de soude (NaOH) à 1 mM, et relié par le fil de cuivre à un générateur de tension alternative (+/-20 V). La tension est appliquée pendant quelques dizaines de secondes, l'autre pôle du générateur étant relié par un barreau de carbone quelconque plongé dans la solution.
- 5- Après cela, on obtient une pointe effilée, dont le diamètre à l'extrémité est inférieur à 10 µm.
- 6- Pour isoler l'électrode, on prépare un capillaire en verre dont l'extrémité est fondue.
- 7- Une résine époxy bi-composante (EPOTEK 377) est introduite dans le capillaire, puis on y insère le barreau effilé. La résine se solidifie après quelques heures à température ambiante.
- 8- Ensuite, l'extrémité du capillaire est d'abord grossièrement polie avec du papier de verre, puis par polissage fin à la polisseuse, pour abraser la paroi en verre du capillaire. A ce stade, le carbone n'est pas exposé. Un polissage manuel sur papier à fine granulométrie est ensuite pratiqué, suivi pas à pas par une mesure régulière de conductimétrie dans une solution ionique (NaCl 0,1 M). Pour cela, le capillaire est connecté, via le fil de cuivre, à l'une des bornes d'un multimètre réglé sur la mesure de résistance électrique, et un second fil quelconque plongé dans la solution est connecté à la seconde borne du multimètre. Le polissage est poursuivi jusqu'à ce que le multimètre affiche une résistance non infinie, indiquant que l'extrémité de la pointe de carbone est exposée.
- 9- Enfin, l'électrode est finalement polie manuellement pour ajuster son diamètre à 25 µm, par observation régulière au microscope.

Les électrodes de 8 µm de diamètre en carbone ont été fabriquées à partir d'une fibre de carbone de même diamètre scellé dans un capillaire de 1,5 mm de diamètre en verre selon les étapes de 6 à 9 décrites ci-dessus.

Les UME en or et platine ont été fabriquées en scellant le fil métallique correspondant, de 25 μm de diamètre, dans un capillaire en verre. Pour ce faire le verre est simplement fondu avec un chalumeau, puis des épates de polissage sur polisseuse puis manuelle permettent d'exposer l'extrémité du fil.

Dispositifs de mesure du courant et de l'intensité lumineuse

La luminescence à la surface des électrodes a été imagée à l'aide d'un microscope inversé à champ lointain (IX71, Olympus) connecté à une caméra CMOS (KURO 1200B, Princeton Instruments, 95% QE, taille de pixel 11 x 11 μm). Une série d'images de l'électrode sont enregistrées sous la forme d'un film. La valeur normalisée de la luminescence mesurée à un instant donné est la moyenne de la lumière émise par chaque pixel, sur toute ou une partie de l'image de l'électrode capturée par la caméra (Figure E3).

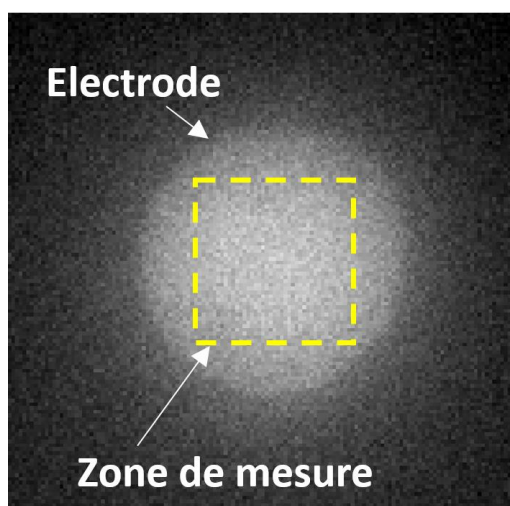


Figure E3. Image d'une électrode où une réaction générant de la lumière se produit, capturée par la caméra. La luminescence est moyennée sur l'ensemble des pixels présents dans la zone encadrée en jaune.

Un temps d'exposition de 50 à 200 ms par image a été utilisé. La valeur initiale de luminescence mesurée (offset) est systématiquement soustraite. Pour toutes les expériences décrites en chapitre IV, un potentiostat OGS100 (Origalys ElectroChem, France) contrôlé par son propre logiciel de mesure a été interfacé avec le système d'imagerie décrit précédemment, contrôlé par le logiciel LightField 6.0, pour des mesures courant/fluorescence synchronisées. Dans les chapitres suivants, le potentiostat OGS100 a été remplacé par un potentiostat fait maison réalisé dans le cadre de cette thèse. A partir de là, les mesures de courant et de luminescence sont synchronisées par une application LabVIEW contrôlant le potentiostat et la caméra (Figure E4).

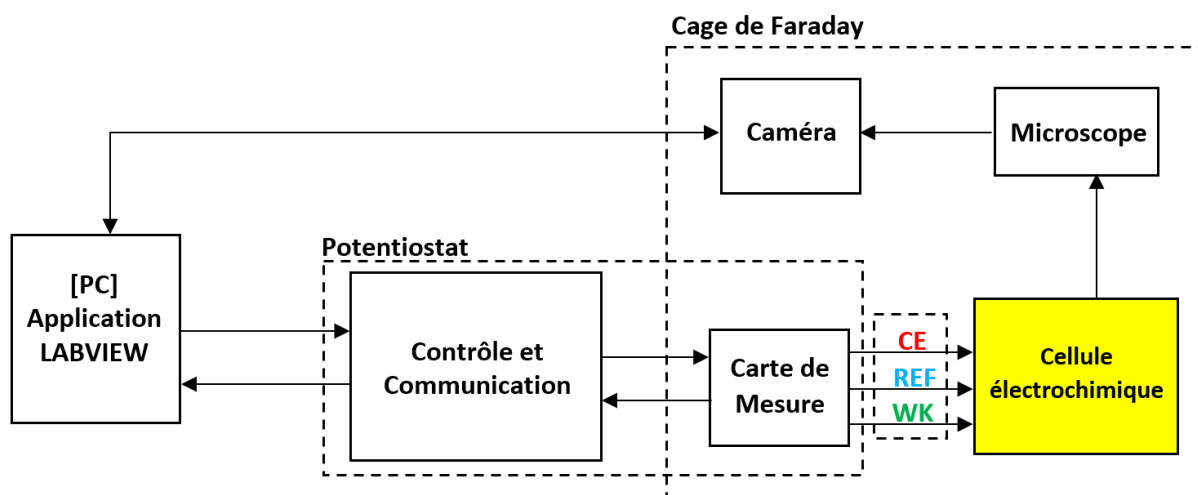


Figure E4. Configuration instrumentale des expériences de couplage courant/luminescence.

Le potentiostat réalisé a une gamme de mesure de courants allant du fA au μ A. Il est constitué de deux parties : une unité de contrôle et une carte de mesure séparée pour pouvoir être rapprochée le plus possible de l'expérience. Les parties sensibles au bruit électromagnétique sont placées et maintenues dans le noir dans une cage de faraday.

Configuration de la microscopie à épifluorescence :

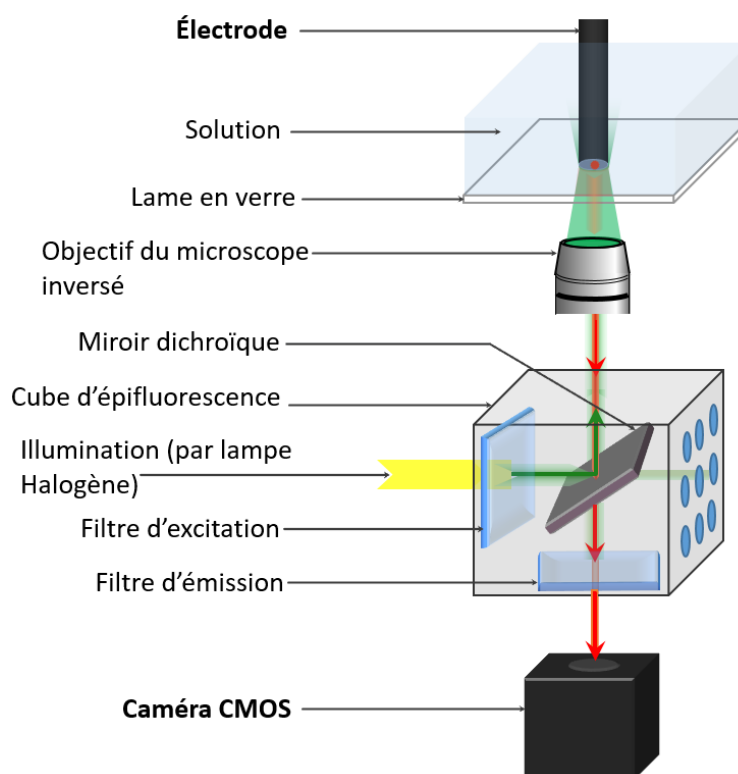


Figure E5. Configuration de la microscopie à épifluorescence.

Le schéma fonctionnel de la configuration de la microscopie à épifluorescence utilisée est représenté en Figure E5. Elle concerne spécifiquement la fluorescence, puisqu'en électrochimiluminescence aucune lampe n'est nécessaire, et le cube d'épifluorescence est retiré.

L'objectif du microscope est focalisé sur l'électrode où la réaction fluorogénique se produit. L'électrode est éclairée avec une lumière 'd'excitation' de longueur d'onde dans la gamme d'absorbance de l'espèce fluorescente, qui est produite par une lampe halogène de 100 W à travers un filtre passe-bande centré sur la longueur d'onde d'excitation. Un miroir dichroïque permet de diriger la lumière d'excitation vers l'objectif du microscope et vers l'électrode. La fluorescence générée à la surface de l'électrode passe à travers le miroir dichroïque et à travers un filtre d'émission passe-haut éliminant des longueurs d'onde non utiles, dont la longueur d'onde d'excitation puis est récoltée par la caméra CMOS.

Références du matériel utilisé :

- Objectifs :
 - Chapitre IV : Olympus Plan 10X/0.25 Ph1.
 - Chapitre V, VI : Olympus SLCPIFI 40X/0,55, Ph2.

Un grossissement de 1.6X interne au microscope a été systématiquement ajouté.

- Cube d'épifluorescence utilisé pour l'étude de la résazurine et de l'Amplex Red (incluant les deux filtres d'excitation et d'émission et le miroir dichroïque), U-MWG2, Olympus :

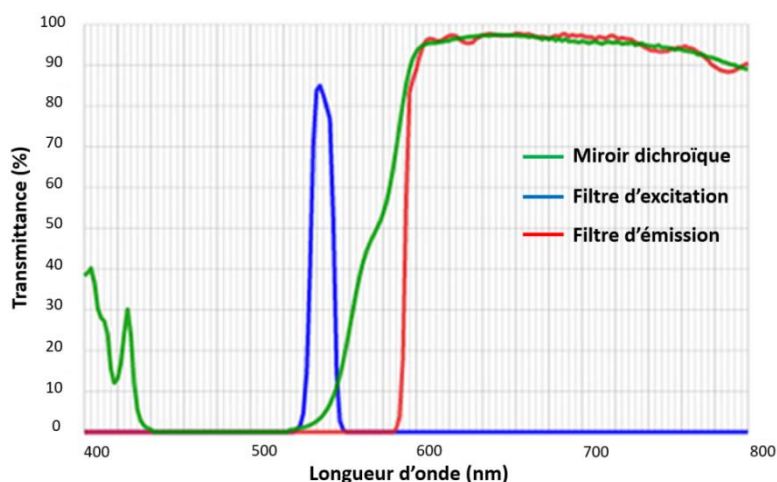


Figure E6. Caractéristiques spectrales du cube d'épifluorescence utilisé dans le cas de la résazurine et de l'Amplex Red.

- Filtre d'excitation : **passé-bande 510-550 nm** (dans le vert)
 - Miroir dichroïque : **coupe entre 560 et 590 nm.**
 - Filtre d'émission : **passé-haut 590 nm.**
- Cube d'épifluorescence utilisé pour l'étude de l'HPTS, U-MGWB2, Olympus :
 - Filtre d'excitation : **passé-bande 460-490 nm** (dans le bleu).
 - Miroir dichroïque : **coupe à 500 nm.**
 - Filtre d'émission : **passé-haut 520 nm.**
 - Caméra : Princeton KURO 1200B.

4. Caractéristiques fluorogéniques de la résazurine et de la résorufine.

Les profils de fluorescence de RZ et RF avec les caractéristiques du cube d'épifluorescence utilisé sont représentés en Figure E7.

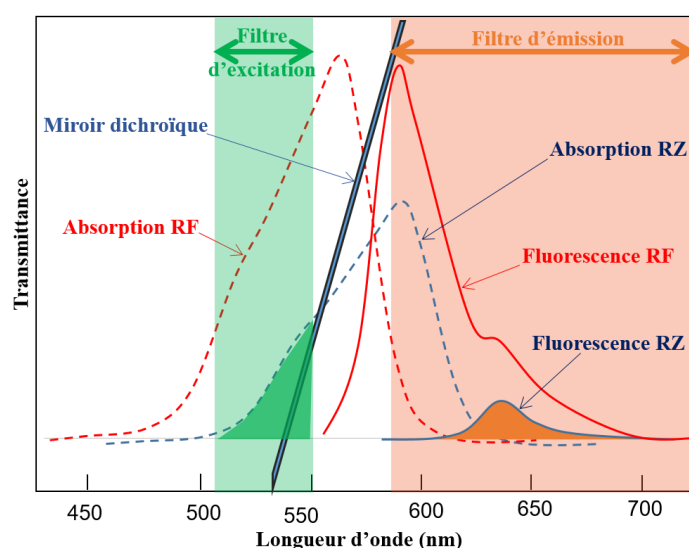


Figure E7. Profils de fluorescence de la résazurine (RZ) et de la résorufine (RF) avec le cube d'épifluorescence utilisé.

Les spectres d'absorption de la résazurine et de la résorufine sont largement confondus, et la lumière d'excitation de RF est inévitablement absorbée aussi par RZ. Dans notre configuration la fluorescence de RZ passe à travers le filtre d'émission et est collectée au même titre que la fluorescence de RF, cela a pour conséquence une diminution de l'amplitude du signal utile mesuré et un signal de fond relativement important. Mais on voit qu'un filtre d'émission passé-bande (entre 590 nm et 620 nm) permettrait de filtrer la fluorescence de RZ et de ne récolter que celle de RF.

Thèse de doctorat 2017/2022
Laboratoire d'Electrochimie moléculaire
Université Paris Cité
Rabia DJOUMER