



HAL
open science

Développement de nouvelles stratégies analytiques basées sur l'électrochimiluminescence pour la détection et l'imagerie

Julie Descamps

► **To cite this version:**

Julie Descamps. Développement de nouvelles stratégies analytiques basées sur l'électrochimiluminescence pour la détection et l'imagerie. Autre. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0049 . tel-04633761

HAL Id: tel-04633761

<https://theses.hal.science/tel-04633761>

Submitted on 3 Jul 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.



THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEURE DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ CHIMIE-PHYSIQUE

Par **Julie DESCAMPS**

**DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES STRATÉGIES
ANALYTIQUES BASÉES SUR
L'ÉLECTROCHIMILUMINESCENCE POUR LA DÉTECTION
ET L'IMAGERIE**

Sous la direction du **Professeur Neso SOJIC**

Présentée et soutenue publiquement à Bordeaux le 28 mars 2024
Devant la commission d'examen composée par :

M.	COTTINEAU Thomas	CR, CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur
M.	LEMAÎTRE Frédéric	PR, École Normale Supérieure de Paris	Rapporteur
Mme	ISHOW Eléna	PR, Université de Nantes	Examineur
M.	LOGET Gabriel	CR, CNRS, Université de Bordeaux	Examineur
M.	WANTZ Guillaume	PR, Bordeaux INP	Examineur
M.	SOJIC Neso	PR, Bordeaux INP	Directeur de thèse

Abstract

Title: Development of novel analytical strategies based on electrochemiluminescence for detection and imaging

Electrochemiluminescence (ECL) is the light generation triggered by an electrochemical reaction. When applying the proper potential to an electrode, an interfacial charge transfer is induced. To this end, the electrolyte solution must contain two key ingredients; a luminophore, which acts as an emitter, and a sacrificial co-reactant. After a highly energetic chemical reaction, the luminophore reaches the excited state (high energy level) and spontaneously returns to its ground state by emitting a photon.

Such electrochemically-driven light emission is localized at the electrode surface, on the reaction layer only micrometers thick, and its intensity is proportional to the amount of electroactive species involved in the reaction. These properties make ECL emission a powerful tool that has been widely used in medical diagnosis and in immunoassay with analytical devices commercialized since the 90's. Recently, the research focuses on the use of ECL emission as a straightforward tool for localized imaging, since this process generates a local light signal at a molecular scale with a near-zero background.

In parallel, photoinduced electrochemiluminescence (PECL) is a recent concept based on the efficient coupling of ECL and photoelectrochemistry. This consists of irradiating with an excitation wavelength λ_{abs} a semiconductor (SC) that generates an emission wavelength λ_{em} from the ECL reaction. This approach allows to decrease the electric potential required to trigger the electrochemical reaction, due to the use of photogenerated minority carriers in the SC. Furthermore, it is possible to fine-tune this system by a down conversion (with $\lambda_{\text{em}} > \lambda_{\text{abs}}$) or an up-conversion (with $\lambda_{\text{em}} < \lambda_{\text{abs}}$) of the light, hence to localize the ECL reaction with the incident light.

In this context, the goals of this thesis are; at first, to develop ECL microscopy at micro and nano scale, secondly study the PECL approach to improve the stability and optimum photo-conversion of the SC material and lastly, to implement PECL on the possible imaging of electrochemical systems, by taking advantage of its better physicochemical properties.

Keywords: Electrochemiluminescence – Photochemistry – Electrochemistry – Bio-imaging – Luminescence

Résumé

Titre : Développement de nouvelles stratégies analytiques basées sur l'électrochimiluminescence pour la détection et l'imagerie

L'électrochimiluminescence (ECL) est la génération de lumière par une réaction chimique électrogénérée. Elle implique l'application d'un potentiel à une électrode pour permettre un transfert de charge avec une solution. Pour cela, cet électrolyte doit contenir une espèce luminophore qui joue le rôle d'émetteur, accompagné dans la majorité des cas d'un co-réactif sacrificiel. Après une réaction chimique hautement énergétique, le luminophore atteint un état de plus haute énergie, soit l'état excité, et retourne spontanément à son état fondamental par l'émission d'un photon.

Ce phénomène lumineux a la propriété d'être localisé à la surface de l'électrode au niveau de la couche de réaction, soit sur quelques micromètres d'épaisseur, et également d'avoir une intensité proportionnelle à la quantité de matière impliquée dans la réaction. Ces caractéristiques ont fait de l'ECL un outil développé le domaine du diagnostic médical ainsi que dans l'immuno-dosage dont des modules analytiques sont commercialisés depuis 1994. Plus récemment, les recherches se focalisent sur son application en imagerie car, en effet, l'ECL permet d'émettre un signal lumineux localisé à l'échelle moléculaire avec un bruit de fond quasiment nul.

En parallèle, l'électrochimiluminescence photoinduite (PECL) est une idée récente qui repose sur l'association de l'ECL avec la photoélectrochimie. Elle consiste à illuminer avec une longueur d'onde d'absorption λ_{abs} un semi-conducteur (SC) qui joue alors le rôle d'électrode émettrice par une autre longueur d'onde λ_{em} par réaction d'ECL. Ce système a prouvé qu'il contribue à réduire le potentiel requis pour déclencher une réaction électrochimique grâce à l'utilisation des porteurs minoritaires photogénérés dans le SC. Il offre aussi la possibilité de moduler le système par une conversion descendante (avec $\lambda_{\text{em}} > \lambda_{\text{abs}}$) ou ascendante (avec $\lambda_{\text{em}} < \lambda_{\text{abs}}$) de la lumière ainsi que de localiser la réaction ECL par la lumière incidente.

Les objectifs de cette thèse sont dans un premier temps de développer la microscopie ECL d'objets micrométriques et nanométriques, puis dans un deuxième temps, de développer la PECL pour une stabilité et une photo-conversion optimale et d'évaluer son potentiel pour la détection et l'imagerie. Enfin, ces travaux de recherches visent à concrétiser cette mise en application de la PECL et à tirer bénéfice des possibilités qu'il propose pour développer l'imagerie de phénomènes électrochimiques.

Mots clés : Électrochimiluminescence – Photochimie – Électrochimie – Bio-imagerie – Luminescence

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de thèse, le Prof. Neso Sojic. Je le remercie pour son encadrement, sa disponibilité même à l'autre bout du monde, tous ses conseils et sa grande bienveillance. Merci de m'avoir fait confiance, pour toutes les opportunités de participer à un grand nombre de conférences tout au long de ma thèse, de m'avoir intégrée à de nombreux projets et permis de progresser. Je lui souhaite de continuer à surfer sur la vague du succès de l'ECL, qu'il cultive avec sa patience, son souci du détail, sa créativité et sa persévérance dans un milieu très concurrentiel.

Je tiens ensuite à remercier le Dr. Gabriel Loget de m'avoir intégrée au projet ANR LiCORN qu'il a coordonnée avec un grand professionnalisme. Je le remercie pour son accueil à lors de ma visite à l'ISCR de Rennes, nos discussions et ses conseils. Sa carrière, son dynamisme et son approche scientifique ont été une source d'inspiration. Je remercie le reste de l'équipe de choc LiCORN, à commencer par nouvelle Docteure Yiran Zhao car tout son travail de thèse à l'ISCR a contribué à pouvoir mettre en pratique la PECL à Bordeaux, avec dynamisme, rigueur, toujours avec le sourire et la détermination d'une boss. Merci à l'équipe de FOTON de Rennes avec le Dr. Yoan Léger, Karine Tavernier et Julie Le-Pouliquen qui ont pris le temps de me montrer leurs laboratoires et de m'expliquer la partie physique de la PECL. Je remercie également le Dr. Lionel Santinacci pour les discussions scientifiques et son accueil au CiNAM à Marseille. J'ai adoré travailler avec toute l'équipe LiCORN, je suis fière d'avoir pu contribuer au projet fructueux de la PECL et de l'avoir vu évoluer vers un outil concret et très prometteur.

Ces travaux de recherche ont pu être menés au sein du groupe NanoSystèmes Analytiques (NSysA) à l'ISM de l'Université de Bordeaux. Je remercie le responsable du groupe, le Dr. Laurent Bouffier, qui a su maintenir une ambiance d'entraide et humaine au laboratoire, mais aussi mettre la barre très haute au niveaux des questions posées au cours des séminaires ! Je remercie le Prof. Alexander Khun qui m'a permis de découvrir l'environnement de l'enseignement et le bipolaire, les autres enseignants du NSysA tels que la Prof. Valérie Ravaine et Dr. Adeline Perro avec qui j'ai aimé échanger, ainsi qu'au Dr. Guillaume Longatte qui m'a aidé à progresser en électrochimie à travers l'encadrement des TPs à l'ENSMAC. Merci à Véronique Lapeyre et surtout à Patrick Garrigue qui a toujours gardé la pêche, le sourire et la patience pour les analyses MEB et la disponibilité pour le fameux traitement au HF. Je remercie le Dr. Stéphane Reculosa, grâce à lui je me sens plus à l'aise en informatique, même si je préfère le logiciel Origin au logiciel Labplot... Un remerciement spécial est attribué au Dr. Bertrand Goudeau qui m'a apporté une aide considérable en microscopie, en restant toujours disponible, très généreux, pleins de curiosité et d'ingéniosité. Merci à Olivier Filey pour son professionnalisme et sa bonne humeur, je n'oublierai pas non plus tes repas de chez Picard ramenés à la cafétéria le midi.

Through my 3 years of PhD, I had the chance to meet many students and postdocs with whom I have been able to share this great adventure of the doctoral thesis. I would like to thank Dr. Tatjana, Dr. Kostia, Ruchao, Dr. Best, Tamara, Wanmai, Dr. Serena, Yuhan, Zikawa, Yumeng, Guillaume, Lilian, Dr. Rémi and Dr. Tommaso. I also thank the help of the ECL team, including Leslie, Dr. Jing, Sara, as well as Dr. Alice and Dr. Silvia for their precious advice. I also thank Dr. Marta and Sara with whom I shared the teaching in the practical exercises. A special dedication goes to Miaoxia who is a model of determination and courage, always motivated, dynamic and smiling. I had a lot of fun with Dr.

Titapong, Benjamin, Kelly, the Persian king Dr. Mohsen, and the philosopher Youness. Then, I would thank the last three people that I spent the most amount of time with. Firstly, Magdalena for your wisdom, your mischievousness, your great generosity, and your unconditional support. Then, Léa for all the time that was shared by running sessions, by eating the sandwich from the bakery, by laughing about everything, and for her support as well in the good and bad moments. Her artistic touch brings sunshine into the laboratory. The last concerns Dr. Jerry, aka *the dude*, who used to be the godfather of my PhD and saw me growing through the years. I thank him for his patience, generosity, and all the giggles.

Je remercie les personnes extérieures au laboratoire qui ont contribué à mon projet de thèse telles que le Dr. Stéphane Arbault du CBMN de Bordeaux, le Prof. Gilles Tessier de l'Institut de la Vision de Paris ainsi que le Dr. Borja Sepúlveda de l'Institut de Microélectronique of Barcelone. Un grand merci à mon comité de suivi de thèse composé par le Dr. Olivier Buriez de l'ENS de Paris et le Dr. Frédéric Kanoufi du laboratoire ITODYS de Paris pour leur temps accordé, leur bienveillance et leurs précieux conseils qui m'ont aidé à m'orienter et à avoir un regard critique sur mes recherches.

Au-delà de la sphère de la recherche académique, je voulais remercier mes anciens collègues Olga et Olivier de PHOTONIS pour leur soutien dans mon projet hors des sentiers battus car c'est grâce à eux que j'ai osé de me lancer dans le doctorat. Une spéciale dédicace est attribuée à toute la famille de la coloc du Haut Brion avec qui j'ai passé des moments inoubliables, notamment le Dr. Malo, JC, Christophe, Pauline, Adrian, (Rouquette, Nathalie), Cyril, Léa, et spécifiquement à Alexandre pour son aide précieuse en imagerie avec le SSIM. Merci au soutien de ma famille et de mes amis, en particulier le célèbre groupe des montoises.

Pour finir, j'ai eu la chance de rencontrer au début de ma thèse celui qui m'a le plus inspiré par sa capacité à réaliser l'impossible et qui a catalysé mon évolution au cours de ces 3 années. J'aimerais donc ajouter que, derrière cette thèse, se cache un grand homme. Merci Bruno.

Table des matières

Liste des abréviations	17
Liste des symboles	19
Introduction générale	22
Chapitre I : Qu'est-ce que l'ECL ?	25
I.1. Introduction de l'ECL	26
I.2. Réaction électrochimique	26
I.2.1. De l'énergie électrique à la réaction chimique	26
I.2.2. ECL par annihilation d'ions	29
I.2.3. ECL avec un co-réactif	31
I.3. Phénomène de luminescence	32
I.3.1. Bases de photophysique	32
I.3.2. Luminophores	34
I.3.2.1. Molécule inorganique	34
I.3.2.2. Molécule organique	35
I.4. Cinétique et thermodynamique de la réaction	36
I.5. Mécanismes ECL	38
I.5.1. ECL via un mécanisme co-réactif	38
I.5.1.1. Exemple du système ECL anodique $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} / \text{TPrA}$	38
I.5.1.2. Exemple du système ECL cathodique $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} / \text{BPO}$	40
I.5.2. ECL par rupture de liaisons avec le système anodique luminol/ H_2O_2	41
I.6. Historique de l'ECL	42
Références	45
Chapitre II : ECL appliquée à l'imagerie biologique	47
II.1. Introduction	48
II.2. État de l'art	51
II.2.1. Electrochimie en bio-imagerie	51
II.2.2. Développement de l'ECL dans la bio-imagerie	53
II.2.3. Mise en place de l'ECL-	55
II.3. Étude de la sensibilité de l'ECL- appliquée à la bio-imagerie	57
II.3.1. Objectifs	57
II.3.2. Montage pour la microscopie en PL et en ECL-	58
II.3.3. Application de l'ECL- pour l'observation d'organites : les mitochondries	59

II.3.3.1.	Introduction.....	59
II.3.3.2.	Résultats et discussions.....	61
II.3.3.2.1.	Protocole expérimental.....	61
II.3.3.2.2.	Premières images de microscopie ECL- des mitochondries isolées.....	61
II.3.3.2.3.	ECL- possible <i>in vivo</i>	62
II.3.3.2.4.	Réaction ECL homogène.....	63
II.3.3.2.5.	Comparaison des méthodes ECL- et PL : sensibilité de détection	64
II.3.3.2.6.	Comparaison des méthodes ECL- et PL : distribution statistique de la taille des mitochondries	65
II.3.3.2.7.	Corrélation entre intensité ECL- et surface des mitochondries.....	66
II.3.3.2.8.	Mécanisme ECL impliqué.....	68
II.3.3.2.9.	Influence de l'épaisseur de la couche ECL sur l'imagerie	69
II.3.3.3.	Conclusion	69
II.3.4.	Microscopie sensible par ECL- de cellules et d'organites	70
II.3.4.1.	Introduction.....	70
II.3.4.2.	Résultats et discussions.....	71
II.3.4.2.1.	Préparation des cellules	71
II.3.4.2.2.	Premières images ECL- de cellules à faible concentration en luminophore.....	71
II.3.4.2.3.	Recherche de la concentration limite en luminophore.....	72
II.3.4.2.4.	Expériences de contrôle sans le luminophore	74
II.3.4.2.5.	Méthode de comparaison entre les images ECL- et PL : le SSIM.....	74
II.3.4.2.6.	Indice SSIM de l'image ECL- selon la concentration en luminophore	76
II.3.4.2.7.	Application du principe à l'observation des mitochondries.....	78
II.3.4.2.8.	Lien entre la limite de détection et le temps d'acquisition de l'image	79
II.3.4.3.	Conclusion	80
II.5.	Conclusion du chapitre	81
	Références.....	83

Chapitre III : Développement de systèmes PECL anodiques et cathodiques stables 87

III.1.	Introduction	88
III.1.1.	Concept de la PECL	88
III.1.2.	Propriétés des SC.....	89
III.1.2.1.	Bandes d'énergies.....	89
III.1.2.2.	Dopage	91
III.1.2.3.	Type de bande interdite.....	92

III.1.3.	Principe de la photoélectrochimie.....	93
III.1.3.1.	Interface SC/électrolyte	93
III.1.3.2.	Photovoltage	95
III.2.	État de l'art.....	96
III.3.	Développement de la PECL de type anti-Stokes sur du Si	100
III.3.1.	Objectifs	100
III.3.1.1.	Développement d'une photoanode modèle par ingénierie de surface.....	100
III.3.1.2.	Développement d'un système PECL cathodique original	103
III.3.2.	Montage pour la PECL.....	104
III.3.3.	Développement de la PECL cathodique avec le luminophore de référence [Ru(bpy) ₃] ²⁺	105
III.3.3.1.	Introduction.....	105
III.3.3.2.	Résultats et discussions.....	106
III.3.3.2.1.	PECL cathodique	106
III.3.3.2.2.	Stabilité du PECL cathodique	107
III.3.3.3.	Conclusion	108
III.3.4.	Développement d'une photoanode MIS modèle avec le système [Ru(bpy) ₃] ²⁺ /TPrA.....	108
III.3.4.1.	Introduction.....	108
III.3.4.2.	Préparation et caractérisation des surfaces MIS.....	109
III.3.4.3.	Études des surfaces MIS en ECL.....	110
III.3.4.3.1.	Comparaison des CVs des électrode MIS en ECL	110
III.3.4.3.2.	Étude du cas de l'électrode MIS avec le Ru	111
III.3.4.3.3.	Stabilité des électrode MIS en ECL.....	112
III.3.4.3.4.	Effet des réactifs sur l'électrode MIS avec l'Ir en ECL	113
III.3.4.4.	Études des surfaces MIS en PECL.....	114
III.3.4.4.1.	Comparaison du photovoltage sur les meilleures structures MIS	114
III.3.4.4.2.	Diagramme de bande de la jonction <i>n</i> -Si/SiO _x /M.....	116
III.3.4.4.3.	Stabilité des photoanodes en PECL.....	117
III.3.4.5.	Conclusion	118
III.3.5.	Amélioration de la stabilité de la photoanode MIS avec le système luminol/H ₂ O ₂	119
III.3.5.1.	Introduction.....	119
III.3.5.2.	Résultats et discussions.....	120
III.3.5.2.1.	Caractérisation de la surface	120
III.3.5.2.2.	Étude de l'anode <i>p</i> ⁺⁺ -Si/SiO _x /Ni en ECL	121
III.3.5.2.3.	Étude de la photoanode <i>n</i> -Si/SiO _x /Ni en PECL.....	122
III.3.5.2.4.	Efficacité de la photoconversion.....	123
III.3.5.2.5.	Détermination du photovoltage du <i>n</i> -Si/SiO _x /Ni	124

III.3.5.2.6.	Effet de la puissance d'illumination de la LED sur la PECL.....	126
III.3.5.2.7.	Stabilité de la photoanode en PECL	127
III.3.5.2.8.	Comparaison des systèmes ECL alcalin et neutre avec la photoanode.....	128
III.3.5.3.	Conclusion	129
III.4.	Conclusion du chapitre	130
	Références.....	131

Chapitre IV : Application de la PECL pour la caractérisation de photoélectrodes 135

IV.1.	Conversion localisée de la lumière en porteurs de charge.....	136
IV.1.1.	Introduction	136
IV.1.2.	Photo-adressage de la PECL.....	136
IV.1.2.1.	Montage de la PECL avec un faisceau laser	136
IV.1.2.2.	Localisation du faisceau IR par la PECL.....	137
IV.1.3.	Déplacement des charges minoritaires dans la photoanode.....	138
IV.1.3.1.	Calcul théorique de la largeur de la tache PECL.....	138
IV.1.3.2.	Diffusion des h^+ dans le SC n -Si/SiO ₂ /Ir.....	138
IV.1.4.	Conclusion.....	139
IV.2.	Localisation du transfert de charge du SC vers l'électrolyte.....	139
IV.2.1.	Introduction	139
IV.2.2.	Observation de la PECL localisée sur le motif d'Ir	140
IV.2.2.1.	Montage de la microscopie PECL.....	140
IV.2.2.2.	Fabrication des électrodes avec un motif d'Ir	141
IV.2.2.3.	PECL localisé sur le motif d'Ir.....	142
IV.2.2.4.	Comparaison entre l'imagerie par PECL et par MEB.....	144
IV.2.2.5.	Expériences de contrôle	144
IV.2.3.	Photoélectrochimie de l'électrode hétérogène.....	145
IV.2.3.1.	Photovoltage.....	145
IV.2.3.2.	Stabilité de la PECL.....	146
IV.2.4.	Conclusion.....	148
IV.3.	Conclusion du chapitre	149
	Références.....	151

Chapitre V : Développement et application de la PECL pour la bioanalyse et la bio-imagerie 153

V.1.	La PECL tout optique : l'AO-ECL.....	154
V.1.1.	Introduction	154

V.1.2.	Électrode monolithique	155
V.1.2.1.	Conception de l'électrode	155
V.1.2.2.	Une face anodique en nanopiliers de Si/Au	157
V.1.2.3.	Une face cathodique en Pt	159
V.1.3.	Études photoélectrochimiques de l'électrode	160
V.1.3.1.	Configuration à trois électrodes	160
V.1.3.2.	Configuration à deux électrodes	163
V.1.3.3.	Expérience contrôle en configuration à deux électrodes.....	164
V.1.4.	Observation de l'AO-ECL monolithique	165
V.1.4.1.	Capture d'images avec un téléphone portable.....	165
V.1.4.2.	Microscopie AO-ECL	167
V.1.4.3.	Expériences de contrôle de la microscopie monolithique AO-ECL	169
V.1.5.	Conclusion sur l'AO-ECL	169
V.2.	La PECL appliquée à la bio-imagerie.....	170
V.2.1.	Introduction	170
V.2.2.	Compatibilité de la PECL avec la microscopie de cellules uniques	172
V.2.2.1.	Étude de la photoélectrochimie.....	172
V.2.2.2.	Préparation de l'électrode et montage PECL.....	173
V.2.3.	Bio-imagerie en PECL+	173
V.2.3.1.	Préparation des cellules	173
V.2.3.2.	Microscopie PECL+	174
V.2.3.3.	Expériences de contrôle	176
V.2.4.	Bio-imagerie en PECL-.....	176
V.2.4.1.	Préparation des cellules	176
V.2.4.2.	Microscopie PECL-	177
V.2.4.3.	Expériences de contrôle	179
V.2.5.	Comparaison avec la microscopie ECL.....	180
V.2.6.	Conclusion sur la bio-imagerie PECL.....	181
V.3.	Conclusion du chapitre	182
	Références.....	183

Section expérimentale..... 185

1.	Chapitre II : ECL appliquée à l'imagerie biologique.....	186
1.1.	Réactifs	186
1.2.	Appareillage	186
1.3.	Application de l'ECL- pour l'observation des mitochondries	187

1.3.1.	Préparation des mitochondries et test de leur activité respiratoire	187
1.3.2.	Déposition des mitochondries à la surface de l'électrode en GC.....	187
1.3.3.	Imagerie des mitochondries par microscopie	187
1.3.3.1.	PL.....	187
1.3.3.2.	ECL.....	188
1.4.	Microscopie sensible par ECL- de cellules CHO-K1.....	188
1.4.1.	Préparation des cellules sur l'électrode en GC.....	188
1.4.2.	Imagerie des cellules CHO-K1 par microscopie	189
1.4.2.1.	PL.....	189
1.4.2.2.	ECL.....	189
1.4.2.3.	Calculs SSIM	189
2.	Chapitre III : Développement de systèmes PECL anodiques et cathodiques stables.....	190
2.1.	Réactifs	190
2.2.	Préparation des surfaces	190
2.3.	Fabrication des électrodes.....	190
2.3.1.	Photocathode p -Si et cathode n^+ -Si	190
2.3.2.	Photoanode n -Si/SiO _x /M et anode p^{++} -Si/SiO _x /M (M = Pt, Ir et Ru)	191
2.3.3.	Photoanode n -Si/SiO _x /Ni et anode p^{++} -Si/SiO _x /Ni	192
2.4.	Expériences électrochimiques.....	192
2.4.1.	Cellule électrochimique	192
2.4.2.	Montage PECL	193
2.4.3.	Photocathode p -Si et cathode n^+ -Si avec le système ECL [Ru(bpy) ₃] ²⁺ /BPO	194
2.4.4.	Photoanode n -Si/SiO _x /M et anode p^{++} -Si/SiO _x /M (M = Pt, Ir et Ru) avec le système ECL [Ru(bpy) ₃] ²⁺ /TPrA	194
2.4.5.	Photoanode n -Si/SiO _x /Ni et anode p^{++} -Si/SiO _x /Ni avec le système ECL luminol/H ₂ O ₂	194
3.	Chapitre IV : Application de la PECL pour la caractérisation de photoélectrodes	195
3.1.	Réactifs	195
3.2.	Préparation des surfaces	195
3.3.	Photolithographie du motif d'Ir	195
3.4.	Caractérisation des surfaces	196
3.5.	Fabrication des électrodes.....	196
3.6.	Expériences photoélectrochimiques	196
3.7.	Imagerie de la PECL localisé par un laser	196
3.8.	Microscopie de la PECL localisé sur le motif d'Ir	197
4.	Chapitre V : Développement et application de la PECL pour la bioanalyse et la bio-imagerie	198
4.1.	ECL tout optique (AO-ECL)	198

4.1.1.	Réactifs.....	198
4.1.2.	Fabrication de la jonction Au/ <i>pnn</i> ⁺⁺ -Si/Pt	198
4.1.3.	Mesures photoélectrochimiques.....	199
4.1.3.1.	Montage et mesures à trois électrodes	199
4.1.3.2.	Montage et mesures à deux électrodes	200
4.1.4.	Images macroscopiques de l'AO-ECL.....	201
4.1.5.	Images microscopiques de l'AO-ECL.....	202
4.1.6.	Caractérisation des matériaux	202
4.1.7.	Simulation optique	202
4.2.	Imagerie des cellules par PECL.....	203
4.2.1.	Réactifs.....	203
4.2.2.	Préparation des surfaces.....	203
4.2.3.	Préparation des cellules.....	203
4.2.3.1.	Culture cellulaire	203
4.2.3.2.	Marquage à la SA@Ru pour la PECL+	204
4.2.3.3.	Marquage à la calcéine AM pour la PECL-	204
4.2.4.	Imagerie par PECL.....	204
4.2.5.	Expériences d'électrochimie et de microscopie.....	204
4.2.6.	Imagerie	205
4.2.6.1.	PECL+	205
4.2.6.2.	PECL-.....	206
	Références.....	207
	Conclusion et perspectives	209

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ACN	Acétonitrile
AFM	Atomic Force Microscope (microscopie à force atomique)
AO-ECL	All Optical ElectroChemiLuminescence (électrochimiluminescence tout optique)
ATP	Adénosine Triphosphate
BPO	Peroxyde de Benzoyle
CA	Chronoampérométrie
CB	Conduction Band (bande de conduction)
CCD	Charge Coupled Device (dispositif à couplage de charge)
CE	Counter Electrode (contre-électrode)
CHO	mammalian Chinese Hamster Ovary cells (cellules ovariennes de hamster chinois)
CL	Chimiluminescence
CP	Chronopotentiométrie
CV	Cyclic Voltammetry (voltammétrie cyclique)
DM	Dichroic Mirror (miroir dichroïque)
DMF	Diméthylformamide
ECL	ÉlectroChimiLuminescence
ECL+	ECL positif (ou direct)
ECL-	ECL négatif (ou indirect)
EL	Électroluminescence
EMCCD	Caméra à couplage de charge à multiplicateur d'électrons
fps	Frame per second (image par seconde)
FWHM	Full Width at Half Maximum (largeur à mi-hauteur)
GC	Glassy Carbon (carbone vitreux)
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (orbitale la plus haute occupée)
IPCE	Incident-Photon-to-electron Conversion Efficiency (spectre d'efficacité photon-courant incident)
IR	Infra-Rouge
ITO	Indium Tin Oxyde (oxyde d'indium-étain)
L-012	8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]-pyridazine-1,4(2H, 3H)-dione]
LED	Light-Emitting Diode (diode électroluminescente)
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (orbitale la plus basse vacante)
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (nicotinamide adénine dinucléotide) en forme réduite
NPs	Nanoparticules
OCP	Open Circuit Potential (potentiel de circuit ouvert)
OER	Oxygen Evolution Reaction (réaction d'oxydation de l'oxygène)
PBS	Phosphate Buffer Solution (tampon phosphate salin)
PECL	Photoinduced ElectroChemiLuminescence (électrochimiluminescence photo-induite)
PECL+	PECL positif (ou direct)
PECL-	PECL négatif (ou indirect)

PL	Photoluminescence
PMT	Photomultiplier tube (tube photomultiplicateur)
QCM	Microbalance à Cristaux de Quartz (quartz crystal microbalance)
REF	Reference Electrode (électrode de référence)
RIE	Reactive-Ion Etching (gravure ionique réactive)
RMS	Roughness Mean Square (rugosité quadratique moyenne)
ROI	Region of Interest (région d'intérêt)
SA@Ru	[Ru(bpy) ₃] ²⁺ modifié avec de la streptavidine
SC	Semi-Conducteur
sccm	Standard cubic centimeters per minute (centimètres cube standard par minute)
SCE	Saturated Calomel Electrode (électrode au calomel saturée)
SECM	Scanning Electrochemistry Microscopy (microscopie électrochimique à balayage)
SICM	Scanning Ion-Conductance Microscopy (microscopie à conductance ionique)
SNR	Signal to Noise Ratio (signal sur bruit)
SSIM	Structural Similarity Index Metrics (système de mesure de la similarité structurelle)
TBAPF ₆	Hexafluorophosphate de tétrabutylammonium
TPrA	Tripropylamine
u.a.	Unité arbitraire
UV	Ultra-Violet
VB	Valence Band (bande de valence)
WE	Working Electrode (électrode de travail)
XPS	X-ray Photoelectron Spectrometry (spectrométrie photoélectronique à rayons X)

Liste des symboles

Symbole	Signification	Unité usuelle
a_{ox}	Activité chimique de l'espèce redox sous forme oxydée	
a_{red}	Activité chimique de l'espèce redox sous forme réduite	
c	Célérité	$m\ s^{-1}$
D_p	Diffusion des h^+	$cm^2\ s^{-1}$
E°	Potentiel standard du couple redox	V
E°_{ox}	Potentiel standard d'oxydation	V
E°_{red}	Potentiel standard de réduction	V
E_A	Énergie d'activation	J
E_{abs}	Énergie d'absorption	J
E_{em}	Énergie d'émission	J
E_C	Énergie minimum de la CB	eV
E_F	Niveau de Fermi	eV
$E_{F,M}$	Niveau de Fermi du métal	eV
$E_{F,n}$	Niveau quasi-Fermi des e^-	eV
$E_{F,p}$	Niveau quasi-Fermi des h^+	eV
$E_{F,S}$	Niveau de Fermi du semi-conducteur	eV
E_g	Gap energy (énergie de la bande interdite)	eV
E_P	Pic de potentiel	V
E_V	Énergie maximum de la VB	eV
E_{vide}	Énergie du vide	eV
F	Constante de Faraday	$C\ mol^{-1}$
h	Constante de Planck	$J\ s^{-1}$
$h\nu$	Énergie lumineuse	J
i	Courant	mA
j	Densité de courant	$mA\ cm^{-2}$
j_{max}	Densité de courant maximale	$mA\ cm^{-2}$
k_B	Constante de Boltzmann	$J\ K^{-1}$
L_p	Longueur de diffusion des charges	μm
n	Nombre de charges	
N_A	Concentration d'atomes accepteurs d' e^-	cm^{-3}
N_C	Densité d'états électroniques de la CB	
N_D	Concentration d'atomes donneurs d' e^-	cm^{-3}
N_V	Densité d'états électroniques de la VB	
ON	Ouverture Numérique	
P_{LED}	Puissance d'illumination de la LED	$mW\ cm^{-2}$
q	Charge élémentaire	C
S_0	État singulet fondamental	eV

S_1	État singulet excité de niveau 1	eV
T	Température	K
T_1	État triplet excité de niveau 1	eV
t_{expo}	Temps d'exposition	s
v	Vitesse de balayage	$V \text{ cm}^{-2}$
V_{OC}	Open-circuit voltage (photovoltage)	eV
WD	Distance de travail de l'objectif	mm
W_M	Fonction de travail du métal	eV
W_S	Fonction de travail du SC	eV
ΔG°	Énergie de Gibbs	J
ΔH	Enthalpie	J
ΔS	Entropie	$J \text{ K}^{-1}$
λ	Longueur d'onde	nm
λ_{abs}	Longueur d'onde d'absorption	nm
λ_{DM}	Longueur d'onde du miroir dichroïque	nm
λ_{ECL}	Longueur d'onde d'émission par ECL	nm
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission	nm
λ_{LED}	Longueur d'onde émise par la LED	nm
λ_{PECL}	Longueur d'onde d'émission par PECL	nm
λ_{PL}	Longueur d'onde d'émission par PL	nm
λ_r	Énergie de réorganisation	J
μ_p	Mobilité des h^+	$\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
ν	Fréquence	Hz
ν_{abs}	Fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon absorbé	Hz
ν_{em}	Fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon émis	Hz
ν_{fluo}	Fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon émis par fluorescence	Hz
ν_{phos}	Fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon émis par phosphorescence	Hz
ρ	Résistivité	$\Omega \text{ cm}$
τ_p	Temps de demi-vie des h^+	s
Φ_b	Hauteur de la barrière de Schottky	eV
$\chi_{\text{molécule}}$	Affinité électronique de la molécule	eV
χ_s	Affinité électronique du SC	eV

Introduction générale

Introduction générale

L'électrochimie est la science d'étude des processus de conversion d'énergie entre la chimie et l'électricité. Il s'agit de la transformation d'une énergie électrique en réaction chimique, ou à l'inverse une réaction chimique en signal électrique. Ces phénomènes s'observent en milieu hétérogène comprenant un milieu conducteur ionique appelé électrolyte, sous forme liquide ou solide, et deux électrodes conductrices dont les charges sont transférées à leurs interfaces avec l'électrolyte. L'électrochimie existe depuis plus de 200 ans. L. Galvani découvrit en 1791 un lien entre l'électricité et les processus chimiques et biologiques en observant la contraction d'un muscle lorsqu'il est placé au contact de métaux. Neuf ans plus tard, l'électrochimie fit un autre pas de géant avec les travaux de A. Volta sur la pile électrique.

En 1964, D. M. Hercules décrit l'utilisation de l'électrochimie pour convertir l'électricité en énergie lumineuse à travers une réaction chimique : l'électrochimiluminescence (ECL). L'ECL est un phénomène d'émission de lumière se produisant dans l'électrolyte à la surface d'une électrode entre des réactifs générés par réaction électrochimique. Il décrit en général une réaction très exergonique entre une molécule luminophore et un co-réactif. Après la réaction, le luminophore est porté à un état excité et retourne à son état fondamental en émettant un photon, donc de la lumière. L'ECL est aujourd'hui un puissant outil analytique : il est simple à mettre en place, polyvalent, a un bon contrôle spatial et temporel et une absence de signal de bruit. L'ECL est aujourd'hui retrouvée dans des tests cliniques tels que l'analyse d'ADN et dans des tests immunologiques commercialisés pour les maladies infectieuses, cardiaques, thyroïdiennes, pour les marqueurs tumoraux ou la maladie d'Alzheimer.^[1] L'ECL pouvant être biocompatible et étant un outil analytique sensible, la recherche se tourne également vers des applications en microscopie et imagerie d'entités biologiques.

Le phénomène qui peut être considéré comme l'inverse de l'ECL est la photoélectrochimie, découverte par H. Becquerel en 1839. Dans ce cas, la lumière est convertie en électricité par une électrode semi-conductrice et génère une réaction chimique. Après absorption de la lumière par le semi-conducteur (SC) dopé négativement (avec un excès d'électrons) ou positivement (avec un excès de trous), les charges minoritaires (trous ou électrons, respectivement) sont photogénérées à l'interface entre l'électrode et l'électrolyte. Ces charges permettent ainsi de déclencher les réactions électrochimiques dans l'électrolyte. La lumière étant une source d'énergie renouvelable et abondante, la photoélectrochimie est activement exploitée dans le domaine de l'énergie durable comme pour l'électrolyse de l'eau, la photosynthèse artificielle, ou bien encore la réduction du CO₂.

L'objectif de cette thèse est de combiner l'ECL à la photoélectrochimie pour finalement convertir de la lumière ... en lumière. Plus exactement, l'électrode semiconductrice absorbe la lumière incidente et permet de produire de l'ECL via des charges photogénérées. Ce nouveau domaine de recherche est alors appelé l'électrochimiluminescence photoinduite (PECL). Ce concept n'a pas encore été exploité car seulement deux études furent publiées par le groupe de A. J. Bard dans les années 1970.^[2,3] L'idée de la PECL fût récemment reprise en 2019 avec la publication de trois articles prometteurs sur le potentiel de la PECL dans la détection et l'imagerie.^[4-6] La thèse présentée ici est réalisée dans le cadre du projet ANR LiCORN (Light CONveRsioN) coordonné par G. Loget et en étroite collaboration avec quatre laboratoires CNRS : le Centre Interdisciplinaire de Nanoscience à l'Université de Marseille (CiNAM), l'institut Fonctions Optiques pour les Technologies de l'informatiON (FOTON) et

l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR) à l'Université de Rennes 1 et l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM) à l'Université de Bordeaux. Les objectifs de ce projet sont d'abord la mise en place d'un système PECL modèle robuste, le développement d'autres systèmes PECL pour prouver son adaptabilité, et enfin l'application de la PECL en imagerie.

Les travaux de ce doctorat sont effectués à l'ISM et portent plus généralement sur le développement de nouvelles stratégies analytiques basées sur l'ECL et la PECL. Cette thèse aborde également la microscopie ECL d'entités biologiques telles que les cellules uniques et les mitochondries. Elle se tourne aussi vers le développement de la PECL avec différents couples ECL sur des électrodes en SC optimisées pour une meilleure stabilité. Enfin, cette stabilisation permet d'appliquer la PECL à la microscopie pour la caractérisation des matériaux et pour la bio-imagerie. Les travaux de thèses se divisent dans ce manuscrit en cinq chapitres, suivis d'une section expérimentale et d'une conclusion générale.

Le premier chapitre explique en détails le principe de l'ECL avec les mécanismes électrochimiques et photophysiques impliqués. Il est aussi l'occasion d'introduire les principaux systèmes ECL constitués d'un luminophore et d'un co-réactif, qui sont utilisés dans les chapitres suivants : le système du complexe de tris(2,2'-bipyridine) ruthénium(II) avec la tri-*n*-propylamine ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$) avec une émission dans le rouge et le système du luminol avec le peroxyde d'hydrogène (luminol/ H_2O_2) qui émet dans le bleu. L'histoire de l'ECL sera brièvement décrite en fin de chapitre.

Le deuxième chapitre repose sur l'application de l'ECL à la microscopie. Il montre dans un premier temps les enjeux de l'ECL appliquée au domaine de la microscopie et de l'imagerie. Il présente ensuite les travaux sur l'imagerie sans marquage par ECL négatif de mitochondries et de cellules sur un microscope optique à épi-fluorescence. Cette méthode repose sur le système ECL ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$) qui est biocompatible en milieu aqueux et à pH neutre.

Le troisième chapitre introduit l'étude de l'ECL photo-induite (PECL) avec son principe et son état de l'art. Il explique ensuite les recherches sur l'amélioration de la stabilité de la photoanode en milieu aqueux par l'utilisation de structure Métal-Isolant-SC (MIS) pour ainsi ouvrir la voie à l'application de la PECL en imagerie. Le développement de la PECL photo-cathodique en milieu organique est aussi présenté.

Le quatrième chapitre est axé sur la PECL qui peut être un outil de caractérisation de matériaux SC pour la photoélectrochimie. L'absorption de la lumière incidente est mise en évidence par PECL avec l'utilisation d'un faisceau laser et le transfert de charge à l'interface entre l'électrode et l'électrolyte qui a pu être localisé au niveau d'une surface hétérogène.

Enfin, un cinquième et dernier chapitre présente les travaux sur le développement de la bio-imagerie en PECL et la possibilité d'atteindre une imagerie ECL tout optique, c'est à dire sans potentiostat ni connectique, ce qui est rare en électrochimie.

Chapitre I : Qu'est-ce que l'ECL ?

I. Qu'est-ce que l'ECL ?

I.1. Introduction de l'ECL

L'électrochimiluminescence (ECL), ou la chimiluminescence électrogénérée, est la génération d'une lumière par excitation chimique d'espèces oxydées ou réduites *in situ* par un transfert d'électron à la surface d'une électrode. C'est un phénomène de luminescence qui, par définition, est une lumière froide générée sans source de chaleur, contrairement à l'incandescence.

L'ECL ne doit pas être confondue avec l'électroluminescence (EL) qui est localisée sur l'électrode sous l'effet d'un courant électrique ou d'un champ électrique fort. L'émission par EL résulte de la recombinaison radiative d'électrons et de trous dans un matériau qui est souvent un semi-conducteur.^[7] On la retrouve par exemple dans le rétroéclairage pour les affichages à cristaux liquides sur les montres, les thermostats, les veilleuses, ou bien sur le tableau de bord des voitures.

L'ECL diffère aussi de la chimiluminescence (CL) dont la lumière est produite au sein de la solution par réaction chimique uniquement. La CL n'est pas contrôlée par le potentiel d'une électrode comme l'ECL, mais initiée par le mélange de réactifs qui génère l'état excité du luminophore. La CL est utilisée en analytique avec la détection des traces de sang ou d'explosifs et se retrouve aussi dans les bâtons lumineux décoratifs (bracelets, cerceaux, etc.).^[8,9]

Enfin, l'ECL peut être comparée à la photoluminescence (PL) où, dans ce cas, le luminophore est excité par la lumière (*i.e.* la photoexcitation).^[10] La PL regroupe les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence qui peuvent se différencier par leurs durées d'émission et surtout pas la nature de l'état excité et qui sont très utilisés en bio-imagerie.

Ainsi, la lumière produite par ECL peut se distinguer des autres phénomènes de luminescence par sa localisation à la surface d'une électrode contrôlée par un potentiostat, le tout sans nécessiter d'excitation lumineuse.

I.2. Réaction électrochimique

I.2.1. De l'énergie électrique à la réaction chimique

L'émission lumineuse de l'ECL est initiée par une réaction électrochimique, autrement dit par le transfert hétérogène d'un électron entre la surface d'une électrode (milieu solide) et les espèces redox contenues dans l'électrolyte (milieu liquide). Ici, le processus correspond à la transformation de l'énergie électrique en réaction chimique. L'énergie (où la probabilité d'occupation par un électron est de $\frac{1}{2}$) de l'électrode est appelée le niveau de Fermi E_F et celle du couple redox est définie par les orbitales moléculaires frontières avec l'état électronique occupé HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et l'état électronique vacant LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital).

La réaction électrochimique est déclenchée lorsqu'on impose par un potentiostat une surtension au niveau de l'électrode. Si le potentiel est plus négatif, l'énergie de l'électron du matériau

de l'électrode augmente et un électron peut être transféré à la LUMO : c'est la réduction de l'espèce chimique A en A⁻. À l'inverse, si le potentiel est plus positif, cette énergie diminue et l'électron peut être transféré de la HOMO de la molécule vers l'électrode : c'est l'oxydation de A en A⁺ (voir **Figure 1.1** ci-dessous).^[11]

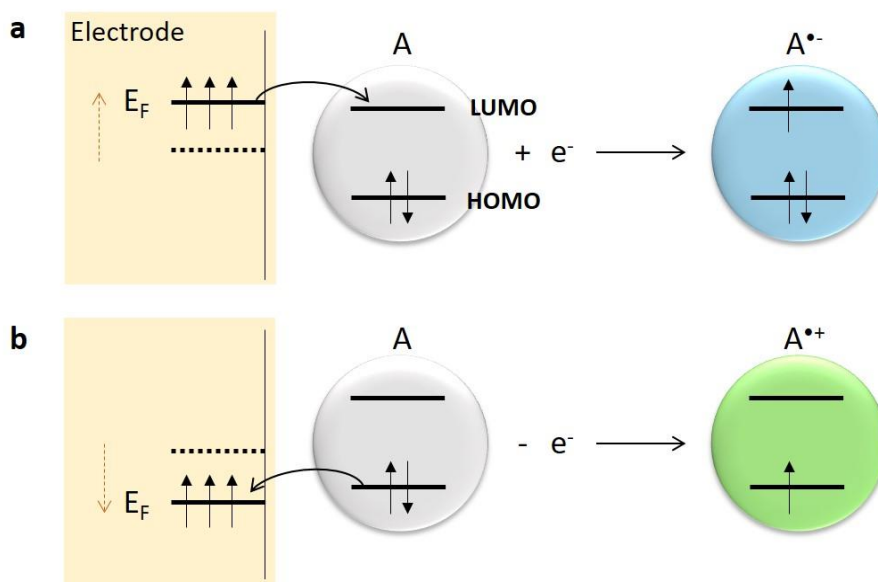


Figure 1.1 : Représentation schématique des orbitales moléculaires d'une molécule A lors de a) la réduction et b) l'oxydation impliquant la LUMO et HOMO respectivement. ^[11]

Le potentiel auquel a lieu une ½ équation redox (impliquant un couple redox (red/ox) tel que A⁻/A ou A/A⁺ est typiquement représenté par les courbes intensité-potentiel. Ces dernières visent à mesurer le courant i (en A) à une électrode de travail dont on fait varier le potentiel électrique E (en V). Un exemple théorique en est l'équation de Butler-Volmer alliant la cinétique et la thermodynamique de la réaction redox :

$$i = i_0 \left(e^{\left(\frac{-\alpha \times nF(E-E_{eq})}{RT} \right)} - e^{\left(\frac{(1-\alpha) \times nF(E-E_{eq})}{RT} \right)} \right) \quad (1.1)$$

Avec i le courant, i_0 le courant d'échange constant entre les espèces redox à l'équilibre, T la température, F la constante de Faraday, n le nombre de charges échangées par réaction redox, α la symétrie de la réaction (le coefficient de transfert de charge), E_{eq} le potentiel standard mesuré sur l'électrode à l'équilibre et E le potentiel appliqué.

La relation entre le potentiel d'équilibre et la concentration en espèces redox est définie par la loi fondamentale et thermodynamique établie par W. Nernst telle que :

$$E = E^\circ - \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \left(\frac{a_{red}}{a_{ox}} \right) \quad (1.2)$$

Avec a_{red} et a_{ox} qui désignent l'activité chimique de l'espèce sous forme réduite et oxydée respectivement, c'est-à-dire la concentration au sens strict en tenant compte de la présence des autres espèces en solution et de leurs interactions électrostatiques, et le potentiel électrochimique E° qui est la constante thermodynamique d'un couple redox donné. Avec F étant constant et égal à

96484 C mol⁻¹, l'équation peut être simplifiée en tenant compte de la concentration des espèces réduites et oxydées mesurable par analyse chimique :

$$E = E^\circ - \left(\frac{0,05915}{n}\right) \log\left(\frac{[red]}{[ox]}\right) \quad (1.3)$$

Une mesure importante des courbes i-E est la voltammétrie cyclique (CV). Lors d'une mesure en CV, le potentiel est progressivement balayé à partir du potentiel d'équilibre jusqu'au potentiel correspondant à l'oxydation ou à la réduction de l'espèce, c'est-à-dire lorsqu'un courant, donc un transfert d'e⁻, apparaît. Une fois les espèces électrogénérées, un balayage retour est appliqué pour retourner à l'état d'équilibre : c'est la voltammétrie cyclique (CV, voir **Figure 1.2**). Cette méthode analytique permet entre autres d'étudier la réactivité des espèces électrogénérées, la thermodynamique, la cinétique ainsi que la stabilité des espèces générées et sera fondamentale dans ce manuscrit de thèse pour étudier les mécanismes impliqués pour générer l'ECL.

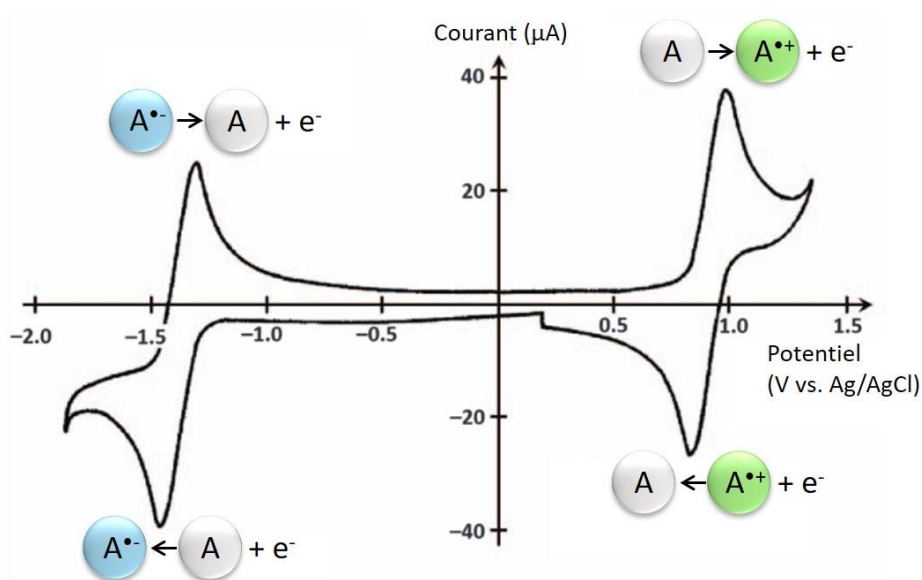


Figure 1.2 : Voltammétrie cyclique des couples redox $A/A^{\bullet-}$ ou $A^{\bullet+}/A$ réversibles.^[11]

Le principe de l'ECL repose sur l'excitation d'un luminophore (A^*) après réaction électrochimique. Pour cela, il faut impliquer ce luminophore dans une réaction très exergonique (typiquement, entre 2 et 3 eV). Pour deux couples redox, un donneur d'électron ($D^{\bullet+}/D$) et un accepteur d'électron ($A/A^{\bullet-}$) :



L'enthalpie libre standard ΔG_r° (en eV) de la réaction de transfert d'électron (**Équation 1.7**) entre les deux espèces redox, générées par réduction (**Équation 1.5**) et oxydation (**Équation 1.4**) à l'électrode, est donnée par la différence de leurs potentiels standard E° (en V), tel que :

$$\Delta G_r^\circ = E_{(D^{\bullet+}/D)}^\circ - E_{(A/A^{\bullet-})}^\circ \quad (1.7)$$

Cette énergie de Gibbs ΔG° s'exprime aussi avec l'enthalpie standard de la réaction ΔH° (en eV), la température T (en K) et l'entropie ΔS° (en eV K⁻¹) avec :

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S \quad (1.8)$$

Pour pouvoir observer une réaction très exergonique, c'est-à-dire avec un ΔG° très négatif, il existe deux principales méthodes. La première et la plus ancienne est l'annihilation d'ions radicalaires, et la seconde l'introduction d'un co-réactif sacrificiel.

1.2.2. ECL par annihilation d'ions

L'annihilation d'ions radicalaires fût la première méthode pour obtenir l'état excité de l'émetteur. Pour cela, prenons un luminophore accepteur d'électron (A), et une molécule donneuse d'électron (D) (avec $D = A$, ou bien $D \neq A$ dans un système « mixte ») :



Ou bien,



Après que ce donneur soit électrochimiquement oxydé (**Équation 1.4**), et que l'accepteur soit de la même manière réduit (**Équation 1.5**), le cation radical ($D^{\bullet+}$) et l'anion radical ($A^{\bullet-}$) réagissent par réaction d'annihilation pour former l'état excité singulet de l'émetteur ${}^1A^*$ (**Équation 1.9**) par la « route S », en supposant que l'état excité de A est d'un niveau d'énergie inférieur à celui de D. Cette étape d'annihilation peut également former l'état triplet ${}^3A^*$ (**Équation 1.10**) par la « route T », et qui après recombinaison triplet-triplet, aboutit à l'état singulet ${}^1A^*$ (**Équation 1.11**).

L'obtention de l'état excité singulet ${}^1A^*$ ou de l'état excité triplet ${}^3A^*$ (dont les caractéristiques seront expliquées par la suite dans la partie 1.3.1) est gouvernée par l'enthalpie de la réaction $-\Delta H_{ann}$ pour l'annihilation des ions (**Équations 1.9** et **1.10** respectivement) selon le pic de potentiel pour E_p (en eV pour 1 e⁻, donc en V) de l'oxydation ou réduction électrochimique et la contribution entropique $T\Delta S$ (en eV) :

$$-\Delta H_{ann} = E_{p(D^{\bullet+}/D)} - E_{p(A/A^{\bullet-})} - T\Delta S \quad (1.12)$$

En effet, le produit peut être à l'état excité singulet (**Équation 1.9**) si l'énergie de réaction (**Équation 1.12**) est plus grande ou égale à l'énergie nécessaire pour produire l'état excité le plus bas (S_1) à partir de l'état fondamental (S_0) illustré dans la **Figure 1.3**. C'est un système caractérisé par une énergie suffisante pour peupler directement l'état excité d'où la dénomination « route S » pour suffisante. Cependant, si l'énergie est plus faible que l'état E_s mais plus grande que l'énergie de l'état triplet, l'état triplet peut être généré (**Équation 1.10**). C'est le système d'énergie insuffisante correspondant à la route T.^[12,13] Ensuite, l'annihilation triplet-triplet peut générer l'état excité. Si l'exothermicité de la réaction est d'énergie plus faible que l'état triplet, il y a un transfert direct d' e^- de $A^{\bullet-}$ vers $D^{\bullet+}$ sans excitation : c'est la route E.

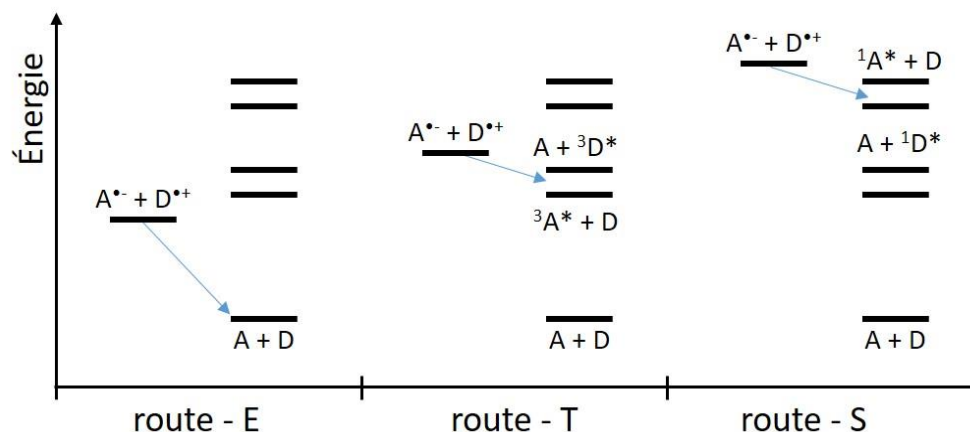


Figure 1.3 : Représentation schématique du transfert d'électron des espèces radicales $A^{\bullet-}$ et $D^{\bullet+}$ en terme de niveau d'énergie.^[7]

Enfin, la dernière étape de la réaction ECL correspond à la désexcitation du luminophore par l'émission d'un photon d'énergie $h\nu_{em}$, où h est la constante de Planck et ν est la fréquence du photon, donc l'émission de la lumière :



La réaction d'ECL par annihilation d'ions présente l'avantage d'être simple car elle nécessite peu de matériel. Cependant, l'espèce à oxyder et celle à réduire doivent être générées dans la même couche proche de la surface de l'électrode et être relativement stables pour coexister. Il est donc nécessaire d'appliquer alternativement un potentiel anodique et cathodique à la même électrode de travail. De plus, l'écart de potentiel nécessaire entre l'espèce oxydée et l'espèce pour générer l'ECL (ΔG_{ECL}° est de l'ordre de 2 à 3 eV, donc de 2 à 3 V avec l'échange d'un électron par réaction^[7]) est trop grand par rapport à la fenêtre de potentiel de l'eau (qui est de 1,23 V) et est donc limitée à l'utilisation de solvants organiques.^[14] Toutefois, l'introduction d'un co-réactif dans le mécanisme permet de générer l'ECL en milieu aqueux.

I.2.3. ECL avec un co-réactif

Contrairement à l'ECL par annihilation, l'utilisation d'un co-réactif sacrificiel permet de déclencher les mécanismes ECL en imposant un seul potentiel anodique ou cathodique. Le luminophore et le co-réactif sont dans un premier temps oxydés (ou réduits). L'étape clé est ensuite la décomposition spontanée du co-réactif qui forme une espèce fortement réductrice (ou fortement oxydante). Celle-ci réagit par la suite avec le luminophore oxydé (ou réduit) avec un ΔG_r° assez exergonique pour produire son état excité. Ainsi, le rôle du co-réactif est de fournir un radical assez énergétique pour réagir avec le luminophore et générer son état excité par mécanisme d'« oxydation-réductrice » quand le réactif est d'abord oxydé à l'électrode, ou par « réduction-oxydante » lorsqu'il est réduit à l'électrode. Ce co-réactif est sacrificiel car sa décomposition est irréversible, alors que le luminophore est régénéré et disponible pour un nouveau cycle.^[15]

Les co-réactifs utilisés sont souvent des amines telles que la tripropylamine (TPrA), la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), le 2-(dibutylamino)éthanol (DBAE) et ils sont associés avec le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en tant que luminophore. Ces amines sont impliquées en oxydation dans des solutions aqueuses pour des applications bioanalytiques.^[16] Les co-réactifs peuvent aussi être sous forme d'oxalates ou des peroxydes comme le peroxydisulfate ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) et le peroxyde de benzoyle (BPO) en réduction.^[17,18] Il est important de noter que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne joue pas exactement le même rôle qu'un co-réactif car il induit la forme intermédiaire du luminophore (luminol). Les mécanismes impliquant un co-réactif sont détaillés dans la partie I.5.

Le système luminophore/co-réactif apporte un signal ECL plus intense, permet une application en solution aqueuse et simplifie son utilisation. De plus, malgré la complexité du mécanisme, l'intensité ECL reste proportionnelle à la quantité en luminophore et en co-réactif, par exemple sur les graphiques de la **Figure 1.4** avec la TPrA en co-réactif et $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ qui joue le rôle d'émetteur (jusqu'à une concentration limite). C'est pourquoi les instruments analytiques ECL disponibles dans le commerce sont basés sur ce système.^[12,19]

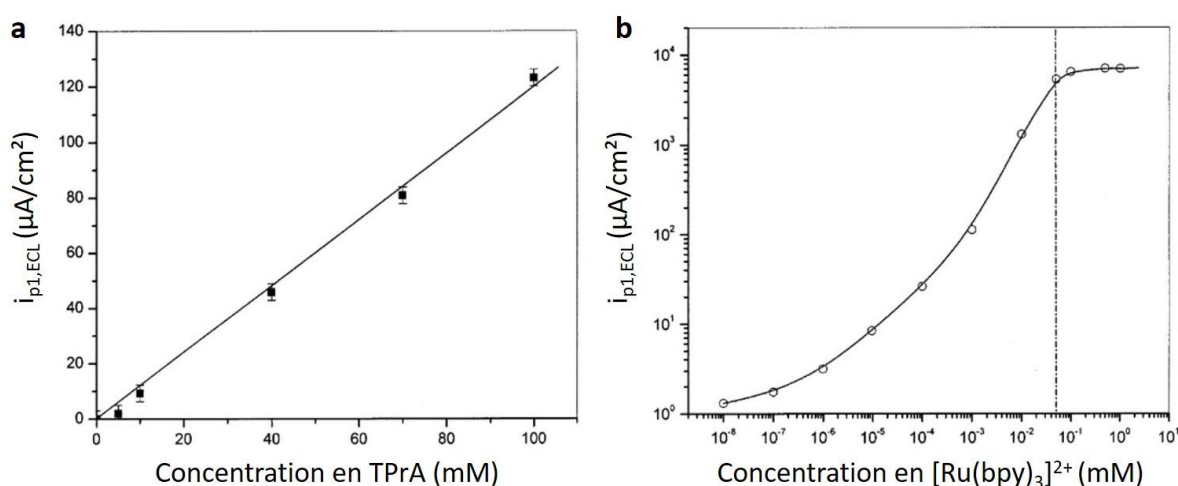


Figure 1.4 : a) Intensité du premier pic ECL selon la concentration en TPrA avec $1 \mu\text{M} [\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (0.20 M PBS, pH 7.5). b) Intensité du premier pic ECL selon la concentration en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ avec 100 mM TPrA (0.20 M PBS, pH 8.5).^[20]

I.3. Phénomène de luminescence

I.3.1. Bases de photophysique

La lumière obtenue par ECL est en fait la transition radiative d'un état excité d'un luminophore A^* vers son état fondamental A avec émission d'un photon d'énergie $h\nu$ (Équation 1.13). Ce processus peut être comparé à celui observé en PL qui est d'abord initié par une étape de photoexcitation avec $h\nu_{\text{abs}}$ (Équation 1.14) avant d'être par la suite relaxé avec un retour à l'état fondamental impliquant l'émission d'un photon par fluorescence $h\nu_{\text{fluo}}$ (Équation 1.15) ou par phosphorescence $h\nu_{\text{phos}}$ (Équation 1.16) [10]:



Les processus impliqués dans la PL sont schématisés sur des niveaux d'énergie discrets de la molécule par le diagramme de Perrin Jablonski ci-dessous (Figure 1.5).

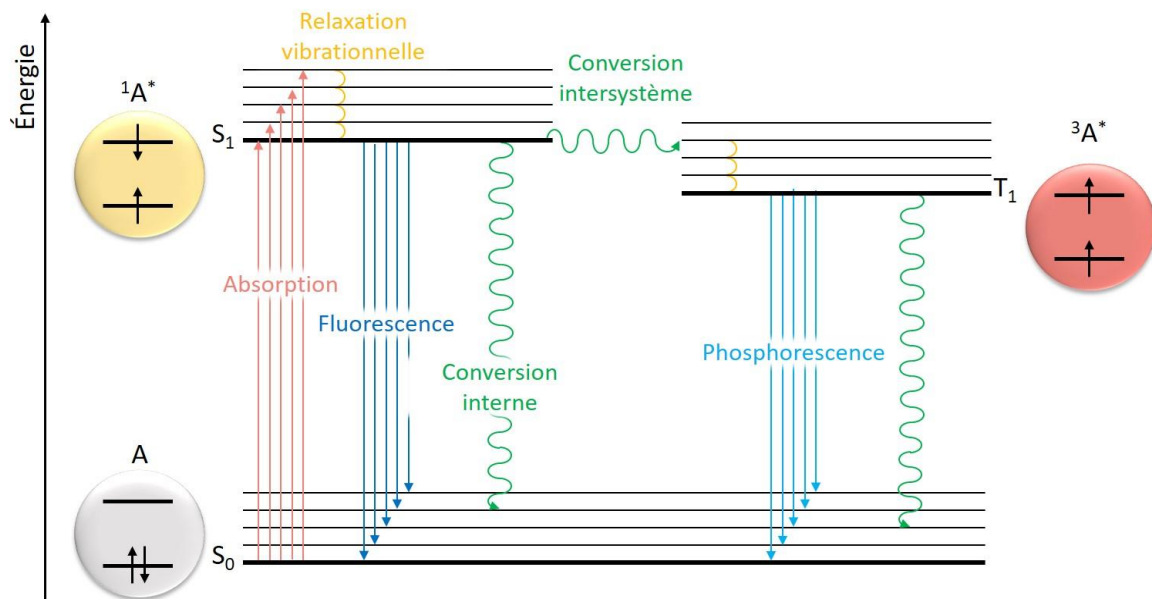


Figure 1.5 : Diagramme de Perrin Jablonski. [11]

Les niveaux électroniques singulet (1A ou S) et triplet (3A ou T) sont représentés par les lignes horizontales dans lesquelles chacune comporte plusieurs niveaux vibrationnels ν , représentés par les lignes plus fines. Ces niveaux sont disposés selon leur valeur énergétique et tous les niveaux supérieurs ne sont pas représentés.

Le nom des niveaux électroniques provient de la multiplicité $(2S+1)$ de spin S , symbolisé par l'orientation des électrons. Lorsque ceux-ci sont de spin opposé, qu'ils soient appariés ou célibataires, $S = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$ et donc la multiplicité du spin vaut $2S+1 = 1$: c'est l'état singulet. Lorsqu'ils sont de spin

parallèle, $S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$ et leur multiplicité est alors égale à $2S+1 = 3$: on parle d'état triplet. Ce dernier est représenté sur le diagramme à droite pour distinguer la multiplicité de spin.

À l'équilibre, lorsque le luminophore est à l'état fondamental et d'après le principe d'exclusion de Pauli, les orbitales atomiques de plus basses énergies sont chacune remplies par paires d'électrons avec une opposition de spin. Cet état stationnaire est singulet et noté S_0 . Quand la molécule absorbe un photon d'énergie $h\nu_{\text{abs}}$ suffisante, un électron est promu de l'orbitale moléculaire HOMO à celle de la LUMO tel que $S_0 \rightarrow S_1$. La différence d'énergie entre ces deux orbitales est appelée énergie d'écart de bandes (ou « band gap energy ») E_g et l'excitation de cet électron n'est possible que si $h\nu_{\text{abs}} \geq E_g$. Ici, l'écart correspond à la transition entre deux états singulets car, d'après le principe de Franck-Condon, en termes de position et d'énergie cinétique la molécule est semblable à son état fondamental mais diffère par sa configuration électronique.

Pour retourner à son état fondamental, le luminophore relaxe d'abord par dissipation en énergie thermique jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas ($\nu = 0$). En effet, la règle de Kasha stipule que l'émission ne peut être produite que depuis le niveau le plus bas. Ensuite, plusieurs routes sont possibles. Le luminophore retourne à son état fondamental par transition permise $S_1 \rightarrow S_0$ avec un temps de l'ordre de la nanoseconde, soit par transition radiative appelée fluorescence, soit par conversion interne qui n'est pas radiative. Cette transition est en compétition avec un possible transfert d'électron par conversion intersystème d'un état singulet vers un état triplet $S_1 \rightarrow T_1$ de l'ordre de la nanoseconde. C'est une transition interdite mais possible par l'effet spin-orbite, c'est-à-dire le couplage entre le moment magnétique de l'orbital et celui de spin. À partir de cet état, l'électron est transféré vers l'état stationnaire $T_1 \rightarrow S_0$ soit de manière radiative par phosphorescence pendant un temps de l'ordre de la seconde à la milliseconde, soit sans émission de photon par conversion intersystème qui a une durée équivalente. Cette transition impliquant un changement dans la multiplicité de spin est donc aussi interdite avec une constante de vitesse plus faible, ce qui explique la durée de la phosphorescence qui est de plusieurs ordres de magnitudes plus long que la fluorescence. ^[11,12]

De ce fait, le diagramme met en évidence que le retour à l'état fondamental du luminophore après absorption d'un photon n'aboutit pas systématiquement vers un phénomène radiatif. La PL a un rendement quantique φ qui correspond au pourcentage du nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés :

$$\varphi = \frac{N_{\text{Photons émis}}}{N_{\text{Photons absorbés}}} \quad (1.17)$$

En plus de la désactivation par transfert non-radiatifs, le rendement φ du luminophore peut aussi être réduit en prenant en compte le phénomène d'extinction, *i.e.* le « quenching » en anglais, qui n'est pas représenté sur le diagramme et qui est le transfert de l'électron vers un ion radical ou une autre molécule, le plus souvent l' O_2 .^[21]

Le diagramme fait aussi ressortir une différence d'énergie de transition entre l'étape d'absorption et celle d'émission de lumière avec $E_{\text{abs}} > E_{\text{em}}$, soit $h\nu_{\text{abs}} > h\nu_{\text{em}}$. En effet, une partie de l'énergie se dissipe lors de la relaxation des niveaux vibratoires ν du niveau électronique S_1 . Un écart est aussi notable entre un photon émis par phosphorescence $h\nu_{\text{phos}}$ qui aura moins d'énergie qu'un

photon émis par fluorescence $h\nu_{\text{fluo}}$ car le niveau T_1 a une énergie plus faible que S_1 . Ces phénomènes photophysiques sont observables par spectroscopie. L'énergie étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde, si $E_{\text{abs}} > E_{\text{em}}$ alors $h\nu_{\text{abs}} < h\nu_{\text{em}}$. Cet écart de longueur d'onde entre le spectre absorption et celui d'émission, et donc d'énergie, est mis en évidence par spectroscopie avec le décalage de Stokes, *i.e.* « Stokes shift » en anglais, illustré dans la **Figure 1.6** ci-dessous.

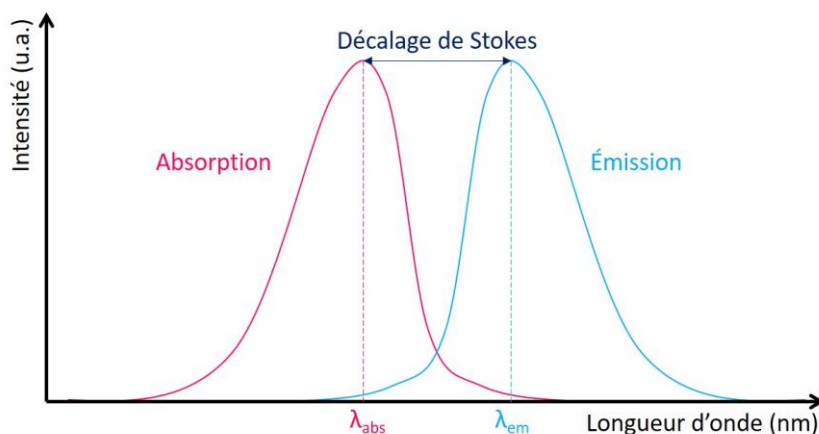


Figure 1.6 : Schéma du décalage de Stokes entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission d'un luminophore.

Ce décalage spectral est très utilisé dans le domaine de la bio-imagerie car il donne la possibilité de n'observer que la lumière émise par le luminophore en filtrant, à l'aide d'un miroir dichroïque et de filtre, la lumière d'excitation. L'emploi de la PL en bio-imagerie est détaillé dans le chapitre II. Ce principe est aussi important pour les chapitres III, IV et V dans lesquels intervient la PECL qui permet à l'inverse d'obtenir un décalage semblable à celui de l'anti-Stokes, plus exactement de la conversion ascendante où $E_{\text{abs}} < E_{\text{em}}$ et donc $h\nu_{\text{abs}} < h\nu_{\text{em}}$.

I.3.2. Luminophores

I.3.2.1. Molécule inorganique

De nombreux luminophores sont sous forme de complexe de métaux de transition tels que le ruthénium, l'iridium, le platine, l'osmium, le cuivre, l'aluminium ou bien encore le molybdène^[16], avec une luminescence provenant de la transition d'une orbitale liante π vers une orbitale antiliante π^* . Le premier complexe étudié en ECL est le complexe de tris(bipyridine) ruthénium(II) ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) de forme octaédrique avec un ion Ru^{2+} d'orbitale $4d^6$, entouré par trois ligands bpy bidentates. C'est ce complexe qui est le plus étudié car il est finalement le plus efficace avec un rendement quantique $\varphi = 5$ à 6% ^[3,22] et il peut être utilisé dans de nombreuses conditions grâce à sa bonne stabilité et solubilité en milieux organiques ainsi qu'en milieu aqueux, tout en restant inerte en milieu biologique.

Le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est caractérisé par une absorption maximale à $\lambda_{\text{abs}} = 454$ nm et une émission dans le rouge avec un maximum à $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm (**Figure 1.7**). L'état excité est obtenu par transfert d'électron de l'orbitale πd^5 du métal Ru vers l'orbitale π^* du ligand bpy (« Metal-to-Ligand

Charge Transfer » ou MLCT) et le complexe est alors sous forme de Ru^{3+} avec un ligand radical anion $\text{bpy}^{\bullet-}$. L'émission peut-être de la fluorescence $S_1 \rightarrow S_0$ mais aussi de la phosphorescence $T_1 \rightarrow S_0$ car la conversion intersystème $S_1 \rightarrow T_1$ est favorisée par la présence d'un atome lourd, dans ce cas le Ru.^[23]

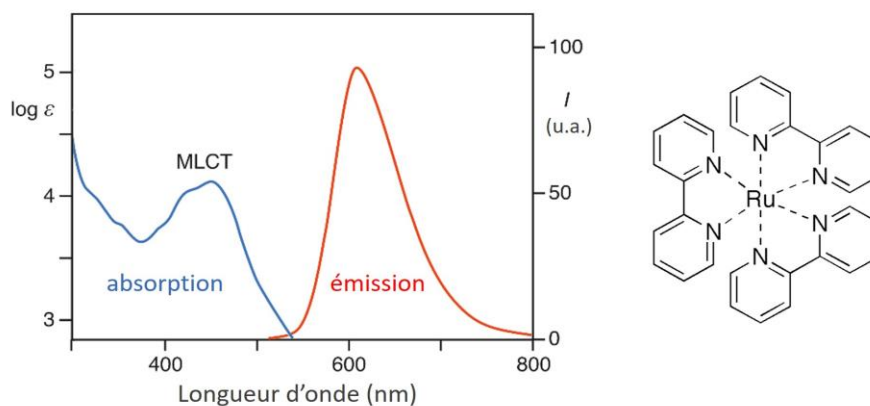


Figure 1.7 : Spectre d'absorption et d'émission du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dans de l'eau ainsi que sa représentation.^[23]

Le complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est entièrement régénéré après chaque processus photophysique, ce qui est un avantage considérable en ECL car il peut ainsi être utilisé en tant que marqueur par exemple sur des anticorps^[24] ou de l'ADN^[25], ou bien sur des entités biologiques comme des cellules^[26] ou des bactéries^[27]. L'ECL à base de ce luminophore est alors adapté pour le domaine du diagnostic médical, dans l'immuno-dosage et plus récemment dans la microscopie et l'imagerie.

1.3.2.2. Molécule organique

Les luminophores peuvent aussi être de nature organique et ils sont caractérisés par un système conjugué π permettant la délocalisation des électrons le long de la chaîne d'atomes. Ils peuvent être sous forme de polymères, de tryptophane, d'esters d'acridinium ou bien d'hydrocarbures polyaromatiques^[28,29] tels que l'anthracène ou le rubrène qui furent les premiers luminophores organiques étudiés en ECL.^[30] Parmi eux, le luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) est celui qui suscite le plus d'intérêt car il est peu cher et abondant. À l'état solide, il est sous forme de poudre cristalline jaune qui est soluble dans la plupart des solvant organiques polaires. Il absorbe dans les UV à une longueur d'onde maximale $\lambda_{\text{abs}} = 396 \text{ nm}$ et émet une lumière bleue caractéristique à $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$ en milieu aqueux (**Figure 1.8**). Cette émission provient en réalité de la relaxation radiative d'une molécule intermédiaire (3-aminophthalate) après oxydation du luminol.^[31] Cette étape étant irréversible, le luminol n'est donc pas régénéré à la fin du processus, contrairement au $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

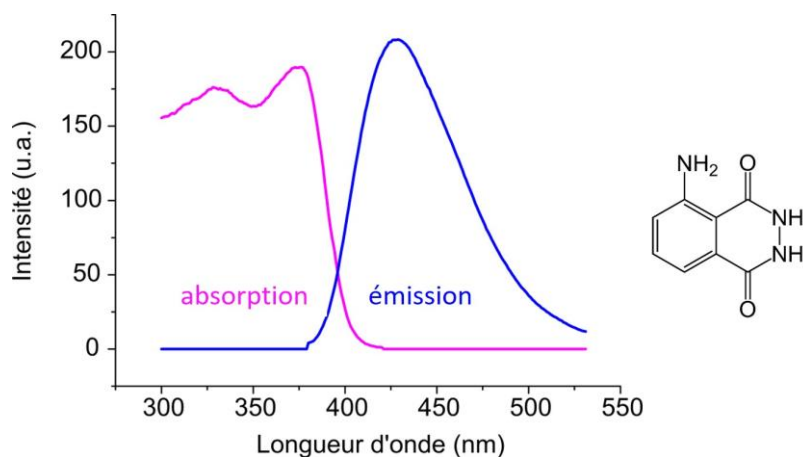


Figure 1.8 : Spectre d'absorption et d'émission du luminol dans l'eau ainsi que sa représentation.

Le luminol est d'abord connu en tant que sonde CL qui génère une luminescence intense lorsqu'il est mélangé avec un agent oxydant. Il est par exemple utilisé pour la détection de protéines par Western blot^[32] ainsi que de métaux, dont le fer contenu dans les hémoglobines^[33] en médecine légale ou bien même pour des études archéologiques^[34]. Le luminol est aussi très utilisé en ECL en présence de H_2O_2 avec une intensité optimale observée en milieu aqueux alcalin ($pH \approx 10$). Son utilisation en ECL sera détaillée dans la partie I.5.2.

I.4. Cinétique et thermodynamique de la réaction

L'émission ECL par relaxation du luminophore n'a pas lieu après absorption d'une énergie lumineuse comme en PL mais suite à une réaction chimique entre espèces électrogénérées. Cette réaction consiste en un transfert électronique intermoléculaire très exergonique entre un oxydant fort A^- et un réducteur fort D^+ générant un état excité.

Jusque dans les années 60, cela n'était pas envisageable car une réaction énergétique (avec $\Delta G^\circ < 0$) était supposée de n'aboutir qu'à la génération de l'état fondamental du produit car cet état est thermodynamiquement favorisé par rapport à l'état excité. R. A. Marcus mit en évidence en 1965 la possibilité d'obtenir cet état excité en tenant en compte la cinétique du transfert d'électron lors de la formation des produits, et donc de l'existence de la région inverse.^[35] Ces travaux lui ont valu le prix Nobel de chimie en 1992.^[36]

Le diagramme de la **Figure 1.9.a** ci-dessous représente les énergies de potentiel de surface du réactif et du produit selon la coordonnée de réaction, *i. e.* la réorganisation géométrique de la molécule après transformation du réactif en produit, car leurs positions nucléaires à l'équilibre sont différentes. Leurs énergies sont représentées en noir et en rouge respectivement et sont des fonctions paraboliques. La courbe en bleu est la linéarisation des énergies selon la progression de la réaction. Cette réaction est caractérisée par l'enthalpie libre ΔG entre le réactif et le produit, par l'énergie d'activation E_A nécessaire pour obtenir le déplacement de l'électron du réactif vers le produit ainsi que par l'énergie de réorganisation λ_r qui correspond à l'énergie nécessaire au réactif pour obtenir la même configuration nucléaire que le produit sans transfert d'électron. La constante de vitesse k de la réaction dépend de E_A (avec une constante k_B et la température T) tel que :

$$k \propto e^{-\frac{E_A}{k_B T}} \quad (1.19)$$

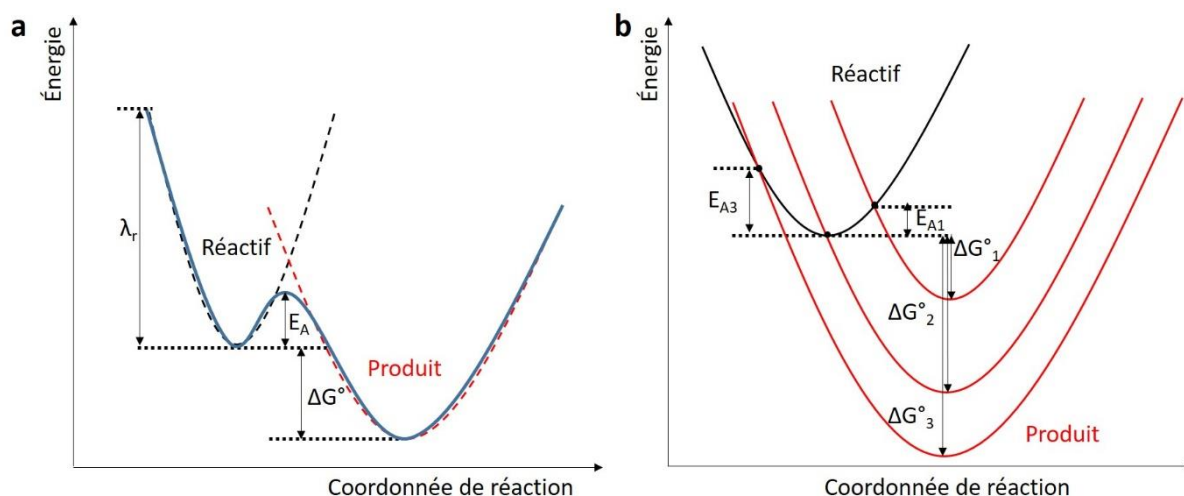


Figure 1.9 : a) Graphique affichant l'énergie libre en fonction de la coordonnée de réaction. b) Influence de l'énergie de Gibbs sur le potentiel de surface du produit.^[36]

Cette réaction peut aussi être simplement représentée par les paraboles du réactif et du produit tel le schéma sur la **Figure 1.9.b**. D'un point de vue thermodynamique, il y a une énergie d'activation, ici E_A , lorsque l'énergie de surface du produit n'est pas trop basse (ΔG°_1) et ce jusqu'à une valeur minimale $\Delta G^\circ_2 = -\lambda_r$ où il n'y a plus de transfert d'électron. Cependant, l'ECL est la preuve expérimentale que ce transfert est possible lorsque la différence d'énergie est encore plus importante ($\Delta G^\circ_3 \ll 0$) et qu'il permet donc d'obtenir le produit à un état excité. R. A. Marcus a pu expliquer ce phénomène en liant la thermodynamique ΔG° à la cinétique k de la réaction de manière intrinsèque avec l'énergie d'activation E_A :

$$E_A = \frac{(\Delta G^\circ + \lambda_r)^2}{4\lambda_r} \quad (1.20)$$

De cette façon, le point de croisement entre les paraboles des énergies de surface entre le réactif et le produit et l'énergie d'activation a pu être résolu en traçant la cinétique ($\ln k$) en fonction de la thermodynamique ($-\Delta G^\circ$) (**Figure 1.10**) et donc prouver l'existence de la région inverse.

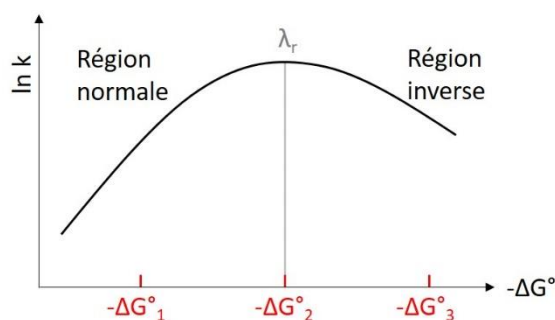


Figure 1.10 : Relation entre le logarithme de la constante de vitesse et l'opposé de l'énergie de Gibbs qui délimite les régions normale et inverse de la théorie de R. A. Marcus.^[36]

D'après la **Figure 1.10**, la thermodynamique influence la cinétique de la réaction de deux manières différentes selon si l'énergie de Gibbs ($-\Delta G^\circ$) se situe dans la région normale ou la région inverse. Dans la région normale, les réactions redox s'accroissent à mesure qu'elles deviennent plus spontanées (*i.e.*, $E_A > \lambda_r$). Mais à partir d'un certain $-\Delta G^\circ$, la réaction devient d'autant plus lente qu'elle est favorisée thermodynamiquement (*i.e.*, $E_A > \lambda_r$) : c'est la région inverse. Dans le cas de l'ECL, l'énergie de réorganisation λ_r étant plus faible que l'énergie d'activation, les conditions sont alors réunies pour obtenir le produit à l'état excité. C'est pourquoi le transfert d'électron entre un oxydant fort et un réducteur fort qui implique un ΔG° très négatif est possible et permet d'obtenir l'état excité du luminophore. La génération de ces réactifs en imposant un seul potentiel à l'électrode est expliquée dans la partie suivante, en détaillant les mécanismes ECL qui sont utilisés dans les travaux de thèse décrits dans les chapitres suivants.

I.5. Mécanismes ECL

I.5.1. ECL via un mécanisme co-réactif

I.5.1.1. Exemple du système ECL anodique $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TPrA

Le premier exemple de mécanisme avec un co-réactif concerne le système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TPrA qui intervient dans une majorité des publications sur l'ECL car il a d'excellentes propriétés chimiques, électrochimiques et photochimiques. ^[23] En effet, les amines sont de très bons co-réactifs dont l'intensité ECL augmente avec leur degré de substitution, c'est-à-dire que la lumière observée est plus intense avec l'emploi d'un amine tertiaire qu'une amine secondaire, et d'autant plus qu'avec une amine primaire. Le couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TPrA est aujourd'hui le système modèle pour l'ECL. Il est caractérisé dans la **Figure 1.11** par une CV enregistrée sur une électrode de carbone vitreux (« glassy carbon ou GC) dans une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ avec de la TPrA dans du PBS ainsi que par l'évolution de l'intensité ECL, enregistrée avec un tube photomultiplicateur (PMT), en fonction du potentiel appliqué. Le courant apparaît à partir de 0,8 V (vs. Ag/AgCl), correspondant à l'oxydation de la TPrA, et le signal ECL à 0,9 V (vs. Ag).

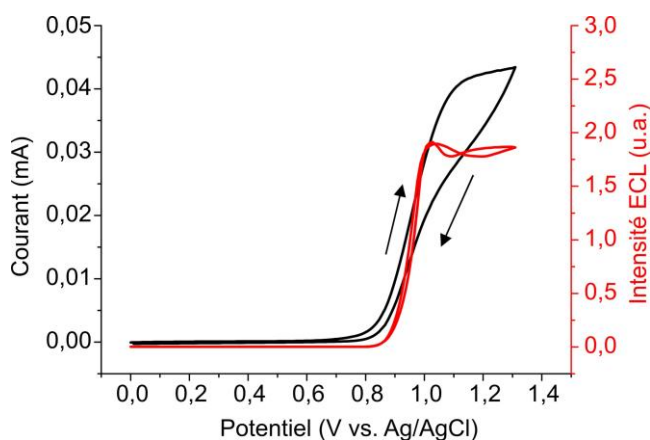


Figure 1.11 : CV et intensité ECL correspondante du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à la concentration de 1 mM avec de la TPrA à la concentration de 100 mM dans du PBS à 0,1 M (pH = 7,4). Conditions expérimentales : WE : GC ; CE : Platine ; REF : Ag/AgCl dans KCl (3 M) ; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Le mécanisme ECL de ce couple a été très étudié^[37-40] et plusieurs routes sont possibles et schématisées ci-dessous.

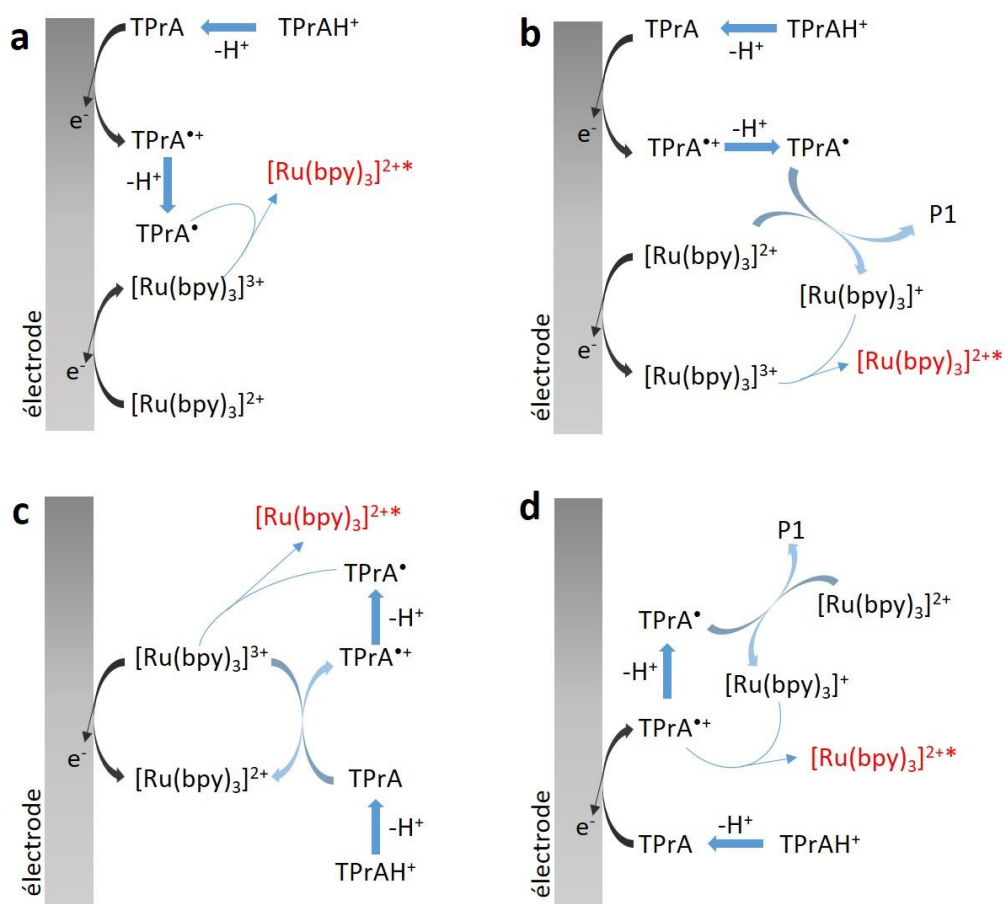


Figure 1.12 : Les différentes routes ECL du système anodique $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$ par a) oxydation réductrice « classique », b) oxydation réductrice avec annihilation du complexe de ruthénium, c) route catalytique et d) route à faible potentiel d'oxydation.^[20,41]

Il y a dans un premier cas l' « oxydation réductrice » où le luminophore et la TPrA sont d'abord oxydés à l'électrode indépendamment, puis le radical TPrA• réagit avec le $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ pour former le $[Ru(bpy)_3]^{2+*}$. Ce radical peut aussi induire une réaction d'annihilation du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en réduisant celui-ci en $[Ru(bpy)_3]^+$ qui réagit ensuite avec le $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ pour former le $[Ru(bpy)_3]^{2+*}$. Un autre mécanisme possible est la route « catalytique » dans laquelle l'oxydation du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ induit l'oxydation homogène de la TPrA. Le co-réactif réagit ensuite avec le $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ pour produire le cation radical TPrA•+. Enfin, lorsqu'un potentiel inférieur à celui de l'oxydation du complexe de ruthénium est appliqué, c'est la route à « faible potentiel d'oxydation » qui est observée. Dans ce cas, seule la TPrA est oxydée au niveau de l'électrode et, après dissociation, produit le radical TPrA•. Par réaction redox, ce radical permet la réduction du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en $[Ru(bpy)_3]^+$ et ainsi, ce dernier est oxydé par la TPrA•+, produite à la surface de l'électrode, en $[Ru(bpy)_3]^{2+*}$.

Le mécanisme clé du système $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$, qui permet principalement d'obtenir l'état excité du luminophore et donc l'émission rouge, est l'étape intermédiaire de déprotonation du radical cation TPrA•+ après son oxydation à la surface de l'électrode. Cette étape permet de générer un radical

TPrA* qui a un potentiel redox de -1,7 V (vs. Ag/AgCl), bien inférieur au potentiel redox de la TPrA à 0,8 V, et donc d'avoir une réaction très exergonique à 2,8 eV avec le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ qui lui s'oxyde à environ 1,1 V. Le pH de la solution est donc un paramètre important pour lui permettre une déprotonation comme sur le schéma ci-dessous. C'est pourquoi la réaction se produit à un pH neutre (7,4).

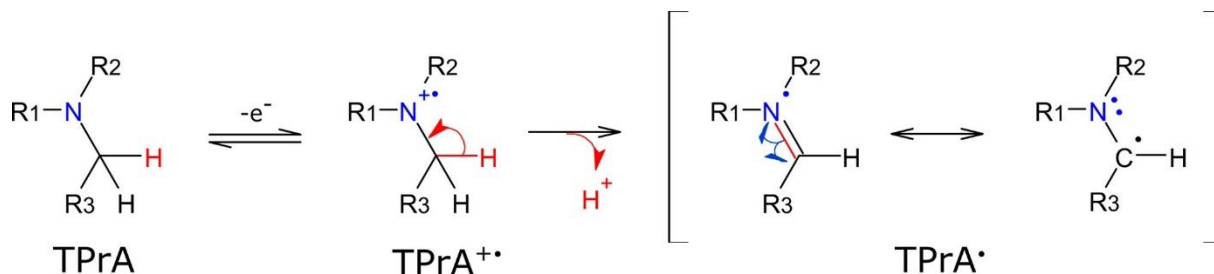


Figure 1.13 : Mécanisme décomposition de la TPrA oxydée par déprotonation formant le radical TPrA*.

I.5.1.2.Exemple du système ECL cathodique $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ /BPO

Le mécanisme de « réduction-oxydante » est aussi possible pour générer l'ECL du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ avec le BPO.^[42] Cette fois-ci, le système requiert de travailler en milieu organique pour éviter la réduction du H^+ (ou éventuellement en mélange acétonitrile/eau), d'autant plus qu'il faut appliquer des potentiels très négatifs. La CV de ce couple est enregistrée sur une électrode de GC dans une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ avec du BPO et du TBAPF_6 dans de l'ACN (après bullage au N_2), l'intensité ECL est mesurée à l'aide d'un PMT et ils sont représentés dans la **Figure 1.14**. Le courant négatif apparaît à partir de -0,1 V (vs. Ag) correspondant à la réduction de l'eau résiduelle, puis la réduction du BPO est visible sur une deuxième vague à -0,8 V et, enfin, le signal ECL débute à -1,2 V lorsqu'un ligand bpy du complexe est réduit. Le Ru^{II} est alors réduit en Ru^{I} .

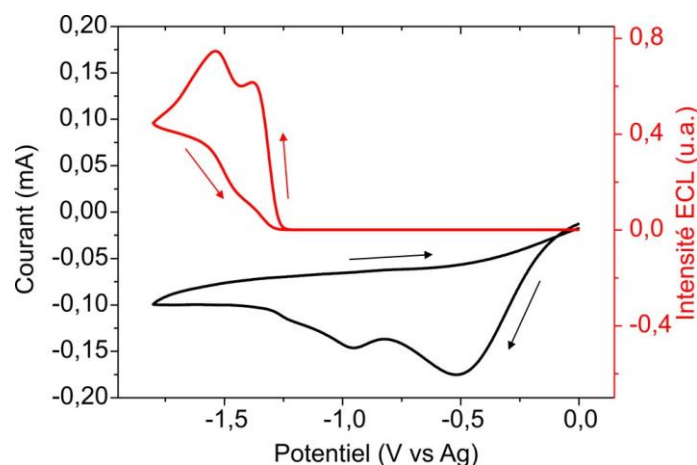


Figure 1.14 : CV et intensité ECL correspondante du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 60 μM avec du BPO à 10 mM dans du TBAPF_6 à 0,1 M. Conditions expérimentales : WE : GC ; CE : Platine ; REF : Ag/AgCl dans KCl (3 M) ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Ici, le co-réactif est réduit pour former un radical anion $\text{C}_2\text{O}_4^{\bullet-}$ par clivage homolytique de la liaison O-O,^[43] schématisé dans la **Figure 1.15**. Ce radical au potentiel redox de 1,5 V (vs. SCE) permet de promouvoir le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, qui a un potentiel à -1,8 V en réduction, à l'état excité.^[44]

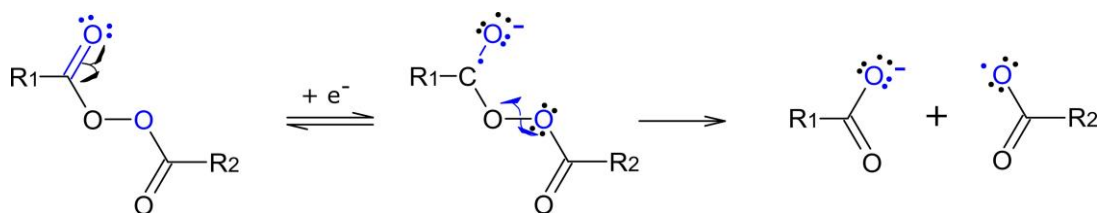


Figure 1.15 : Mécanisme de décomposition concerté du BPO réduit avec clivage de la liaison peroxyde produisant le radical $C_2O_4^{\bullet-}$.^[11]

I.5.2. ECL par rupture de liaisons avec le système anodique luminol/ H_2O_2

Le luminol avec le H_2O_2 est également un système anodique luminaire/co-réactif modèle très étudié. Cependant, le mécanisme diffère de ceux présentés précédemment mais peut être simplifié comme sur la **Figure 1.16**. Le luminol oxydé est d'abord déprotoné, ce qui conduit à la formation de l'intermédiaire réactionnel diazoquinone. Cet intermédiaire est ensuite oxydé par le H_2O_2 formant un pont endoperoxyde. S'ensuit la rupture de ce pont qui est très énergétique et libère un équivalent N_2 . Cette décomposition entraîne l'état excité du 3-aminophtalate* qui retourne ensuite à son état fondamental par l'émission d'une lumière bleue à 425 nm.^[28,29]

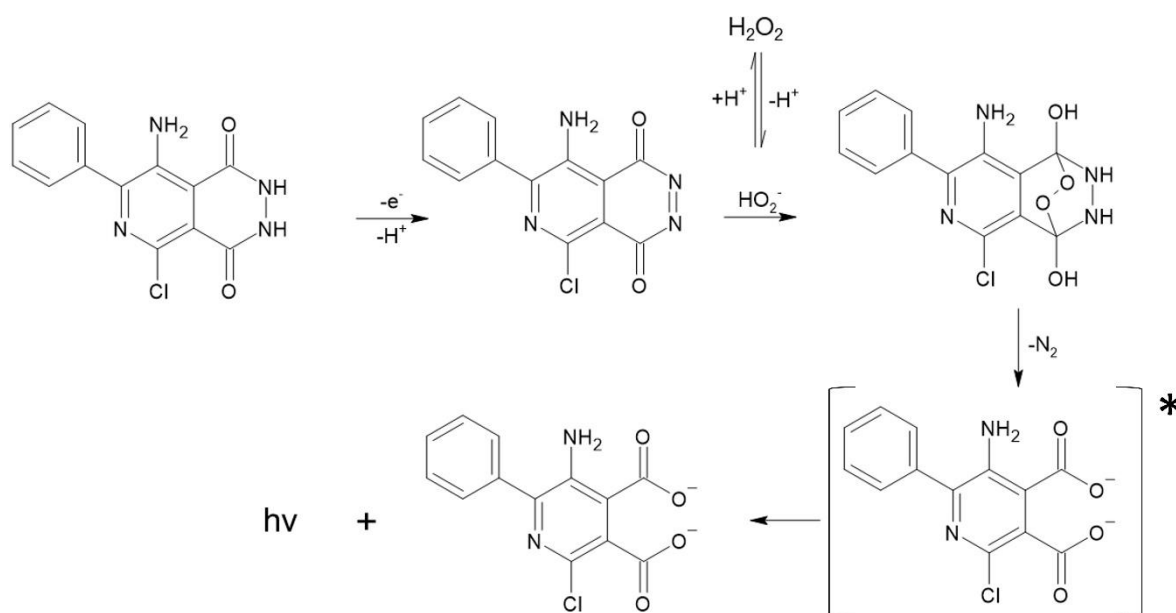


Figure 1.16 : Mécanisme ECL du système anodique luminol/ H_2O_2 .^[45]

L'ECL du luminol est caractérisé par un voltammogramme ci-dessous représentant l'oxydation du luminol en présence de H_2O_2 dans du KOH sur une électrode de GC à un potentiel de +0,2 V (vs. Ag/AgCl) couplé à la mesure de l'intensité ECL par un PMT. L'ECL du luminol débute à un potentiel nettement plus faible par rapport à celui du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$. Il dépend de la concentration en H_2O_2 ainsi que du pH qui est idéalement alcalin pour une meilleure solubilité du luminol, avec un optimum à pH = 9,5.^[46]

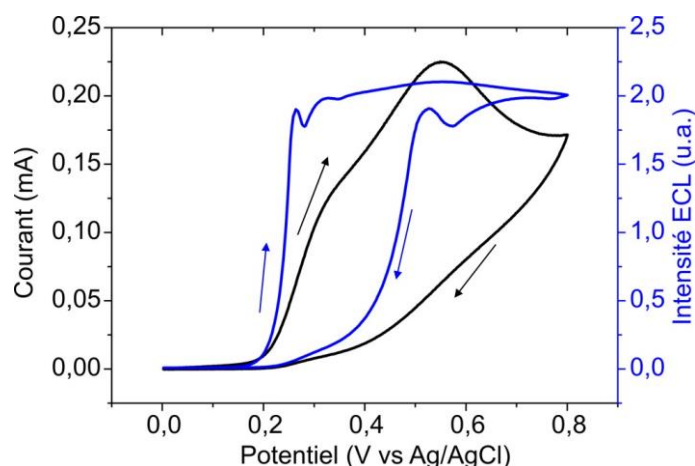


Figure 1.17 : CV et intensité ECL correspondante du luminol à 10 mM avec du H_2O_2 à 33 mM dans du KOH à 0,1 M (pH = 12). Conditions expérimentales : WE : GC ; CE : Platine ; REF : fil d'Ag ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Bien que le rendement ECL de cette réaction reste assez faible avec $\varphi = 1 \%$ et que le luminophore ne soit pas régénéré à la fin du processus, ce système est très utilisé pour la détection du H_2O_2 ,^[47] du glucose, d'enzymes^[48,49] ainsi que dans la microscopie ou l'imagerie.^[50] Si son utilisation en milieu basique limite son champ d'application, il est possible de remplacer le luminol par une molécule très proche, le L-012 (8-Amino-5-chloro-2,3-dihydro-7-phenyl-Pyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-dione) dont l'ECL également bleu est intense à pH neutre.

I.6. Historique de l'ECL

Les mécanismes physiques et chimiques impliqués dans l'ECL ayant été décrits précédemment, c'est à la fin de ce chapitre que l'historique de l'ECL est raconté afin de mieux comprendre sa découverte et son développement.

Ce phénomène de luminescence fût publié pour la première fois en 1927 par R. T. Dufford, D. Nightingale et L. W. Gaddum à l'Université du Missouri et obtenu par électrolyse avec le réactif de Grignard.^[51] Cette étude fût reprise par N. Harvey en 1929 à l'Université de Princeton avec l'utilisation du luminol.^[52] Ce n'est que 30 ans plus tard que le principe d'ECL fût détaillé, d'abord par D. M. Hercules en 1964 au Massachusetts Institute of Technology avec l'émission d'hydrocarbures aromatiques tels que le diphénylanthracène, l'anthracène ou le rubrène.^[30] Ces travaux apportèrent ensuite les premières preuves expérimentales de l'existence de la région inversée postulée l'année suivante par R. A. Marcus, lauréat du prix Nobel de Chimie en 1992.^[35]

À partir des travaux sur le rubrène, D. M. Hercules et F. E. Lytle furent en 1966 les premiers à s'intéresser au complexe de ruthénium avec les ligands bpy ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$) qui peut générer de la luminescence par CL en milieu aqueux.^[30] Ce complexe a ensuite eu une première utilisation en ECL par annihilation par N. E. Tokel et A. J. Bard en 1972^[53] à l'Université du Texas, mais dans de l'acétonitrile (ACN).

L'utilisation de l'ECL était encore limitée aux milieux organiques tels le DMF, l'ACN ou le DMSO et n'était pas possible en milieux aqueux. En effet, la plupart des luminophores connus étaient insolubles

dans ce milieu, mais c'était surtout parce que l'eau n'a pas une fenêtre de potentiel assez large (d'environ 1,23 V), par rapport à l'écart minimal entre le potentiel de l'oxydant fort et celui du réducteur fort (autour de 2 à 3 V) nécessaire pour produire l'ECL dans le visible. Il fallait donc pouvoir générer le réducteur en même temps que l'oxydation de ce dernier. Pour cela, l'introduction d'un co-réactif fut ensuite rapportée pour la première fois en 1981 par A. J. Bard et I. Rubinstein avec le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ comme luminophore, étant aussi soluble en milieu aqueux, et l'ion oxalate ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) en tant que co-réactif. Cela a permis de considérablement simplifier la génération de l'ECL en une seule étape par la « réduction-oxydative », mais aussi de localiser l'ECL à la surface de l'électrode sur une épaisseur de quelques micromètres. ^[19,54] Depuis, d'autres agents réducteurs ont été étudiés en tant que co-réactif. ^[55,56] dont la TPrA en 1987 qui permet un ECL efficace du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à un pH proche de 7. ^[38,39]

L'ECL étant ainsi simplifiée, applicable en milieu physiologique et ce de manière localisée, cette technique a suscité un fort intérêt pour des applications analytiques telles que la chromatographie avec la détection d'amines par exemple, ou bien le marquage avec le luminophore de molécules biologiques comme les anticorps pour les immuno dosages, ou encore pour l'analyse d'ADN. ^[25] Le développement de l'ECL du système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ /TPrA a pu aboutir à la commercialisation par l'entreprise Roche en 1994 du premier module de détection antigénique par l'ECL de billes magnétiques marquées au $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. ^[12] Aujourd'hui des appareils pour immunodosage basés sur l'ECL sont commercialisés par Mesoscale discovery et par Roche Diagnostics avec par exemple le Cobas. ^[1,57]



Figure 1.18 : Photos de l'appareil d'analyse ECL cobas e 411 de chez Roche Diagnostics.

Références

- [1] “diagnostics.roche.com,” can be found under <https://diagnostics.roche.com/ch/fr/products.html>, n.d.
- [2] D. Laser, A. J. Bard, *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *34*, 6.
- [3] J. D. Luttmer, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1979**, *126*, 414–419.
- [4] Y. Zhao, J. Yu, G. Xu, N. Sojic, G. Loget, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13013–13016.
- [5] J. Yu, H. Saada, R. Abdallah, G. Loget, N. Sojic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *132*, 15269–15272.
- [6] J. Yu, H. Saada, N. Sojic, G. Loget, *Electrochim. Acta* **2021**, *381*, 138238.
- [7] A. J. Bard, Ed., *Electrogenerated Chemiluminescence*, Marcel Dekker, New York, **2004**.
- [8] F. Barni, S. W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, G. Lago, *Talanta* **2007**, *72*, 896–913.
- [9] P. B. O’Hara, W. St. Peter, C. Engelson, *J. Chem. Educ.* **2005**, *82*, 49.
- [10] A. M. Powe, K. A. Fletcher, N. N. St. Luce, M. Lowry, S. Neal, M. E. McCarroll, P. B. Oldham, L. B. McGown, I. M. Warner, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4614–4634.
- [11] L. Bouffier, N. Sojic, in *Analytical Electrogenerated Chemiluminescence: From Fundamentals to Bioassays* (Ed.: N. Sojic), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2019**, pp. 1–28.
- [12] W. Miao, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2506–2553.
- [13] L. R. Faulkner, H. Tachikawa, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 691–699.
- [14] G. Valenti, A. Fiorani, H. Li, N. Sojic, F. Paolucci, *ChemElectroChem* **2016**, *3*, 1990–1997.
- [15] W. Miao, J.-P. Choi, in *Electrogenerated Chemiluminescence*, Marcel Dekker, New York, **2004**, pp. 213–271.
- [16] M. M. Richter, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3003–3036.
- [17] J.-P. Choi, K.-T. Wong, Y.-M. Chen, J.-K. Yu, P.-T. Chou, A. J. Bard, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14407–14413.
- [18] S. White, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6891–6895.
- [19] I. Rubinstein, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 512–516.
- [20] W. Miao, J.-P. Choi, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14478–14485.
- [21] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, NY, **2010**.
- [22] R. S. Glass, L. R. Faulkner, *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 1160–1165.
- [23] A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. V. Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *84*, 85–277.
- [24] F. Deiss, C. N. LaFratta, M. Symer, T. M. Blicharz, N. Sojic, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6088–6089.
- [25] G. F. Blackburn, H. P. Shah, J. H. Kenten, J. Leland, R. A. Kamin, J. Link, J. Peterman, M. J. Powell, A. Shah, D. B. Talley, *Clinical Chemistry* **1991**, *37*, 1534–1539.
- [26] G. Valenti, S. Scarabino, B. Goudeau, A. Lesch, M. Jović, E. Villani, M. Sentic, S. Rapino, S. Arbault, F. Paolucci, N. Sojic, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16830–16837.
- [27] Y. Zhou, J. Dong, P. Zhao, J. Zhang, M. Zheng, J. Feng, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 8947–8953.
- [28] S. K. Lee, Y. Zu, A. Herrmann, Y. Geerts, K. Müllen, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3513–3520.
- [29] Arnold. Zweig, Gerlinde. Metzler, A. H. Maurer, B. George. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4091–4098.
- [30] D. M. Hercules, *Science* **1964**, *145*, 808–809.
- [31] E. H. White, Oliver. Zafirou, H. H. Kagi, J. H. M. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 940–941.
- [32] A. Vachereau, *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 206–208.

- [33] W. Specht, *Angew. Chem.* **1937**, *50*, 155–157.
- [34] A. Vish, T. E. Yeshion, *North American Archaeologist* **2004**, *25*, 153–159.
- [35] R. A. Marcus, *The Journal of Chemical Physics* **1965**, *43*, 2654–2657.
- [36] R. A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1111–1121.
- [37] F. Kanoufi, Y. Zu, A. J. Bard, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 210–216.
- [38] J. K. Leland, M. J. Powell, *J. Electrochem. Soc.* **1990**, *137*, 3127–3131.
- [39] J. B. Noffsinger, N. D. Danielson, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 865–868.
- [40] L. He, K. A. Cox, N. D. Danielson, *Analytical Letters* **1990**, *23*, 195–210.
- [41] X. Gou, Z. Xing, C. Ma, J.-J. Zhu, *Chem. Biomed. Imaging* **2023**, DOI 10.1021/cbmi.2c00007.
- [42] D. L. Akin, R. L. Burke, *Chem. Phys. Letters* **1974**, *29*, 428–435.
- [43] S. Antonello, F. Maran, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12595–12600.
- [44] S. Antonello, F. Maran, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9668–9676.
- [45] C. A. Marquette, L. J. Blum, *Anal Bioanal Chem* **2008**, *390*, 155–168.
- [46] S. Sakura, *Anal. Chim. Acta* **1992**, *262*, 49–57.
- [47] K. Tian, D. Li, T. Tang, F. Nie, Y. Zhou, J. Du, J. Zheng, *Talanta* **2018**, *185*, 446–452.
- [48] Y. Cheng, R. Yuan, Y. Chai, H. Niu, Y. Cao, H. Liu, L. Bai, Y. Yuan, *Analytica Chimica Acta* **2012**, *745*, 137–142.
- [49] C. A. Marquette, S. Ravaud, L. J. Blum, *Analytical Letters* **2000**, *33*, 1779–1796.
- [50] H. Ding, B. Su, D. Jiang, *ChemistryOpen* **2023**, *12*, e202200113.
- [51] R. T. Dufford, D. Nightingale, L. W. Gaddum, *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 1858–1864.
- [52] N. Harvey, *J. Phys. Chem.* **1929**, *33*, 1456–1459.
- [53] N. E. Tokel, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2862–2863.
- [54] M.-M. Chang, T. Saji, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5399–5403.
- [55] D. Miller, G. McLendon, *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 950–953.
- [56] Israel. Rubinstein, C. R. Martin, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1580–1582.
- [57] “mesoscale.com,” can be found under <https://www.mesoscale.com/>, **n.d.**

Chapitre II : ECL appliquée à l'imagerie biologique

II. ECL appliquée à l'imagerie biologique

II.1. Introduction

L'imagerie biologique est par définition l'ensemble des techniques liées à l'étude des organismes vivants, qui permettent de visualiser des molécules, des cellules ou des processus biologiques. L'objectif général est de faciliter la compréhension des activités cellulaires et physiologiques par l'analyse du signal des données de l'image. Elle est principalement appliquée dans le domaine médical tel que la recherche de thérapie, le diagnostic médical ou les approches thérapeutiques contre les cancers, les tumeurs ou virus.^[1,2] L'imagerie biologique est aussi appliquée dans des domaines non médicaux, tels que la recherche en biotechnologie,^[3] l'agriculture,^[4] la bio-ingénierie,^[5] la microbiologie^[6] ou bien la biologie marine.^[7]

La microscopie de cellules uniques est très répandue en biologie et médecine moderne. En effet, elle permet d'étudier la structure cellulaire, de manière qualitative (hétérogénéité, forme) et quantitative (nombre de protéines, d'enzyme ou organites) et détecter des cellules anormales qui pourraient être à l'origine de cancer ou de tumeur, par exemple par la détection sélective de la surexpression de protéines membranaires.^[8]

La microscopie de cellules uniques repose généralement sur l'imagerie par photoluminescence (PL) de molécules chromophores. L'objet à observer est irradié par une lumière monochromatique qui excite spécifiquement le chromophore cible et qui, à son tour, émet de la lumière à une longueur d'onde plus élevée avec un décalage de Stokes. Les molécules d'intérêt peuvent être « auto-fluorescentes », c'est-à-dire naturellement capables de fluorescer : c'est la « fluorescence primaire ». C'est le cas pour certaines molécules présentes dans la cellule telles que la NADH ou de la chlorophylle. Dans le cas contraire, la molécule d'intérêt (qui peut être par exemple une protéine, de l'ADN, un sucre, ou un phospholipide) est marquée spécifiquement par une sonde fluorescente, telle que la fluorescéine, les marqueurs Alexa (488, 350, 532, ou 568), ou encore la calcéine^[9] : c'est la « fluorescence secondaire ». De cette manière, la PL permet de visualiser spécifiquement des molécules d'intérêt d'une cellule, celles-ci apparaissant brillantes sur un fond noir et apportant donc un contraste très élevé.

Les méthodes les plus courantes de bio-imagerie de cellules par PL sont la microscopie à épifluorescence de plein champ, qui sera utilisée dans les travaux de thèse en bio-imagerie, et la microscopie confocale. Des exemples d'images obtenues par ces deux méthodes sont présentés dans la **Figure 2.1**.

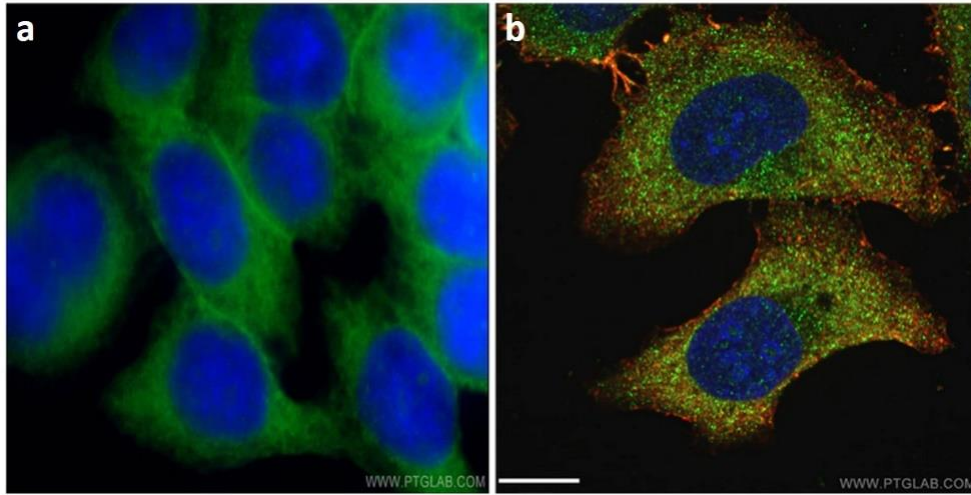


Figure 2.1 : Comparaison de l'imagerie de cellules par fluorescence de Alexa Fluor 488 (vert) et de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, bleu) en a) champ large (cellules HeLa) et en b) confocal (cellules HepG2). Barre d'échelle : 10 μm .^[10]

La microscopie à épi-fluorescence est une microscopie optique en champ large dont la lumière excitatrice passe par le même objectif qui permet de focaliser sur l'objet qui émet par fluorescence. Il est caractérisé par la présence d'un miroir dichroïque qui filtre spécifiquement la longueur d'onde permettant la transmission de la fluorescence à l'oculaire ou à un détecteur, et donc supprime la longueur d'onde d'excitation. Le principe du microscope à épi-fluorescence est détaillée plus loin dans ce chapitre, dans la partie II.3.2 sur le montage pour la microscopie en PL et en ECL-. Ce dispositif génère une image avec un contraste élevé (**Figure 2.1.a**) mais le rapport du signal sur bruit (« signal to noise ratio » ou SNR) de l'image n'est pas optimal car la fluorescence hors du plan focal génère un bruit de fond et donc nécessite un traitement de l'image par la suite. Ce problème peut être pallié par l'utilisation d'un microscope confocal à balayage laser qui permet d'obtenir des images de meilleure qualité avec de très faible profondeur de champ, comme on peut le comparer sur la **Figure 2.1.b**. Le SNR en microscopie confocale est donc plus élevé qu'en microscopie à épi-fluorescence. Pourtant, cette méthode est moins sensible à la fluorescence et, étant une technique à balayage, l'acquisition est plus longue et n'est pas adaptée lorsque l'échantillon n'est pas stable ou pour imager des événements fugaces. En plus du SNR, l'image est aussi caractérisée par la limite de résolution d du microscope, autrement dit la plus petite distance en dessous de laquelle deux points ne sont plus distingués. En microscopie optique, la résolution est limitée par la diffraction de la lumière car elle agit sur la taille et la forme du point.^[11] Plus précisément, le point lumineux n'est pas ponctuel et sa taille dépend de la diffusion de la lumière appelée tache d'Airy qui varie selon la longueur d'onde d'émission λ_{em} , ainsi que de la propagation de la lumière qui est liée à l'ouverture numérique ON de l'objectif utilisé. La résolution d peut alors être simplement exprimée à partir de la longueur d'onde λ_{em} et de l'ON tel que :

$$d = \frac{\lambda_{em}}{2 \times ON} \quad (2.1)$$

Les principaux enjeux de la bio-imagerie sont l'augmentation du SNR et l'amélioration de la résolution spatiale pour augmenter la sensibilité de l'imagerie et ainsi détecter plus d'objets et mieux comprendre ce qui est observé. Cependant, la résolution des microscopes optiques est limitée aux

effets de la diffraction de la lumière et ne permet pas d'aller en dessous d'environ 200 nm (la longueur d'onde λ_{em} minimum du visible étant d'environ 400 nm et les objectifs les plus performant allant jusqu'à une ON de 1,4) . D'autres méthodes d'imageries plus complexes ont alors été développées pour atteindre une résolution sub-micrométrique voire nanométrique. Parmi elles, les plus connues sont la microscopie par déplétion par émission stimulée (« stimulated-emission-depletion » ou STED) et la microscopie par localisation photoactivée (« photo-activated localization microscopy » ou PALM).^[12] La STED a permis d'augmenter la résolution jusqu'à 2,4 nm en diminuant la taille du spot d'excitation^[13]. Pour cela, les fluorophores périphériques au point focal sont éteint par l'émission stimulée, c'est-à-dire qu'un photon illumine ce fluorophore périphérique déjà excité provoquant son retour à l'état fondamental avec l'émission d'un photon de la même énergie, donc sans décalage de Stokes. La fluorescence par émission spontanée de photons, ayant une énergie inférieure aux photons par émission stimulée, peut alors être observée de manière sélective grâce aux filtres. Quant à la microscopie PALM, elle remplace le critère de séparation par un critère de localisation des molécules individuelles. Pour chaque acquisition, une fraction des molécules fluorescentes est localisée et l'accumulation des acquisitions permet la reconstitution d'une image super-résolue jusqu'à environ 20 nm.^[14] Ces résultats ont valu le prix Nobel de chimie en 2014 aux chercheurs E. Betzig, S. Hell et W. Moerner.^[15]

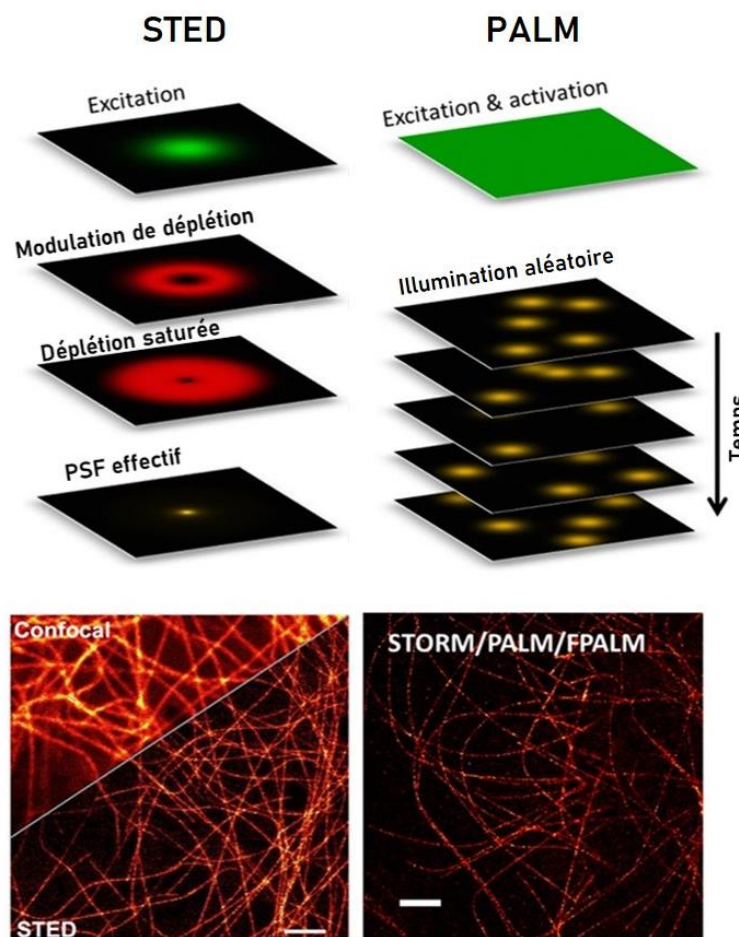


Figure 2.2 : Principe de super résolutions techniques dont la STED et la PALM et leur application pour imager des microtubules marqués par une protéine fluorescente au sein de cellules eucaryotes vivantes.^[12]

La microscopie basée sur la PL a ainsi une forte place dans les méthodes de recherche classiques et de la biologie. Cependant, l'utilisation de la PL impose certaines contraintes. Par exemple, la fluorescence secondaire nécessite des étapes de marquage qui peuvent être longues et altérer les fonctions de la cellule, et son analyse ne doit pas être confondue avec l'auto-fluorescence. Le problème majeur reste surtout l'extinction définitive de la fluorescence liée à l'irradiation : c'est le photoblanchiment. En principe, plus la puissance d'irradiation est élevée, plus la fluorescence est intense et meilleure est la qualité de l'image. Mais après un certain temps (variable selon le chromophore), l'intensité de fluorescence diminue irréversiblement par la baisse significative du rendement quantique ϕ après une longue exposition à la lumière ou sous une irradiation intense, entraînant alors la diminution du SNR de l'image. Par conséquent, l'imagerie par fluorescence peut être critique pour la détection de molécules en faibles quantités qui sont peu visibles.

L'imagerie par électrochimie peut être une alternative ou peut compléter l'imagerie par fluorescence. En effet, l'électrochimie ne requiert que l'application d'un potentiel pour générer un signal électrique qui peut être localisé et contrôlé dans le temps. Alors que l'objet est imagé par une variation d'intensité lumineuse en microscopie par fluorescence, l'objet est défini par une variation de courant en microscopie par électrochimie, à moins que cette dernière puisse également générer de la lumière.

II.2. État de l'art

II.2.1. Électrochimie en bio-imagerie

L'électrochimie est connue en analyse pour la quantification et la détection de molécules. Cependant, il est également possible de faire de l'imagerie à partir de mesures électrochimiques.

La microscopie électrochimique à balayage SECM (« Scanning Electrochemistry Microscopy ») et la microscopie à conductance ionique SICM (« Scanning Ion-Conductance Microscopy ») sont des techniques d'imagerie qui permettent notamment de visualiser des cellules *in vivo*, en temps réel, sans marquage ni lumière incidente qui pourrait endommager l'échantillon.^[16,17]

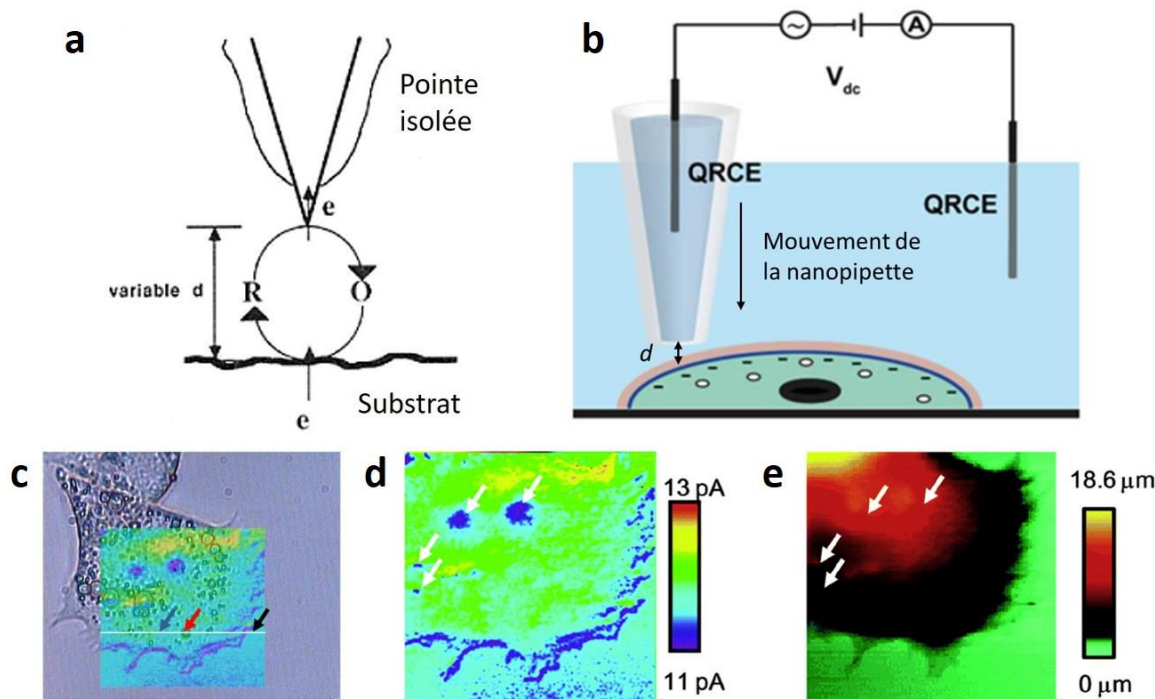


Figure 2.3 : Schémas de principe a) de la microscopie électrochimique par balayage (SECM)^[18] et b) de la microscopie à conductance ionique (SICM),^[19] les deux avec un espace d entre la pointe et le substrat. Comparaison d'images d'adipocytes fixés dans 0.5 mM de ferrocène méthanol ($FcCH_2OH$) à une concentration de 0,5 mM) et du PBS, capturées par c) optique et SECM–SICM, d) courant faradique SECM et par e) topographie SICM.^[20]

On peut considérer que la SECM fut développée initialement par les groupes de R. C. Engstrom et d'A. J. Bard.^[18,21,22] Cette technique permet d'examiner la topographie « chimique » d'une surface immergée dans une solution contenant un électrolyte. Pour cela, une micro- ou nano-électrode appelée ultra-micro-électrodes (UME) joue le rôle d'électrode-sonde pour enregistrer les processus électrochimiques à proximité de la surface de l'échantillon. La SECM peut être utilisée dans différents modes opératoires. La première est le mode « direct » où la pointe détecte l'électrogénération de produits au niveau du substrat. Elle est repérée par une variation de courant lorsque l'électrode est maintenue à potentiel constant ou par la modification de l'allure de la courbe en voltamétrie cyclique. Un deuxième mode opératoire connu est celui de la rétroaction. L'électrode est maintenue à un courant stationnaire et l'effet du substrat sur ce courant est mesuré : lorsque la sonde se rapproche d'un élément conducteur, elle détecte une augmentation du courant (rétroaction positive) et inversement lorsqu'elle balaye une zone isolante (rétroaction négative). Pendant l'acquisition de l'image par SECM, l'UME balaye le substrat et réalise une cartographie à l'échelle locale (micro-/nanométrique) de la topographie et de la réactivité des échantillons à partir de la mesure du courant faradique.^[23] Grâce à cette méthode, il est possible d'analyser des échantillons biologiques, tel que des cellules cancéreuses,^[24] en étudiant par exemple le transport d'ion dans les canaux cellulaires, ainsi que l'activité cellulaire et enzymatique.^[25,26] Le principe est schématisé à la **Figure 2.3.a**.

La méthode d'imagerie par SICM a aussi été adaptée pour l'imagerie de cellules vivantes.^[19,27] Également développée dans les années 90 par P. K. Hansma *et al.*,^[28] il est possible d'imager le substrat par topographie sans contact à l'aide d'une pipette remplie par un électrolyte avec une ouverture nanométrique. Le principe est schématisé à la **Figure 2.3.b**. Le courant ionique dans l'électrolyte, entre

l'intérieur et l'extérieur de la pipette, change en fonction de la distance entre la pointe de la nanopipette et la surface. Lorsque la sonde balaye la surface du substrat, un système de rétroaction, par modulation du voltage entre la sonde et une contre-électrode (CE), toutes deux des quasi références CE (QRCE), la soulève et l'abaisse pour maintenir le courant ionique stable. La distance entre le substrat et la sonde reste alors constante et le mouvement vertical de la sonde image la topographie du substrat.

Ces deux techniques sont cependant limitées par la résolution temporelle nécessaire pour balayer tout le substrat car ce sont des méthodes d'imagerie très localisées. De plus, la résolution dépend de la taille et de la forme de la sonde ainsi que de la sensibilité par le courant minimal pouvant être mesuré. L'ECL est une bonne alternative qui combine l'étude de la réactivité électrochimique de l'échantillon aux qualités d'imagerie en fluorescence. En effet, le transfert d'électron à la surface de l'électrode entraîne la réaction d'ECL qui génère un signal optique localisé sur le luminophore impliqué. L'ECL en microscopie permet d'apporter une imagerie globale sur tout l'échantillon déposé ou fixé à la surface de l'électrode. Plusieurs objets peuvent donc être imagés simultanément en quelques millisecondes ou secondes selon le temps d'exposition et l'activité chimique, et être suivis *in operando*.^[29] Cependant, l'imagerie ECL requiert la présence d'un luminophore et d'un co-réactif qui doivent pouvoir être à proximité de l'électrode, dans la couche ECL (de quelques μm d'épaisseur). Lorsque ces deux espèces peuvent transférer un électron à la surface de l'électrode, il s'agit d'un ECL suivant un processus homogène. Si seulement un seul de ces deux réactifs peut entrer en contact avec l'électrode, comme dans le cas des immunoessais, l'ECL est appelé hétérogène. Pour développer l'ECL pour des applications en microscopie et en imagerie d'entités biologiques, l'ajout de réactif ECL doit être bio-compatible et adapté au pH du milieu.

II.2.2. Développement de l'ECL dans la bio-imagerie

L'électrochimiluminescence (ECL) étant un phénomène d'émission de lumière localisée à la surface de l'électrode avec une excitation électrochimique initiale et une lecture optique,^[30] elle a permis d'imager pour la première fois l'hétérogénéité^[31] ainsi que les effets de bords d'une électrode.^[32] En parallèle, ses caractéristiques en ont fait une méthode d'analyse puissante, notamment pour le diagnostic clinique, avec environ 2 milliards d'immunodosages réalisés chaque année dans le monde.^[33,34] Cet intérêt pour l'ECL a permis une avancée importante dans le développement en tant que technique d'imagerie. De plus, la combinaison de l'imagerie ECL aux tests immunologiques a donné naissance à une nouvelle approche à partir de l'ECL hétérogène, c'est-à-dire la génération de lumière où seul le luminophore ou le co-réactif réagit électrochimiquement à la surface de l'électrode. À noter que dans cette configuration, il est plus intéressant d'utiliser un luminophore qui se régénère après chaque cycle ECL, c'est pourquoi le complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est préféré au luminol. Cette méthode a permis de visualiser des objets de taille micrométrique à la surface d'une électrode, tels que des empreintes digitales^[35] ou des billes de silicone^[36] sur lesquels des anticorps marqués au luminophore se fixent.

L'ECL a ensuite rapidement évolué vers une technique de microscopie.^[37] Une avancée importante fut la démonstration de la microscopie ECL confinée en surface de membranes cellulaires et de protéines marquées avec du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (**Figure 2.4**).^[38,39] Des marqueurs $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ modifiés

avec la streptavidine (SA@Ru) ont été attachés aux protéines biotinyliées de la membrane cellulaire. Dans un premier cas (**Figure 2.4.c-d**), la cellule n'a pas été perméabilisée et l'ECL est confinée autour de la cellule par la réaction de la TPrA avec le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Dans un deuxième cas, (**Figure 2.4.f,g**), la cellule a été perméabilisée, laissant la TPrA diffuser dans le cytoplasme et atteindre le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ fixé à la membrane depuis l'intérieur. Les images de la **Figure 2.4.d,g** mettent en évidence que l'ECL fournit des informations supplémentaires de la cellule au niveau de la surface de l'électrode. Depuis, une grande attention a été portée à l'imagerie de cellules uniques.^[40-42]

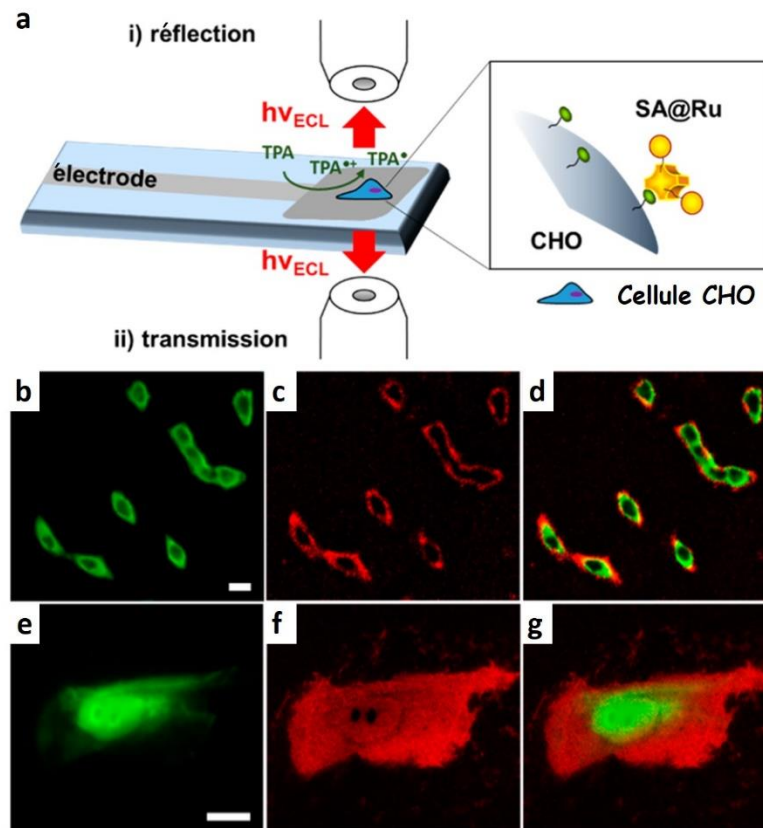


Figure 2.4 : a) Microscopie ECL confinée en surface de cellules marquées (i) en réflexion avec l'électrode en GC ou (ii) en transmission avec des électrodes transparentes imprimées à jet d'encre CNT. b), e) Images en PL (vert), c), f) ECL (rouge) et d) g) superposition des signaux lumineux (de gauche à droite) de cellules CHO cultivées sur des électrodes en GC et marquées par SA@Ru b), c), d) sans perméabilisation ou e), f), g) avec perméabilisation de la membrane cytoplasmique. L'ECL est générée dans une solution de PBS contenant de la TPrA à une concentration de 100 mM (pH = 7,4). Barre d'échelle : 20 μm .^[39]

Contrairement à la PL, l'ECL n'a besoin d'aucune source de lumière pour l'excitation du luminophore. Les images sont capturées dans l'obscurité totale et le fond optique correspondant est extrêmement faible, offrant un SNR élevé. En s'affranchissant de l'irradiation par un laser rapide et de grande puissance, cela élimine également les problèmes inhérents associés tels que le photoblanchiment, le photo-clignotement, la lumière dispersée de fond, la phototoxicité cellulaire ou l'autofluorescence des échantillons. Grâce à l'électrochimie, il est possible de contrôler le signal dans le temps mais aussi dans l'espace sur l'électrode.

Une limitation importante du développement de l'ECL en imagerie peut être le problème de répétabilité de l'ECL avec la perte importante de l'intensité ECL lors de la capture d'images successives

à cause de la passivation de l'électrode par la TPrA. Un protocole a pu être mis en place pour y remédier et régénérer l'intensité initiale de l'ECL.^[43] Les méthodes d'imagerie par ECL hétérogène présentées ici nécessitent également de marquer l'objet avec un luminophore, ce qui allonge les étapes de préparations de l'échantillon et peut modifier l'objet. C'est pourquoi l'imagerie par ECL sans marquage telle que l'ECL négatif (ECL-) a un fort potentiel en bio-imagerie.

II.2.3. Mise en place de l'ECL-

Jusqu'ici, les méthodes de microscopies ECL évoquées impliquent une visualisation directe de la cellule qui est marquée par un luminophore pour émettre un signal lumineux : c'est de l'« ECL positif » (**Figure 2.5.a**). Dans ce cas, le mécanisme ECL est hétérogène et le co-réactif ou le luminophore est présent seul dans l'électrolyte, et la cellule est marquée (naturellement ou par traitement) par le luminophore ou le co-réactif respectivement. C'est l'oxydation, ou la réduction, de la molécule en libre diffusion qui entraîne la réaction redox du luminophore ou du co-réactif sur la cellule pour ensuite générer de l'ECL. Dans le schéma a de la **Figure 2.5**, c'est la TPrA en libre diffusion qui entraîne la réduction du luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ fixé à l'objet. Cette méthode est appelée « ECL positif » car la cellule apparaît luminescence sur un fond sombre.

Une méthode alternative permet de s'affranchir de ce marquage : l'« ECL négatif » ou l'ECL-. Dans ce cas, la cellule préalablement fixée à la surface de l'électrode est directement immergée dans l'électrolyte où le luminophore et le co-réactif diffusent librement. De cette manière, la membrane cytoplasmique bloque localement la diffusion des réactifs ECL ainsi que le transfert d'électron à la surface de l'électrode. L'ECL- se caractérise donc par une diminution locale d'émission de lumière ECL, à l'inverse de l'ECL direct. Le concept de l'ECL- qui sera appliqué pour les travaux de recherche est schématisé dans la **Figure 2.5.b** ci-dessous.

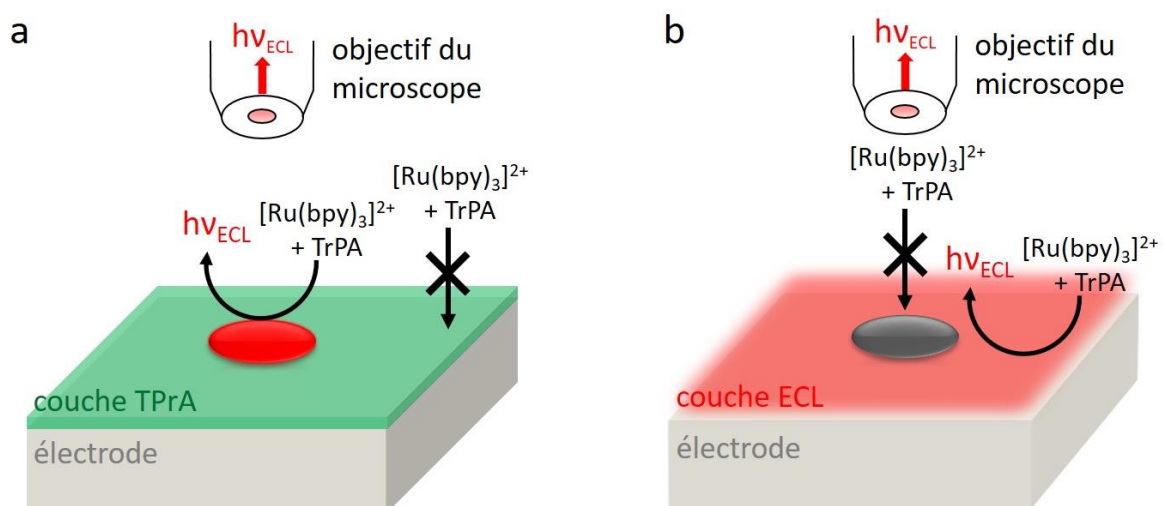


Figure 2.5 : Schéma de la microscopie a) ECL positif d'un objet luminescent et b) ECL- d'un objet qui bloque la diffusion des réactifs ECL ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et TPrA) à la surface de l'électrode.

Conceptuellement, il existe certaines similitudes entre cette approche ECL- et certaines techniques de microscopie sans marquage basées sur la fluorescence, telles que l'imagerie par ombre

à super-résolution («super-resolution shadow imaging » ou SUSHI) ou certaines variantes de la microscopie STED, dans lesquelles le fluorophore en diffusion libre ne pénètre pas dans les membranes cellulaires.^[44–48] À noter qu'il existe également une autre méthode sans marquage en ECL basée sur les mesures de capacitance.^[49]

Les premières images par ECL- ont été capturées par le groupe de B. Su en 2012. Celles-ci représentent des empreintes digitales en mode négatif avec le système ECL $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$, représentées sur la **Figure 2.6**.^[50] Comparée à l'image en champ clair (**Figure 2.6.a**), l'empreinte par image ECL (**Figure 2.6.b**) affiche un motif spatial clairement résolu sur lequel les crêtes sombres contrastent avec le fond plus clair généré par l'ECL.

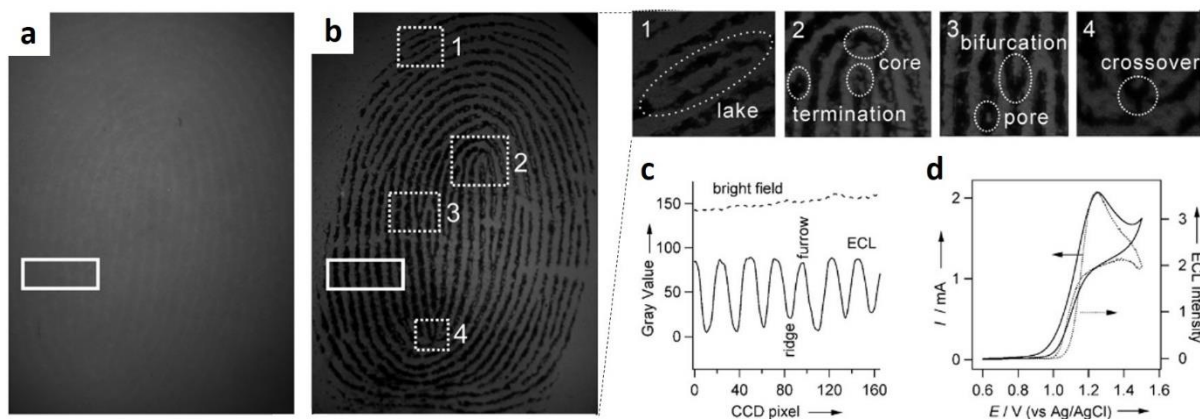


Figure 2.6 : Image d'empreinte digitale sur une électrode d'ITO (« Indium Tin Oxyde » ou oxyde d'indium-étain) a) en champ clair et b) en ECL en mode négatif dans une solution contenant du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à une concentration de 0,5 mM avec de la TPrA à une concentration de 50 mM dans du PBS à une concentration de 0,01 M (pH à 7,4) et en appliquant un potentiel à +1,13 V. c) Valeurs de gris transversales sur sept crêtes parallèles, comme indiqué par les rectangles blancs en a) et b). d) Voltammétrie cyclique et émission ECL correspondantes et enregistrées simultanément à une vitesse de balayage de 50 mV s^{-1} .^[50]

Ce même groupe a imagé par la suite des cellules en ECL- mettant en évidence les adhésions cellule-matrice et les jonctions cellule-cellule à la surface de l'électrode.^[51] Ces travaux ont prouvé que l'ECL- permet de focaliser l'imagerie de cellule unique au niveau du contact avec la surface de l'électrode. En effet, elle définit avec une meilleure précision la forme de la cellule et ses points d'attaches, apportant une nouvelle information qui peut être complémentaire à la PL (**Figure 2.7**). Ces résultats furent particulièrement pertinents pour les travaux de thèse présentés sur l'ECL-. Pour aller plus loin, le groupe de B. Su a étudié par ECL- la variation des adhésions cellule-matrice dans différents micro-environnements chimiques.^[52] Le groupe a également pu moduler l'épaisseur de la couche ECL en jouant sur les concentrations de luminophore et/ou de co-réactif et apporter une troisième dimension à l'imagerie ECL.^[53] En effet, la variation de l'épaisseur de la couche ECL implique un changement visible de la diffusion des réactifs ECL sur le volume de la cellule. Par exemple, l'adhésion des cellules à la surface de l'électrode ou la jonction entre les cellules sont visibles par ECL- lorsque la couche ECL est respectivement plus fine ou plus épaisse.

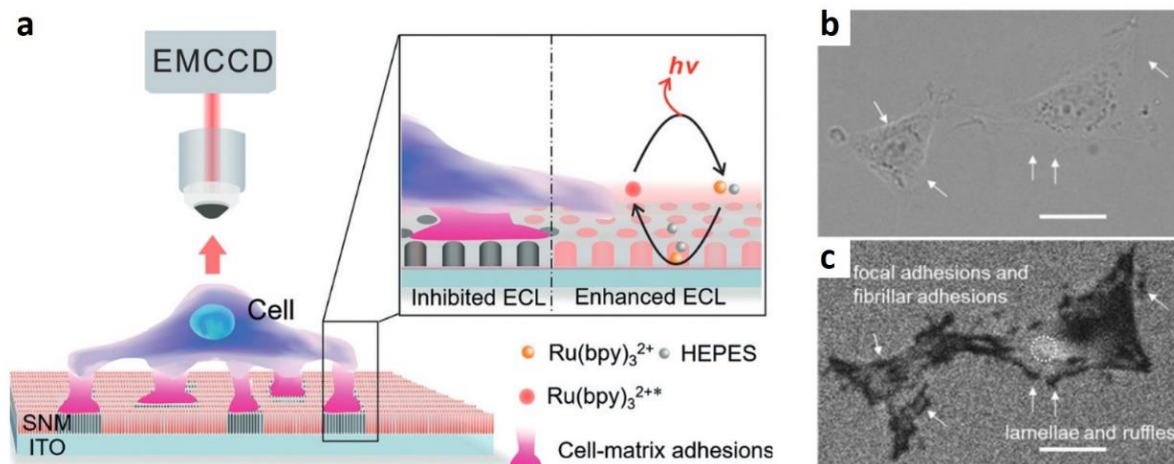


Figure 2.7 : a) Schéma d'imagerie par microscopie ECL de l'adhésion cellule-matrice à la surface d'une électrode d'oxyde d'étain indium recouverte par une membrane de nano-canaux de silice (« silica nanochannel membrane/indium tin oxide » ou SNM/ITO). Image de cellule vivantes PC12 en b) champ clair et en ECL négatif dans une solution contenant du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à une concentration de $50 \mu M$ avec de l'acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(2-éthane sulfonique) (HEPES) à une concentration de $20 mM$ dans une solution de PBS à une concentration de $0,01 M$ (pH à $7,4$). Barre d'échelle : $20 \mu m$.^[51]

C. Zhang *et al.* ont également décrit la caractérisation morphologique de cellules vivantes à la surface d'une électrode par imagerie ECL-.^[54] Une autre étude qui a aussi été publiée par J. Feng *et al.* pendant mes travaux de thèse fut l'imagerie en ECL- à l'échelle du photon unique émis par une réaction ECL individuelle impliquant le luminophore $[Ru(bpy)_3]^{2+}$.^[55] Ici, la dilution des événements ECL stochastiques discrets dans l'espace et le temps a permis d'isoler et d'imager individuellement les photons générés à l'aide d'un détecteur à photon unique. Grâce à ces travaux, l'imagerie ECL- peut atteindre un niveau de super-résolution à l'échelle de la molécule.

II.3. Étude de la sensibilité de l'ECL- appliquée à la bio-imagerie

II.3.1. Objectifs

L'objectif de ce chapitre de thèse est de principalement repousser les limites de l'imagerie par ECL- avec le système $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ /TPRA.

Dans un premier temps, il s'agit d'observer par ECL- de plus petites entités (de l'ordre du μm) telles que les structures subcellulaires comme la mitochondrie. Cette méthode d'imagerie serait avantageuse pour observer cet organite qui joue le rôle de « centrale énergétique » de la cellule. En effet, les méthodes de marquage en PL peuvent altérer ses fonctions et l'étude de sa morphologie par ombre chinoise par ECL- pourrait être adaptée pour témoigner de son activité.

Dans un second temps, ce travail aborde la question de la concentration minimale en luminophore $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ requise pour imager des entités uniques par ECL-. Cette fois-ci, ce sont des cellules d'ovaire de hamster chinois de mammifères (« Chinese ovary cells », CHO) qui sont imagées

car elles ont une plus grande surface offrant une meilleure résolution de l'objet. Des tests sont également effectués pour observer les mitochondries à très faible concentrations en luminophore.

Ces études feront intervenir la microscopie PL qui jouera le rôle d'imagerie de référence par rapport à l'imagerie ECL-, comme dans les précédents travaux.^[39,56] En effet, ces méthodes sont similaires en termes de traitement de signal optique mais aussi de montage au microscope.

II.3.2. Montage pour la microscopie en PL et en ECL-

Les images en PL et par ECL- sont enregistrées avec un microscope à épi-fluorescence inversé. Initialement destiné à l'imagerie par PL, il a été adapté pour également réaliser l'imagerie ECL.

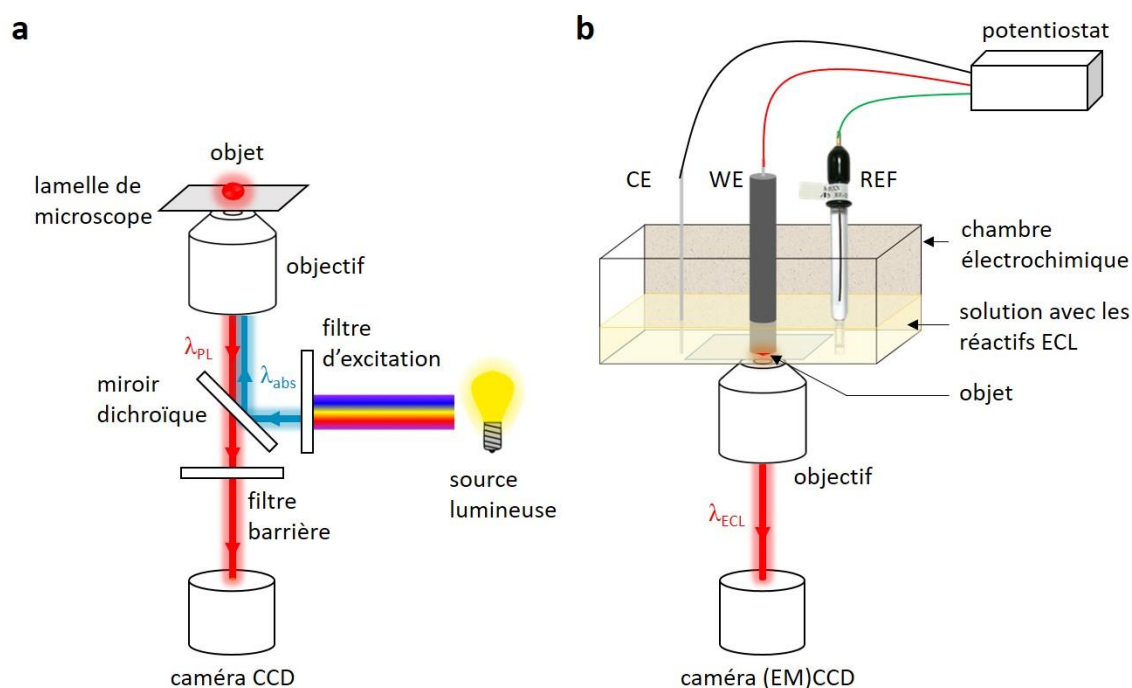


Figure 2.8 : Schéma d'un microscope à épi-fluorescence inversé avec une utilisation pour de l'imagerie a) en PL et b) en ECL-.

Le microscope à épi-fluorescence en PL collecte un signal optique généré par l'objet. L'imagerie en PL repose sur l'excitation d'un chromophore, fixé sur l'objet (marqueur fluorescent) ou naturellement présent (autofluorescence), à une longueur d'onde λ_{abs} , qui émet alors une lumière à une autre longueur d'onde λ_{PL} capturée par l'oculaire, ou ici par la caméra. Ce microscope est caractérisé par la présence de filtres et d'un miroir dichroïque (**Figure 2.8.a**). Tout d'abord, le filtre d'excitation permet de sélectionner la longueur d'onde λ_{abs} qui sera absorbée par l'objet. Lorsque l'objet sous excitation lumineuse émet une lumière à une longueur d'onde λ_{PL} , le miroir dichroïque (DM) réfléchit la lumière à la longueur d'onde λ_{abs} et ne laisse passer que la lumière émise à la longueur d'onde λ_{PL} ($\lambda_{abs} < \lambda_{DM} < \lambda_{PL}$) pour ne traiter que cette dernière par la caméra. De plus, un filtre barrière supprime les longueurs d'ondes inférieures à λ_{PL} pour minimiser le bruit de fond éventuellement créé par la lumière d'excitation, et donc obtenir un meilleur rapport SNR. L'image émise est enregistrée par

une caméra CCD. Une caméra transforme l'image optique en une image numérique par la conversion des photons en électrons, *i.e.* par l'effet photo-électrique.

Lorsque le microscope est utilisé pour l'imagerie ECL (**Figure 2.8.b**), il n'y a plus besoin de filtres ni de miroir dichroïque car il n'y a plus de lumière incidente λ_{abs} et donc il n'y a plus de bruit de fond généré. Cependant, l'intensité du signal par ECL est plus faible que celui en PL et nécessite parfois une caméra en mode EMCCD, c'est-à-dire la caméra CCD en mode de multiplication électronique (EM). La caméra CCD est une puce en semi-conducteur qui capte la lumière et la convertit en signal électrique pour fournir les données de pixels numériques qui forment une image. Cependant, les niveaux de signal très bas chutent généralement en dessous du bruit de fond, ce qui limite leurs capacités d'imagerie lorsque la luminosité est extrêmement faible. L'EMCCD permet d'amplifier les signaux de faible luminosité au-dessus du bruit par multiplication des e^- , sans augmenter le bruit de fond, et donc de détecter une lumière faible, ce qui est parfaitement adapté pour l'ECL.

D'après le calcul de la limite de résolution (**Équation 2.1**), plus la longueur d'onde d'illumination λ_{em} est faible, plus d diminue et meilleure est la résolution. L'objectif utilisé dans ces travaux ayant une ON de 1,2, la résolution d de l'image par ECL du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ est donc calculée et on obtient une valeur de 258 nm. Cependant, cette définition correspond à la résolution de la caméra qui est de 253 nm/pixels avec l'objectif utilisé à immersion dans l'eau avec grossissement 63x. Autrement dit, il n'est pas possible à l'image de distinguer une distance inférieure à 253 nm par un pixel.

La réaction d'ECL est contrôlée par un potentiostat et est produite dans une chambre électrochimique avec une configuration à 3 électrodes : l'électrode de travail (« working electrode » ou WE), la CE et l'électrode de référence (« reference electrode » ou REF) (**Figure 2.8.b**). La référence utilisée est une électrode au chlorure d'argent notée Ag/AgCl. La chambre électrochimique a été conçue pour être adaptée au microscope inverse avec une lamelle de microscope au fond. Ainsi, il est possible de voir par-dessous la surface de la WE sur laquelle sont déposés les objets à imager en ECL- mais aussi, à travers l'objectif, d'irradier cette surface avec la longueur d'onde d'excitation pour l'imagerie en PL décrite précédemment.

II.3.3. Application de l'ECL- pour l'observation d'organites : les mitochondries

II.3.3.1. Introduction

La mitochondrie est probablement l'organite le plus connu de la cellule eucaryote. En effet, elle joue le rôle de « centrale énergétique » en contribuant à la production d'adénosine triphosphate (ATP) cellulaire. Dans l'objectif d'établir un lien entre les études physio-pathologiques avec la structure-fonction de la mitochondrie, l'imagerie mitochondriale se développe de manière importante depuis les deux dernières décennies. L'objectif est d'abord d'imager l'évolution du réseau mitochondrial, sa désorganisation en corrélation avec les défauts génétiques ou les processus cancérigènes, la forme de la mitochondrie, etc.^[57] L'évolution récente des capteurs moléculaires ainsi que l'amélioration des techniques d'imagerie ont permis le suivi de mitochondries isolées.^[58-60] Ces approches permettent d'abord d'évaluer l'envergure des activités individuelles au sein de la population mitochondriale, de prouver l'existence d'une sous-population et de mieux étudier les

événements dynamiques sur chaque mitochondrie. Des exemples marquants furent l'observation de la variation du potentiel membranaire pouvant participer aux dysfonctions physio-pathologiques comme les maladies cardiaques ou des cancers.^[61,62] Par conséquent, un réel besoin existe pour le développement de la méthode de bio-imagerie à l'échelle de la mitochondrie individuelle.^[63-66] Jusqu'ici, la microscopie ECL restait limitée à l'échelle cellulaire et l'imagerie d'organites subcellulaires n'a pas été reportée.^[38-42,49,51,54,56,67,68]

L'étude réalisée dans ce chapitre repose sur l'imagerie de mitochondries individuelles vivantes par microscopie ECL-, c'est-à-dire de l'ECL sans marquage. La composition membranaire de la mitochondrie et ses propriétés de perméabilité diffèrent de la membrane plasmique cellulaire. En effet, les marqueurs de la mitochondrie sont des colorants fluorescents chargés positivement tels que les dérivés de la rhodamine ou bien les marqueurs MitoTracker. Ceux-ci restent dans l'espace matriciel de la mitochondrie due à l'importante différence de potentiel à travers la membrane interne, mais sont aussi libérées dès que la mitochondrie perd sa polarisation, notamment lors de la phosphorylation oxydative. Il existe également une autre catégorie de marqueurs qui réagit chimiquement avec le groupe thiol de la matrice mitochondriale offrant un marquage permanent, même si la mitochondrie n'est plus active. Cependant, ces marqueurs peuvent interférer avec le métabolisme et la respiration mitochondriale.^[69,70] Par conséquent, une méthode sans marquage est particulièrement bien adaptée pour visualiser des mitochondries actives.^[71,72] Ces travaux décrivent l'application de l'ECL- pour imager sans marquage et par contraste optique les mitochondries isolées de levures *Saccharomyces cerevisiae*.

L'imagerie par ECL- consiste à laisser le luminophore $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en diffusion libre dans l'électrolyte en présence du co-réactif sacrificiel TPrA pour permettre de visualiser chacune des mitochondries déposées sur la surface de l'électrode. La diffusion des réactifs ECL est bloquée par chaque mitochondrie et entraîne une réduction localisée de l'émission de lumière. À noter que la couche ECL est confinée au voisinage de la surface de l'électrode et que son épaisseur est comparable à la taille des mitochondries. La localisation des mitochondries par imagerie ECL- est ensuite comparée à celle par la fluorescence du marqueur spécifique MitoTracker Deep Red^[73,74] et par l'autofluorescence du NADH mitochondrial.

La microscopie par ECL- permet ainsi de minimiser les interférences avec le métabolisme mitochondrial ou le potentiel membranaire en évitant toute fonctionnalisation de surface ou tout prétraitement pouvant être à l'origine de la formation de liaison de covalente ou d'adsorption irréversible.^[59,75] En effet, les mitochondries sont des organites spécifiques dont la structure membranaire diffère de la membrane plasmique cellulaire par la présence d'une double membrane comprenant une teneur élevée en protéines et des phospholipides spécifiques. Les complexes redox de la chaîne respiratoire sont intégrés dans la membrane interne, générant un potentiel membranaire qui permet à l'enzyme ATP synthase de produire les molécules d'ATP.

II.3.3.2. Résultats et discussions

II.3.3.2.1. Protocole expérimental

Pour réaliser l'imagerie de mitochondries par ECL-, une suspension de mitochondries isolées et préparées au laboratoire CBMN de Bordeaux est d'abord déposée à la surface d'une électrode en GC qui joue le rôle de WE. Les mitochondries sont immobilisées à la surface de l'électrode (**Figure 2.9.a**) par interactions hydrophiles pendant au moins 30 minutes, permettant leur visualisation précise par ECL et fluorescence. L'émission ECL est générée à la surface de l'électrode en imposant un potentiel de 1,45 V vs. Ag/AgCl/KCl 3 M (tous les potentiels de ce travail sont rapportés par rapport à cette électrode de référence) ; celle-ci étant plongée dans une solution de PBS contenant les réactifs ECL, *i.e.* $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et TPrA, libres en solution. Ce potentiel anodique est suffisamment élevé pour oxyder les deux réactifs et générer une émission ECL.

II.3.3.2.2. Premières images de microscopie ECL- des mitochondries isolées

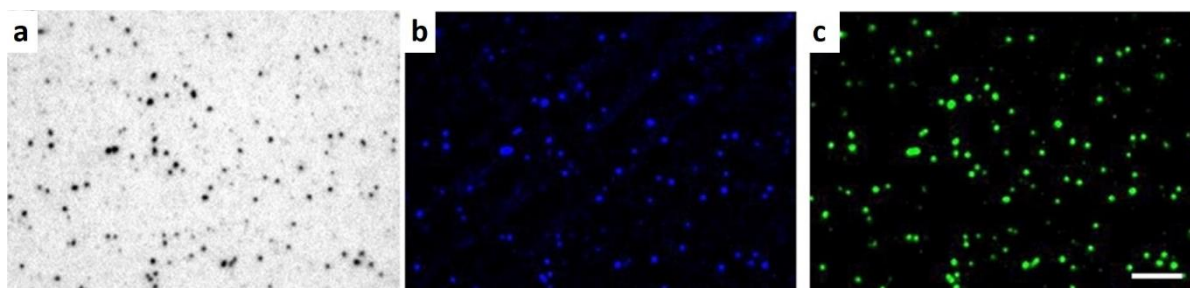


Figure 2.9 : Image de mitochondries déposées sur une électrode en GC obtenue par a) ECL- en appliquant 1,45 V, b) auto-fluorescence du NADH et c) fluorescence du marqueur MitoTracker Deep Red, dans une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à une concentration de 30 μM avec de la TPrA à une concentration de 100 mM dans une solution de PBS concentré à 0,65 M (pH à 7,4). Barre d'échelle : 10 μm .^[76]

La **Figure 2.9** montre une image ECL typique enregistrée par une caméra CCD ($t_{\text{expo}} = 200$ ms) de mitochondries uniques déposées sur l'électrode GC (**Figure 2.8**). Le fond blanc signifie que la surface entière de l'électrode a généré de la lumière ECL, sauf au niveau des taches sombres qui correspondent aux mitochondries (**Figure 2.9.a**). En effet, les mitochondries gênent localement la diffusion des réactifs ECL vers la surface de l'électrode et bloquent ainsi les premières réactions électrochimiques qui conduisent à l'émission ECL. Le fait que les mitochondries paraissent plus foncées que la surface nue de l'électrode de GC montre que les réactifs ECL ne peuvent pas diffuser à travers les mitochondries, comme déjà décrit pour les cellules précédemment.^[38,39,51,54] D'une part, cet obstacle à la diffusion n'est pas surprenant compte tenu du fait que ces entités sont entourées à la fois de membranes internes et externes. D'autre part, en raison des réactions de la chaîne respiratoire et du potentiel électrochimique transmembranaire qui en résulte, la membrane mitochondriale interne est chargée négativement alors que le luminophore ECL est chargé positivement et une accumulation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ peut se produire.

Avant d'enregistrer les images par ECL- de la **Figure 2.9.a**, la même région d'intérêt (ROI) est capturée en fonction de la fluorescence du NADH intramitochondriale endogène (**Figure 2.9.b** en bleu)

et d'un marqueur exogène, le MitoTracker Deep Red (**Figure 2.9.c** en vert). Les images ECL- sont comparées aux images par la fluorescence de ces deux colorants modèles car : (i) ils sont classiquement utilisés pour imager et étudier les mitochondries ; (ii) ils sont spécifiques aux mitochondries ; (iii) ils sont complémentaires puisque le premier endogène reflète le métabolisme fonctionnel des mitochondries et le second colorant exogène reflète l'existence du potentiel membranaire ; (iv) les images de fluorescence de ces deux colorants peuvent être enregistrées même en présence du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dissout. D'une part, le NADH est le substrat redox des enzymes NADH déshydrogénases internes, qui transfèrent des protons et des électrons à la chaîne respiratoire et alimentent la phosphorylation oxydative et, en tant que tel, renseignent sur l'état de la chaîne respiratoire. D'autre part, le MitoTracker Deep Red est une sonde fluorescente disponible dans le commerce qui marque les mitochondries en utilisant le potentiel de la membrane mitochondriale pour s'accumuler dans la matrice. En d'autres termes, les signaux de fluorescence du NADH et du MitoTracker Deep Red sont les signatures de l'efficacité de l'intégrité et de l'activité mitochondriales. Les temps d'exposition du CCD pour acquérir des images bien résolues sont respectivement de 5 s, 5 s et 0,2 s pour le NADH, le MitoTracker Deep Red et l'ECL-. Cette différence dans le temps d'exposition, c'est-à-dire plus long pour la fluorescence que pour l'ECL-, a également montré une sensibilité et un contraste optique remarquables obtenus par l'approche ECL-.

Comme déjà mentionné, les taches d'ECL- révèlent l'emplacement des mitochondries sur la surface de l'électrode. Sur la ROI présentée dans la **Figure 2.9.a**, 118 mitochondries uniques sont observables par ECL-. Sur la **Figure 2.9.b**, les points fluorescents de NADH montrent l'intégrité structurelle des mitochondries ainsi que leur activité métabolique. La distribution spatiale des points de visibles par la fluorescence du NADH (**Figure 2.9.b**) est similaire à celle par ECL- (**Figure 2.9.a**). Au total, 85 mitochondries sont visibles sur la **Figure 2.9.b** sur la base de l'autofluorescence du NADH. Les images de fluorescence enregistrées avec MitoTracker Deep Red sont très similaires aux images du NADH et par ECL-. Cela confirme que les taches sombres ECL correspondent aux mitochondries présentes à la surface de l'électrode. De plus, la fluorescence de MitoTracker Deep Red prouve que les mitochondries sont polarisées dans ces conditions expérimentales (**Figure 2.9.c**). Elles sont donc fonctionnelles.

II.3.3.2.3. ECL- possible *in vivo*

Pour aller plus loin dans l'analyse de la bio-compatibilité des conditions expérimentales avec les mitochondries, les niveaux de fluorescence du NADH et du MitoTracker Deep Red sont mesurés avant et après l'imagerie ECL-. Des niveaux similaires de fluorescence sont obtenus sur les mitochondries avant et après l'imagerie ECL- (images en bleu et en vert de la **Figure 2.10**). Cela indique que le potentiel appliqué de 1,45 V ou bien la présence de TPrA, qui est pourtant un agent chimique cancérigène, mutagène et reprotoxique (CMR), n'ont pas modifié le statut métabolique redox des mitochondries.

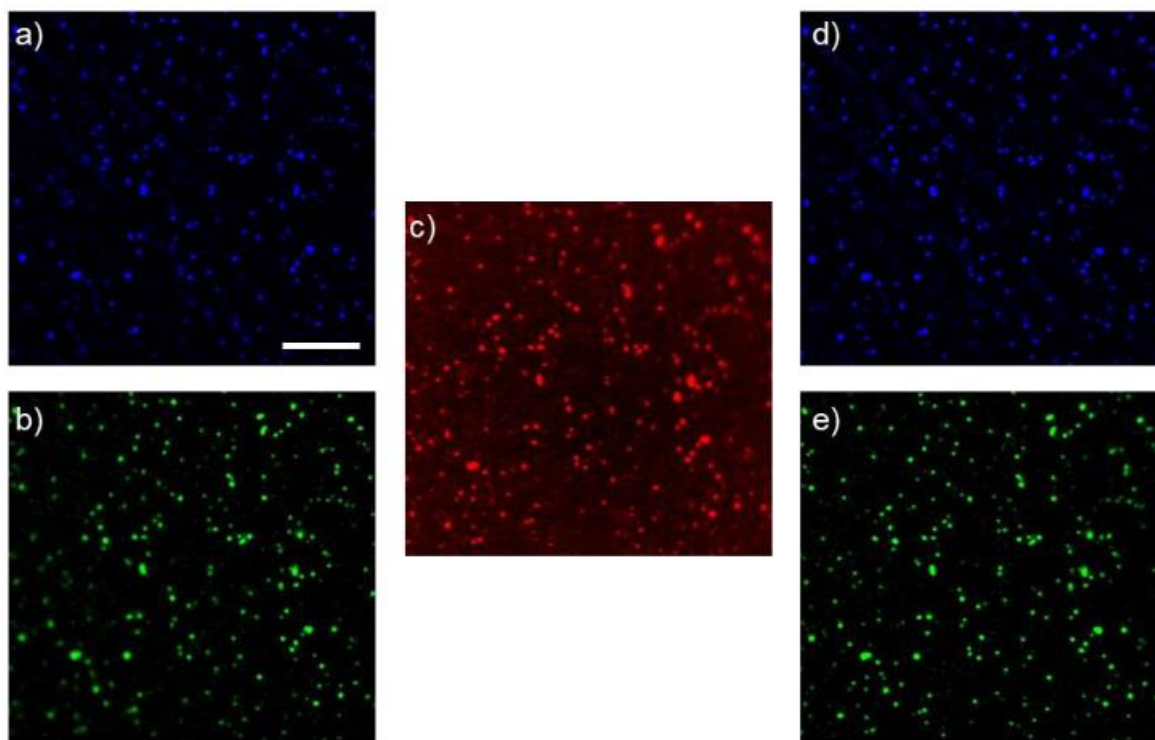


Figure 2.10 : Imagerie par a) fluorescence du NADH et b) du MitoTracker Deep Red des mitochondries déposées sur l'électrode en GC avant et après (d) et e), respectivement) l'expérience de microscopie ECL- (c). L'ECL- est générée en imposant un potentiel de 1,45 V dans une solution PBS contenant 30 μM $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et TPrA 100 mM (pH 7,4). L'image ECL- a été inversée pour apparaître comme en ECL direct. Toutes les images correspondent à la même région d'intérêt (ROI). Barre d'échelle : 20 μm .^[76]

II.3.3.2.4. Réaction ECL homogène

Le luminophore impliqué dans la réaction ECL est chargé positivement, il serait alors possible qu'il s'adsorbe à la surface des mitochondries. Or, il n'a pas été possible d'observer les mitochondries en PL du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en utilisant les filtres dichroïques adaptés. Cela indique que cet effet d'accumulation est négligeable. De plus, même si le luminophore ECL peut se concentrer au niveau de la membrane mitochondriale, il ne génère pas d'émission ECL notable à 1,45 V comme le démontrent les taches sombres. Pour approfondir ce point et le mécanisme ECL, les signaux voltamétriques et ECL sur GC sont enregistrés avec la même solution ECL dans **Figure 2.11.a**.

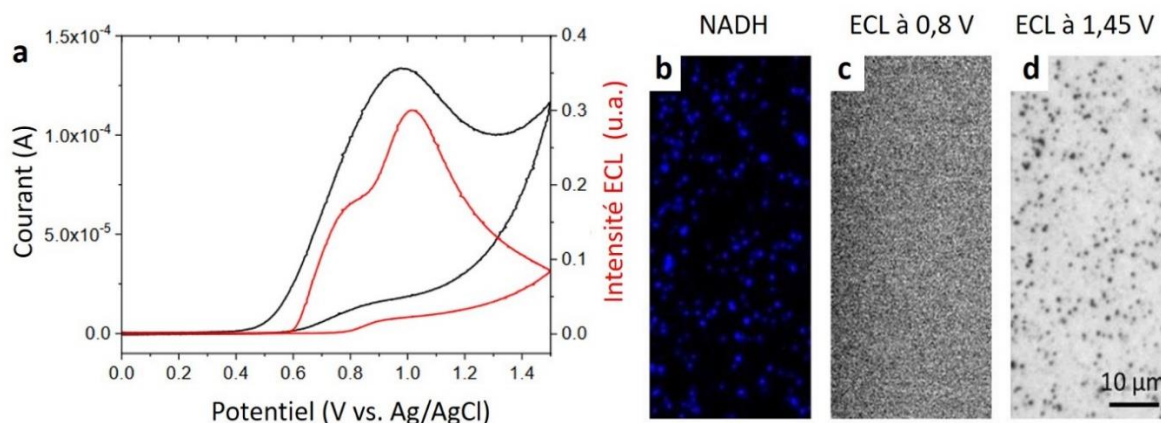


Figure 2.11 : a) CV (courbe noire) et signal ECL (courbe rouge) enregistrés avec une électrode en GC dans une solution PBS contenant du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à une concentration de $30 \mu M$ et de la TPrA à une concentration de 100 mM (vitesse de balayage : 50 mV s^{-1}). b) Fluorescence du NADH et c,d) images ECL- des mitochondries déposées sur une électrode en GC acquises lors de l'application d'un potentiel de c) $0,8 \text{ V}$ ou de d) $1,45 \text{ V}$. L'ECL a été généré dans les mêmes conditions et toutes les images présentent la même ROI.^[76]

La « vague ECL » la moins anodique est observée à des potentiels où seul la TPrA est oxydée à la surface de l'électrode (généralement à $0,8 \text{ V}$) et elle suit la voie mécanistique appelée voie du « faible potentiel d'oxydation ».^[77] La deuxième « vague ECL » anodique apparaît à un potentiel supérieur à $0,9 \text{ V}$ où le $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ est significativement oxydé (**Figure 2.11.a**). De plus, lorsqu'un potentiel de $0,8 \text{ V}$ a été imposé, aucune émission ECL (**Figure 2.11.c**) n'a été observée, contrairement au cas des billes décorées de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$.^[36,78] Cela démontre que le mécanisme d'ECL à « faible potentiel d'oxydation » ne contribue pas notablement au niveau des mitochondries en comparaison au(x) mécanisme(s) opérant sur la surface nue de l'électrode GC (voir ci-dessous) où l'ECL est beaucoup plus forte, même si le $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ pourrait s'accumuler au niveau de la membrane mitochondriale.

Il est important de noter que l'ombre n'est pas une projection de la structure des mitochondries à la surface de l'électrode par la lumière ECL au-dessus. Les taches sombres observées en microscopie ECL- reflètent uniquement le blocage local du flux de diffusion des réactifs ECL par les mitochondries. Conceptuellement, cette ombre de diffusion présente certaines similitudes avec le mode de rétroaction négative de la SECM effectuée sur des objets isolants tels que des cellules.^[26]

II.3.3.2.5. Comparaison des méthodes ECL- et PL : sensibilité de détection

Sur la **Figure 2.9.a**, il y a plus de mitochondries visibles par ECL- qu'en PL avec 118 mitochondries visibles par ECL- tandis que 85 et 115 par la fluorescence de NADH (**Figure 2.9.b**) et de MitoTracker Deep Red (**Figure 2.9.c**), respectivement. Ces différences peuvent s'expliquer par un contraste optique amélioré en ECL-. Afin de répondre au mieux à cette hypothèse, la qualité d'image de ECL- est comparée à la microscopie à fluorescence de NADH et de MitoTracker sur même ROI de la **Figure 2.9** à plus fort grossissement.

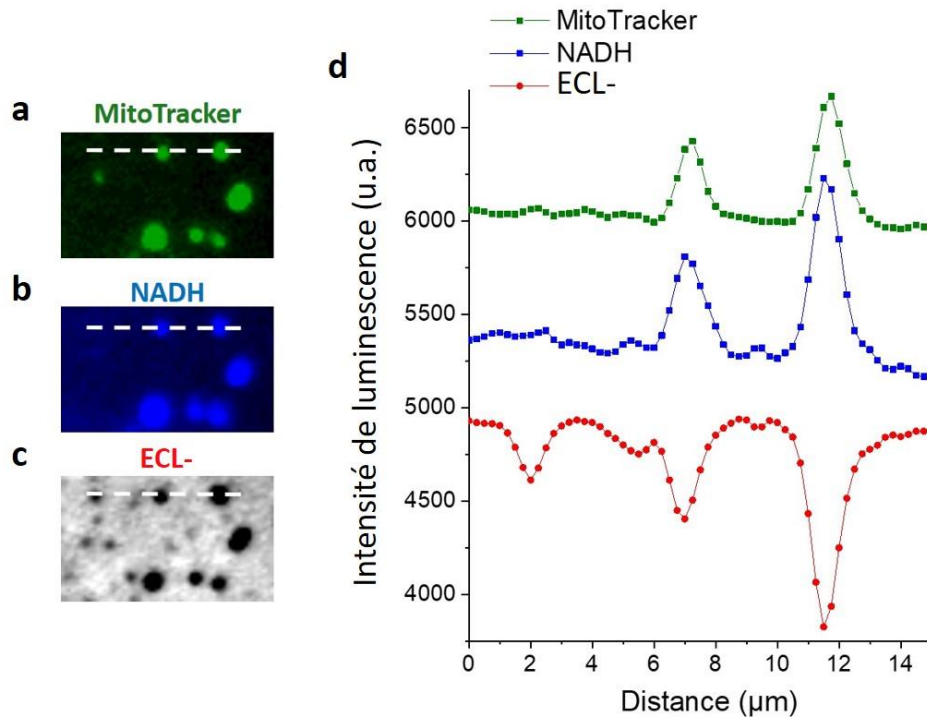


Figure 2.12 : Agrandissement des images a-b) en fluorescence et c) en ECL- sur la même région d'intérêt. d) Profils d'intensité correspondant suivant les lignes en pointillés blancs tracées sur les images.^[76]

En observant la ROI de la **Figure 2.12**, 7 mitochondries sont observées par la fluorescence du MitoTracker Deep Red et seulement 6 sont visibles par l'autofluorescence du NADH, correspondant principalement aux plus grosses mitochondries. Ces 7 entités sont facilement visibles par ECL-, mais 5 mitochondries plus petites sont également résolues. De manière cohérente, un profil d'intensité de luminescence peut être extrait le long de la ligne pointillée de la **Figure 2.12**. Les profils de fluorescence du NADH et du MitoTracker montrent deux pics tandis que le profil ECL- révèle un pic supplémentaire à 2,5 µm et un épaulement à 6 µm. Ces deux derniers ne sont visibles qu'en utilisant l'approche ECL-. Alors que les détails structuraux sont limités par la limite de diffraction optique conventionnelle, la microscopie ECL- produit des images nettes et riches en détails sur chaque mitochondrie (**Figure 2.12.c**). Cette étude comparative illustre la sensibilité de l'ECL- pour imager des petites mitochondries, difficilement détectables par la fluorescence du NADH et du MitoTracker.

II.3.3.2.6. Comparaison des méthodes ECL- et PL : distribution statistique de la taille des mitochondries

Les images obtenues par ECL- et par la fluorescence du NADH sont ensuite comparées suivant une analyse statistique de la distribution des tailles de mitochondries à partir de l'aire de la surface de leurs « ombres ».

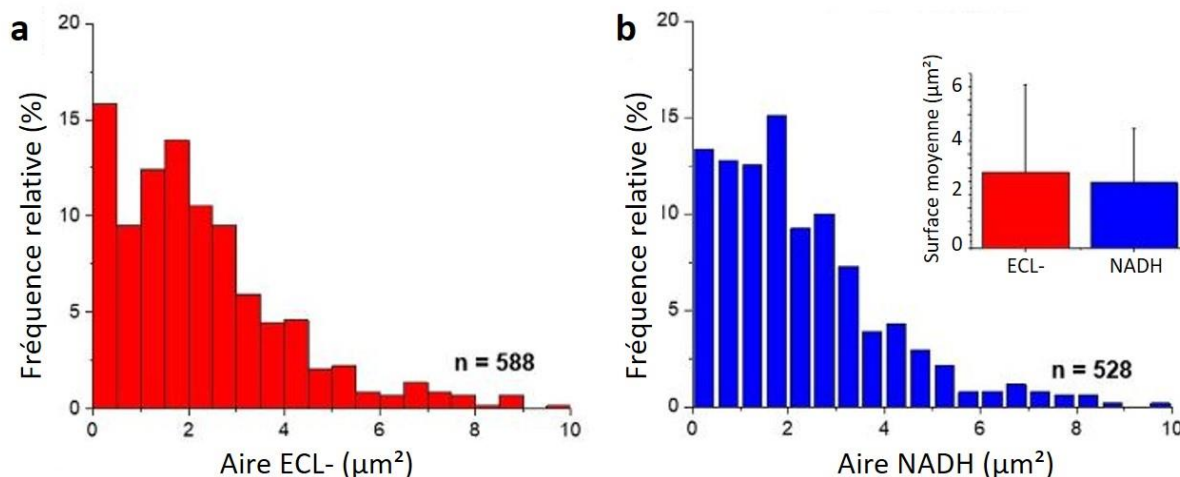


Figure 2.13 : Distribution statistique de la taille des spots de luminescence mesurées à partir des images en a) ECL- et en b) auto-fluorescence de la NADH.^[76]

Sur les mêmes ROI (4 expériences), 588 mitochondries fonctionnelles uniques sont analysées comparativement par ECL- et fluorescence. L'histogramme résultant des mesures effectuées sur les images ECL- est affiché sur la **Figure 2.13.a**. La distribution des tailles montre que la zone projetée de la majorité des mitochondries était inférieure à 2 μm^2 . Les valeurs moyennes de la surface des mitochondries sont de 2,5 μm^2 pour les images de fluorescence ECL- et NADH (encadré dans la **Figure 2.13**). Ces valeurs sont en bon accord avec la taille moyenne des mitochondries isolées, allant généralement de 0,4 à 1,8 μm de longueur ce qui équivaut à des surfaces comprises entre environ 0,5 et 6 μm^2 .^[75,79-81] Seulement 13 % des mitochondries d'une surface de 0,5 μm^2 sont observables par fluorescence NADH alors qu'elles représentent 16 % des objets détectés par ECL-. Cette petite différence entre l'imagerie par ECL- et par la fluorescence du NADH se reflète également dans le nombre total de mitochondries détectées dans la même ROI (588 et 528, respectivement). Cependant, l'hypothèse que certains des spots ECL- correspondent à des mitochondries non fonctionnelles n'est pas complètement exclue. Quoi qu'il en soit, cela confirme que les plus petites mitochondries sont mieux détectées par ECL-, comme mentionné précédemment. D'autre part, les mitochondries peuvent apparaître plus petites par ECL- que par fluorescence du NADH car les frontières des mitochondries peuvent ne pas complètement gêner la diffusion des réactifs ECL et donc ne pas complètement bloquer la génération locale d'ECL. Néanmoins, l'analyse de la distribution des tailles démontre que des mitochondries plus petites sont révélées et observées par l'ECL- par rapport à la fluorescence.

II.3.3.2.7. Corrélation entre intensité ECL- et surface des mitochondries

La microscopie ECL- est basée sur la gêne de la diffusion des réactifs ECL par la mitochondrie, qui peut être considérée comme une entité bloquant les réactions directes de transfert d'électrons de la surface de l'électrode vers les réactifs ECL. Il est donc intéressant d'étudier l'ampleur de la gêne de diffusion, donc la diminution de l'intensité ECL, en fonction de la taille des mitochondries. Pour cela, l'intensité de l'ECL mesurée au niveau de chaque « ombre » mitochondriale est tracée en fonction de sa surface projetée. Le graphique de la **Figure 2.14** illustre la corrélation entre l'intensité moyenne mesurée en ECL- et la surface de la mitochondrie correspondante.

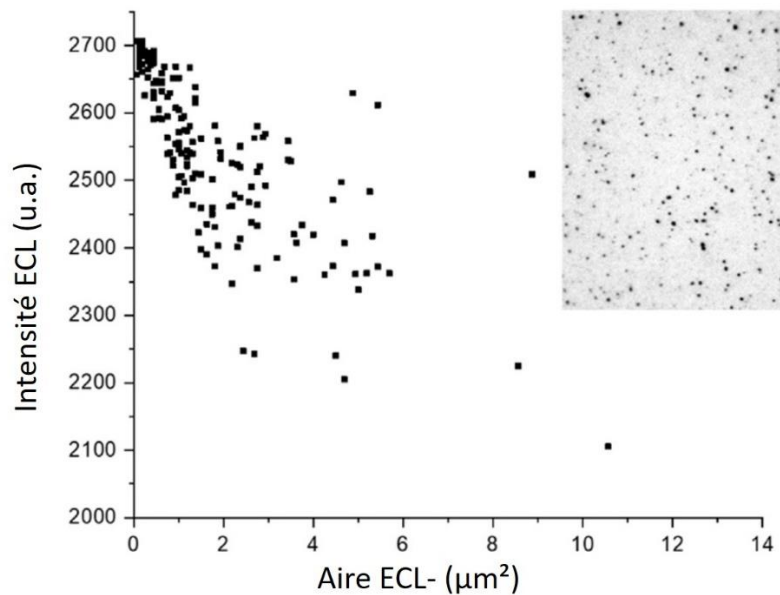


Figure 2.14 : Etude de la corrélation entre l'intensité ECL- et la surface projetée des mitochondries mesurées individuellement ($n = 171$). L'encadré montre l'image ECL- utilisée pour extraire les valeurs de l'intensité ECL- et la zone correspondante pour chaque mitochondrie.

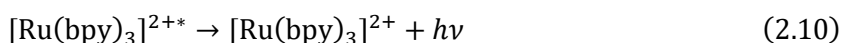
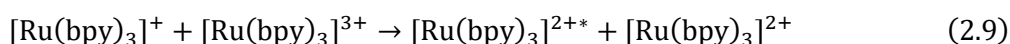
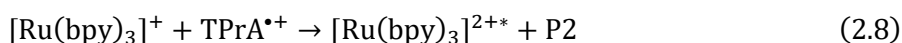
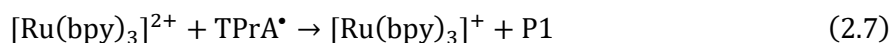
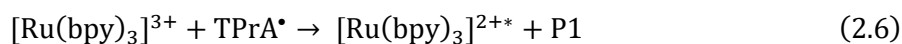
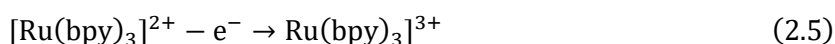
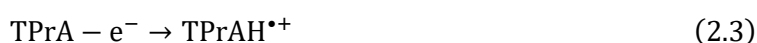
L'analyse statistique des 171 entités montre une tendance corrélant la diminution de l'intensité de l'ECL et la taille des mitochondries, *i.e.* la surface projetée. L'intensité de l'ECL mesurée localement à la surface nue du GC (c'est-à-dire la surface de l'électrode sans mitochondries) est de 3 000 u.a. Pour les mitochondries plus petites (de surface inférieure à $1 \mu\text{m}^2$), le signal ECL diminue à 2 700 u.a., ce qui représente une baisse de 10 % par rapport à la valeur initiale. Sur des mitochondries plus grosses, l'intensité de l'ECL diminue de manière monotone. Avec des mitochondries couvrant généralement une surface de $8 \mu\text{m}^2$ (éventuellement plusieurs entités agrégées), l'ECL chute à 2 200 u.a., soit une baisse d'environ 30 %. En d'autres termes, plus les mitochondries sont grandes, plus le flux de diffusion des deux réactifs ECL à la surface de l'électrode est entravé et plus le signal ECL mesuré localement est faible. Dans le cas présent, le fait que l'ECL n'ait pas été complètement supprimée au niveau des taches mitochondriales peut s'expliquer par deux facteurs principaux.

Le premier est lié à l'empêchement de diffusion des réactifs ECL. La forme oblongue des mitochondries peut ne pas complètement bloquer la surface de l'électrode, ce qui entraîne un signal ECL partiel. De plus, il se peut qu'il y ait un espace interstitiel entre la surface de l'électrode et la membrane externe des mitochondries dans lequel les réactifs ECL diffusent et génèrent localement un signal ECL faible. Par exemple, on sait que la membrane plasmique des cellules est séparée du substrat de 100 à 150 nm via la formation de liaisons matrices extracellulaires-intégrine-cytosquelette.^[82,83] Même si les mitochondries présentent des structures complètement différentes de celles des cellules de mammifères, l'existence de cet espace, qui ne peut pas être résolu avec les techniques de microscopie classiques, n'est pas exclue. Néanmoins, toutes les mitochondries sont visualisées dans le même plan focal à la surface de l'électrode et elles restent suffisamment immobiles pendant au moins 30 minutes en raison des faibles interactions avec la surface GC. Cela indique que cette probable distance interstitielle est extrêmement faible, même si elle peut affecter le signal ECL-.

La deuxième possibilité est liée à l'épaisseur de la couche émettrice d'ECL par rapport aux dimensions typiques de la mitochondrie ainsi qu'à la répartition de l'intensité de l'ECL dans cette couche réactive. Les expériences de ECL- sont réalisées avec 30 μM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en présence de TPrA en excès (soit 100 mM). Plusieurs voies mécanistiques compétitives peuvent se produire simultanément et entraîner la génération d'ECL à une certaine distance de la surface de l'électrode.^[77,84-87] L'épaisseur de la couche de réaction ECL dépend du matériau de l'électrode, des concentrations respectives de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de TPrA, du pH, du potentiel imposé, de l'hydrophilie de la surface de l'électrode, etc.^[88] Ce système ECL impliquant le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et la TPrA reste un domaine de recherche actif donc le mécanisme et la caractérisation suscitent des études plus approfondies.^[36,77,84,89-93]

II.3.3.2.8. Mécanisme ECL impliqué

Comme mentionné dans le premier chapitre (partie I.5.1.1.), plusieurs voies ECL sont à considérer : la voie à « faible potentiel d'oxydation », la voie « catalytique » et la voie par « oxydation directe ». Compte tenu des concentrations respectives en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et en TPrA, l'oxydation par catalyse homogène de la TPrA par le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ électrogénéré se produit lentement à des concentrations micromolaires (ici 30 μM), ce qui implique que la contribution de la voie « catalytique » est négligeable. A. J. Bard et ses collègues ont remarqué que cette voie jouait un rôle prédominant pour les concentrations en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ supérieures à environ 0,5 mM,^[94] bien au-dessus de la concentration utilisée ici. De plus, la voie par « oxydation directe » est devenue plus importante à des potentiels plus anodiques.^[94] Par conséquent, comme aucune émission ECL n'est observée à 0,8 V (**Figure 2.11**), c'est-à-dire par la voie à « faible potentiel d'oxydation », il est possible de conclure que la voie par « oxydation directe » prévaut dans nos conditions expérimentales. Cette voie ECL peut être décrite par le schéma réactionnel suivant :^[84,94,95]



avec les produits P1 et P2 qui sont des cations iminium ou des sous-produits similaires.^[77,84] L'oxydation du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de la TPrA se produit simultanément à la surface de l'électrode. Le radical $\text{TPA}^{\bullet+}$

électrogénéré se déprotonne et forme un radical fortement réducteur, la TPrA[•]. La réaction de transfert d'électrons entre la TPrA[•] et le [Ru(bpy)₃]³⁺ est très exergonique et peuple l'état excité, ce qui conduit à l'émission ECL.

II.3.3.2.9. Influence de l'épaisseur de la couche ECL sur l'imagerie

Le processus ECL confine la génération de l'état excité du luminophore [Ru(bpy)₃]²⁺ très proche de la surface de l'électrode. Récemment, B. Su *et al.* ont pu imager l'épaisseur de la couche ECL sur les électrodes à microtubes d'or.^[96] En présence de 25 mM de TPrA, l'intensité de l'ECL était la plus élevée à la surface de l'électrode, puis diminuait très rapidement, avec des valeurs expérimentales et simulées estimées pour l'ensemble de la couche d'ECL entre environ 1,5 et 4 μm, selon la concentration de [Ru(bpy)₃]²⁺. Cependant, la majorité du signal ECL provenait d'une distance inférieure à 1 μm de la surface de l'électrode. La spectroscopie d'auto-interférence ECL a également été utilisée par ce même groupe pour estimer l'épaisseur de la couche réactive ECL et, ils ont obtenu des valeurs comprises entre 350 nm et 1 μm, en fonction des conditions expérimentales.^[97] Le point central reste le confinement de la couche émettrice d'ECL à la surface de l'électrode. De plus, comme déjà mentionné, compte tenu des différentes voies mécanistiques, la contribution la plus importante à l'intensité globale de l'ECL provient principalement de la surface de l'électrode. Ces caractéristiques régissent le contraste optique négatif observé entre les mitochondries et la surface nue de l'électrode en ECL-. Autrement, la détection ECL- ne serait pas aussi sensible que ce qui est rapporté dans cette étude. En effet, la microscopie ECL- révèle de petites mitochondries qui sont difficilement détectables par les indicateurs de fluorescence utilisés ici. De plus, dans le cas d'une couche ECL beaucoup plus épaisse que les organites imagés, cela impliquerait que les frontières des mitochondries seraient moins définies qu'en fluorescence en raison de l'élargissement de la diffusion et du faible contraste optique. Cela ne correspond pas aux résultats observés expérimentalement, comme l'illustrent les profils d'intensité extraits des images de fluorescence ECL- et NADH. Les deux profils sont effectivement très similaires (**Figure 2.12**). D'ailleurs, une analyse approfondie des profils de luminescence a même montré que la largeur totale à mi-hauteur est plus petite en ECL- et que les bordures sont plus nettes par rapport à la fluorescence (**Figure 2.13.b**). Ce contraste optique net observé dans ECL- conforte le fait que la couche émettrice d'ECL est confinée à une distance micrométrique de la surface de l'électrode en raison du mécanisme d'« oxydation directe ».

II.3.3.3. Conclusion

Cette étude a permis de démontrer le potentiel de l'ECL- en tant que microscopie alternative pour imager des organites subcellulaires uniques. Cette approche sans marquage a permis de visualiser des mitochondries fonctionnelles avec un contraste optique négatif net, car le mécanisme du système ECL en tandem, [Ru(bpy)₃]²⁺/TPrA, confine la région émettrice d'ECL à la surface de l'électrode. L'analyse statistique de la colocalisation des taches d'ombre ECL avec le marqueur MitoTracker Deep Red et le biomarqueur endogène intramitochondrial NADH valide la méthodologie rapportée pour les organelles actives et intactes.

De plus, l'imagerie par ECL- a permis de détecter de petites mitochondries, qui restent très difficiles à observer par fluorescence avec les marqueurs mitochondriaux classiques. La sensibilité et le contraste optique net fournis par l'ECL- contribuent également à une meilleure compréhension des mécanismes de l'ECL et des conditions de fonctionnement de la microscopie ECL en biologie. En effet, cette approche confinée en surface peut également dévoiler des organites subcellulaires ou des entités non marquées et fournit un moyen sans marquage d'imager leur morphologie. Compte tenu des récents rapports sur la détection intracellulaire basée sur diverses stratégies ECL,^[39,41,98] l'imagerie par ECL des mitochondries dans les cellules vivantes semble possible.

En tant que technique d'imagerie électrochimique polyvalente, l'approche présentée ouvre de nombreuses opportunités expérimentales pour le développement d'une nouvelle microscopie sensible. En effet, la suite du projet porte sur les limites de détection par ECL- en bio-imagerie en diminuant la quantité en luminophores. Pour cela, la concentration en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est diminuée de la gamme micromolaire jusqu'au picomolaire. Pour cette étude, il a été choisi d'observer d'abord des cellules (CHO) car les entités plus grandes permettent de mieux étudier les contrastes de l'image dans nos conditions expérimentales (caméra, microscope, objectif), entre l'ECL au niveau de l'électrode nue et l'ECL- au niveau de la cellule. Une tentative de détection des mitochondries par ECL- à de faibles concentrations en luminophore est également abordée.

II.3.4. Microscopie sensible par ECL- de cellules et d'organites

II.3.4.1. Introduction

La concentration du luminophore est un point clé pour atteindre des limites extrêmement basses de détection et de quantification.^[89] La détection sensible par ECL d'anticorps, de protéines et de marqueurs implique en effet des concentrations extrêmement faibles en luminophore.^[99] Les travaux de recherche présentés ici visent à développer la microscopie ECL sensible de cellules et d'organites, ici les mitochondries. L'approche est basée sur la dilution extrême du luminophore, avec seulement quelques centaines de molécules dans la région imagée, et sur l'accumulation de photons ECL afin d'obtenir des images bien définies de cellules uniques. Il est démontré ici que la microscopie ECL de cellules uniques et de mitochondries est possible en utilisant des concentrations extrêmement faibles de luminophore de l'ordre du nanomolaires (nM) et du picomolaire (pM). La valeur en concentration la plus basse étudiée est de 7 ordres de grandeur inférieure à celle rapportée précédemment.^[29,41,51-54,76] Les concentrations en pM correspondent à des valeurs où seulement quelques centaines de molécules luminophores diffusent autour des entités biologiques. L'accumulation de photons sur quelques dizaines de secondes permet l'enregistrement de suffisamment d'événements ECL stochastiques (c'est-à-dire l'émission de photons) pour obtenir des images ECL denses et bien définies des entités biologiques, comme le démontrent les analyses de mesure d'indice de similarité structurelle (« structural similarity index measurement », SSIM). En tant que technique d'imagerie ECL polyvalente, l'approche ECL présentée étend les champ d'application de l'imagerie ECL sans marquage au domaine de la microscopie à molécule unique. La question centrale de ce travail est en fait la concentration minimale du luminophore ECL requise pour imager des entités uniques.^[55,100]

Dans la partie précédente II.3.3. , il a été démontré que des mitochondries uniques pouvaient être observées avec une résolution 2D (x-y) élevée par ECL- et améliorée par rapport à l'imagerie par fluorescence des colorants et des rapporteurs endogènes métaboliques tels que le NADH.^[76] Ces images ont été obtenues en utilisant des concentrations typiques pour de la microscopie ECL, à savoir 30 μM en luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M en co-réactif rédox TPrA. Pour cette étude, la plage de concentration de luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est diminuée au niveau nanomolaire jusqu'au niveau picomolaire afin d'évaluer les capacités d'imagerie dans cette plage de concentrations.

II.3.4.2. Résultats et discussions

II.3.4.2.1. Préparation des cellules

Dans ce but, les cellules à imager (CHO-K1 car inerte, faciles à cultiver et couramment utilisées dans la recherche biologique et médicale) sont cultivées pendant deux jours au laboratoire ISM à la surface d'une électrode en GC. Celle-ci est prétraitée par une solution Piranha (correspondant à un mélange d'acide sulfurique H_2SO_4 et de H_2O_2) pour assurer une bonne adhésion et un bon étalement sur la surface. En fin de culture, avant la fixation et l'observation en ECL-, les cellules sont marquées à la calcéine-AM pour faciliter leur localisation et la focalisation par PL, comme proposé dans des études réalisées antérieurement par notre groupe de recherche.^[38,39,43,56] Le marquage à la calcéine-AM est une procédure standard pour distinguer les cellules vivantes des cellules mortes.^[101] En effet, le groupe hydrophobe AM (acétométhoxy) aide le marqueur à traverser la membrane cytoplasmique dans les cellules viables. Ensuite, le groupe AM est éliminé par les estérases intracellulaires. Le colorant vert résultant est alors piégé dans la cellule et émet une forte fluorescence. Enfin l'électrode est plongée dans un tampon PBS (0,65 M, pH 7,4) avec 0,1 M de TPrA et 1 nM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, contenus dans la même cellule électrochimique que les travaux précédents sur les mitochondries. Les cellules sont alors prêtes à être observées en ECL- et en PL.

II.3.4.2.2. Premières images ECL- de cellules à faible concentration en luminophore

Les images ECL- sont obtenues en utilisant une caméra EMCCD, avec une exposition de plusieurs dizaines de secondes (20 secondes). Bien que la forme générale des cellules soit similaire aux techniques de fluorescence et d'ECL, cette dernière offre un contraste net et une bonne délimitation des contours des bordures de membrane et des podes à la surface de l'électrode.

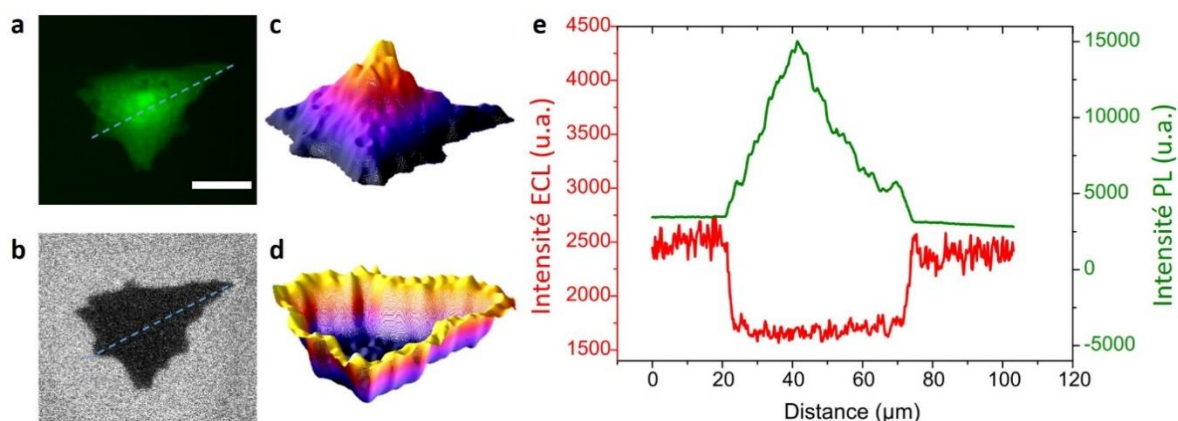


Figure 2.15 : a) Imagerie PL et b) ECL- sur une électrode en GC d'une cellule de mammifère isolée (souche CHO-K1) marquée à la calcéine. Image 3D de la cellule en modes c) PL et d) ECL. e) Les profils d'intensité PL (vert) et ECL (rouge) extraits le long des lignes pointillées des images correspondantes a) et b). Les images PL et ECL- ont été enregistrées dans une solution PBS (0,65 M, pH 7,4) contenant 1 nM de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPRA. Barre d'échelle : 20 μm. Les intensités ECL ont été soustraites de la valeur moyenne du bruit d'image détectée sans appliquer de potentiel à l'électrode en GC.^[102]

La correspondance entre les informations positives par PL et négatives par ECL- est mieux soulignée lors de la comparaison des images 3D (**Figure 2.15.c, d**) et de leurs profils d'intensité (**Figure 2.15.e**). Ces images montrent que l'imagerie ECL des cellules est possible même à une concentration en luminophore de 1 nM. L'analyse des variations d'intensité PL et ECL sur cette cellule présentée à la **Figure 2.15.e** démontre la correspondance directe entre les deux informations en termes de détection des contours cellulaires et d'imagerie. Une forte diminution de l'intensité de l'ECL est détectée entre la zone cellulaire, ses bordures et les autres parties de la surface de l'électrode où la luminescence est maximale. En effet, l'intensité de l'ECL est en moyenne 15 fois plus forte sur la surface nue de l'électrode (c'est-à-dire sans aucune cellule) par rapport à la zone située sous la membrane cellulaire (**Figure 2.15.e**). Cette variation permet de définir les limites de la membrane cellulaire à la surface, même à une concentration de luminophore aussi faible, dans la plage du nM. Cette résolution ne peut pas toujours être atteinte lors de l'utilisation de l'imagerie par fluorescence, car elle peut dépendre de la concentration du marqueur aux emplacements cellulaires dédiés et donc du protocole de coloration. En revanche, l'approche ECL- ne nécessite ni marquage cellulaire ni de chargement de colorant pour imager la zone cellulaire unique et les limites de la membrane avec une haute définition. De plus, puisque les molécules sont libres de diffuser dans la solution et sont donc continuellement renouvelées, ECL- est essentiellement immunisée contre le blanchiment des molécules, contrairement à un marquage fluorescent conventionnel, qui est sujet au photo-blanchiment.

II.3.4.2.3. Recherche de la concentration limite en luminophore

Dans une deuxième série d'études, les limites de cette approche sont repoussées en utilisant des concentrations sub-nanomolaires en $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ pour imager par ECL des cellules, puis pour des mitochondries isolées comme dans les travaux présentés précédemment dans la partie II.3.3. Comme indiqué sur la **Figure 2.16**, les images PL et ECL de cellules ont été acquises dans des solutions tampons contenant des concentrations de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ diminuées de 100 pM à 1 pM. Encore une fois, l'imagerie

PL a été utilisée comme référence pour le positionnement des cellules et les extensions de la zone principale.

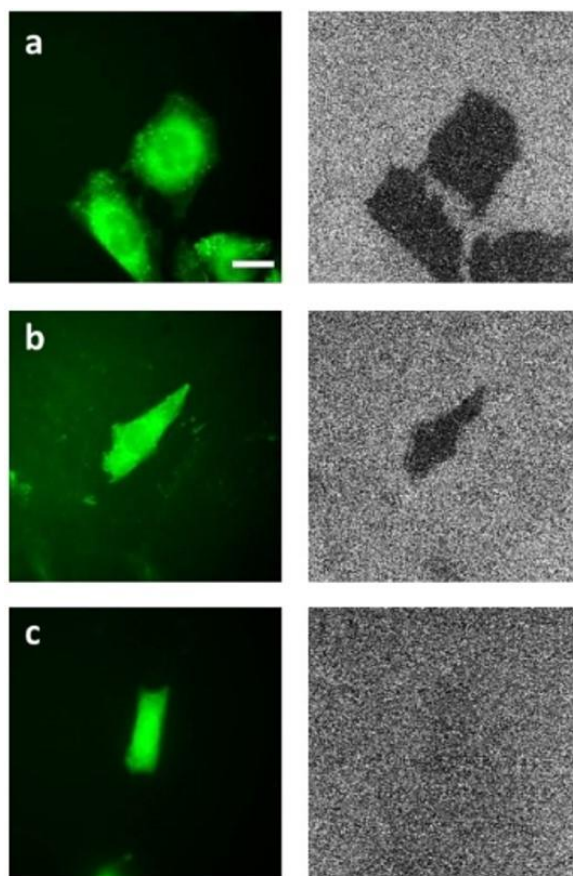


Figure 2.16 : Images de microscopie par PL (gauche) et ECL- (droite) de cellules CHO-K1, pré-remplie à la calcéine, dans des solutions de PBS contenant 0,1 M de TPrA avec différentes concentrations de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$: a) 100 pM, b) 10 pM et c) 1 pM. Barre d'échelle : 20 μm .^[102]

L'image ECL- est contrastée à 100 pM (**Figure 2.16.a**, milieu). La surface de la membrane cellulaire sur l'électrode est encore délimitée et les cellules proches les unes des autres sont également résolues. De la même manière que dans l'étude ECL- du groupe de B. Su, les séparations entre les membranes cellulaires et les podés sont encore observées.^[53] Lorsque la concentration en $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ descend à 10 pM (**Figure 2.16.b**, milieu), une seule cellule se distingue encore du bruit de fond. Finalement, une tentative d'imagerie cellulaire est réalisée avec une concentration en luminophore de 1 pM (**Figure 2.16.c**, milieu). La zone cellulaire peut encore être observée, bien que le rapport SNR soit très réduit et ne permette pas une identification claire. Cette infime concentration à 1 pM apparaît comme la concentration limite pour laquelle des images peuvent être obtenues dans les conditions expérimentales actuelles.

II.3.4.2.4. Expériences de contrôle sans le luminophore

Afin de confirmer que l'ECL- n'est visible qu'en présence de luminophore, que la concentration de ce dernier est totalement contrôlée et qu'il n'y a pas d'impuretés, une image est capturée dans la solution PBS contenant uniquement le co-réactif TPrA (c'est-à-dire en l'absence de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$). La **Figure 2.17** ci-dessous confirme bien que les cellules CHO-K1 observées par PL ne sont pas visibles par ECL- en présence de TPrA seule.

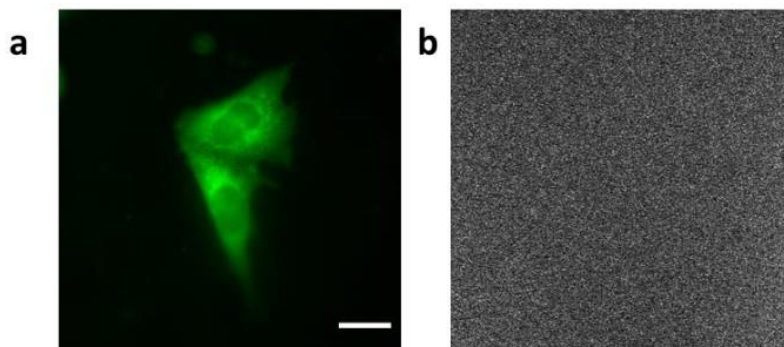


Figure 2.17 : Expériences d'imagerie de contrôle avec uniquement de la TPrA (0,1 M) dans du PBS (0,65 M, pH = 7,4) détecté a) en PL, b) en ECL- à 1,45 V. Barre d'échelle : 20 μm .^[102]

II.3.4.2.5. Méthode de comparaison entre les images ECL- et PL : le SSIM

Pour pouvoir quantifier la qualité des images ECL- par rapport à la concentration en luminophore, il n'est pas possible de comparer les valeurs de SNR. En effet, le signal et le bruit sont tous les deux corrélés à la concentration en luminophore : plus la concentration est faible, moins le signal et le bruit sont intenses, et le rapport SNR ne varie pas. Visuellement, la qualité de l'image en ECL- est déterminée par la netteté de l'ombre formée par l'objet. Il est donc possible d'évaluer la qualité de l'image en confrontant la forme de la cellule obtenue en ECL- à celle obtenue en PL. Pour que les images ECL- et PL soient comparables, un seuillage est appliqué afin d'homogénéiser à une même valeur les pixels correspondants à un signal et pour négliger ceux appartenant au bruit de fond. Autrement dit, tout le signal (la cellule) apparaît alors en noir et le bruit de fond en blanc.

La correspondance entre ces deux images est ensuite quantifiée à l'aide d'un protocole d'analyse d'images de similarité structurelle, appelé SSIM (« structural similarity index measurement » ou mesure d'indice de similarité structurelle). Le SSIM fournit un indice mesurant la corrélation entre deux images à partir de l'analyse de leurs luminiscences, de leurs contrastes et de leurs structures.^[103,104] Un exemple d'application du SSIM pour comparer une image test avec une image de référence est représenté dans la **Figure 2.18**.

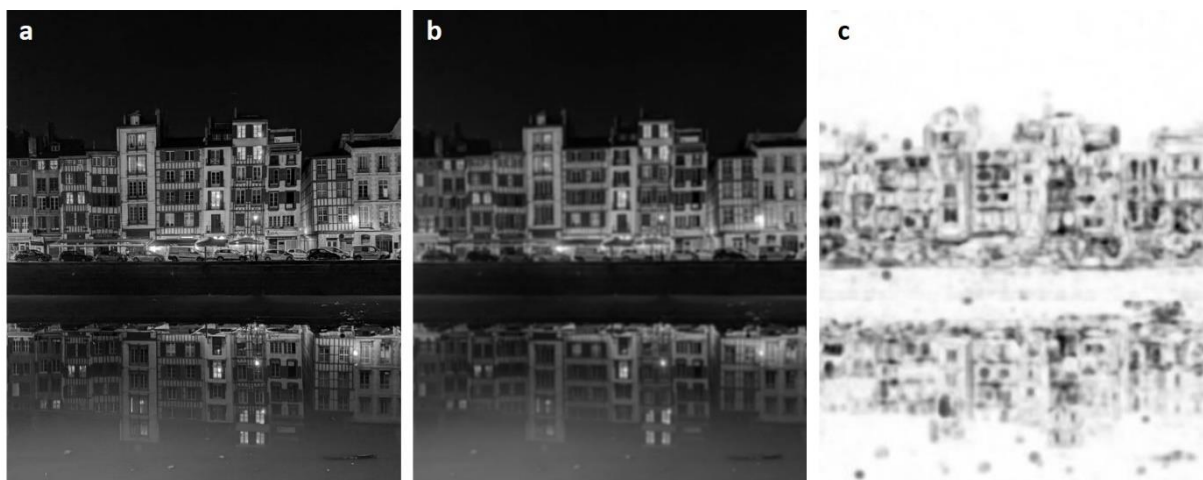


Figure 2.18 : a) Image originale (les quais de la Nive à Bayonne), b) image test (image originale floutée) et c) comparaison des deux images par carte SSIM (indice SSIM = 0,85).

La comparaison entre les deux images génère un indice de corrélation SSIM allant de 0, lorsqu'il n'y a aucune similitude entre les images, jusqu'à 1 pour des images identiques. Cet indice est complété par une carte SSIM permettant de localiser les similitudes et les différences selon une échelle de gris allant du blanc (identique) au noir (différent). Pour pouvoir appliquer la méthode aux images en microscopie, celles-ci doivent être initialement de haute qualité avec un plan de focalisation identique en PL et ECL.

Les images SSIM sont de cette manière calculées entre les images PL et ECL- pour chaque concentration en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (**Figure 2.19**). Les cartes SSIM montrent la concordance au niveau de la surface cellulaire et des limites membranaires mesurées par fluorescence et par ECL- à 100 pM et 10 pM. Même à des concentrations aussi faibles que 1 pM, certains pixels de l'image ECL- sont en bon accord avec les données en PL.

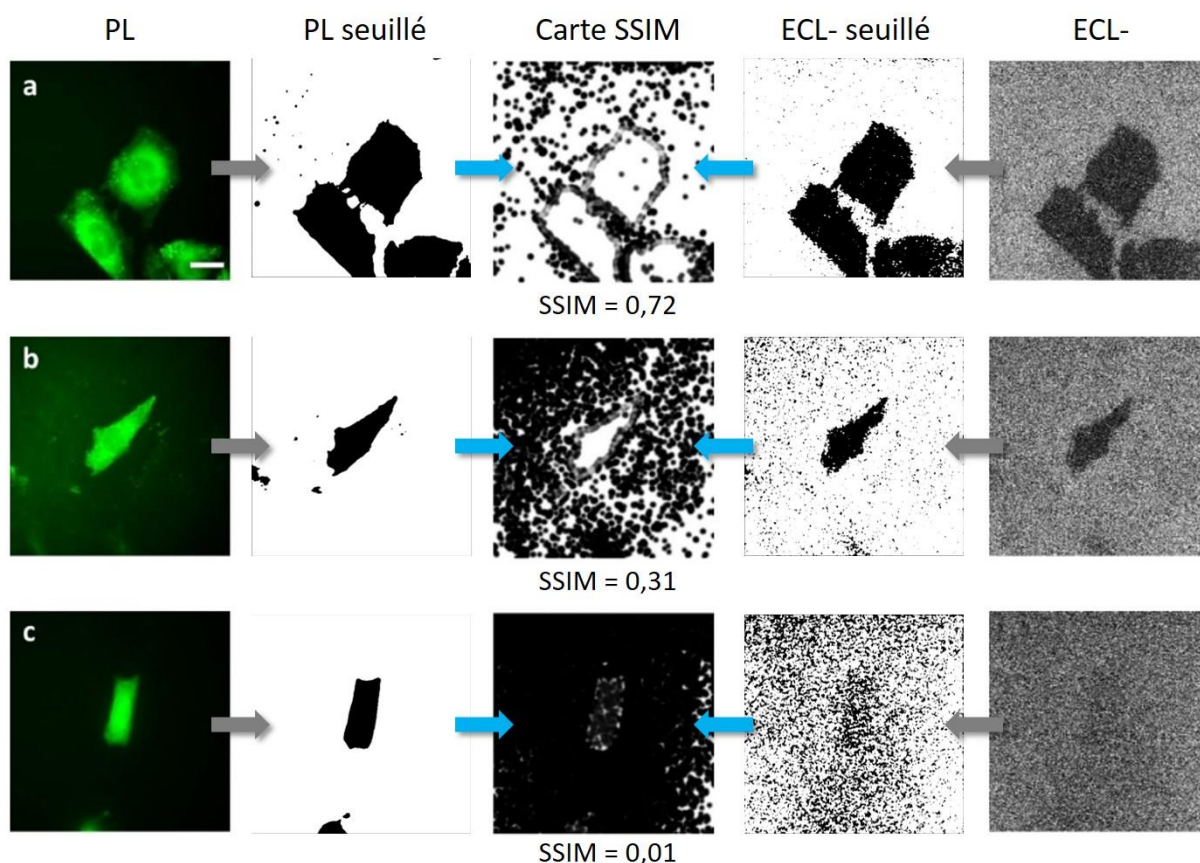


Figure 2.19 : Processus détaillé du calcul SSIM et de la génération de la carte SSIM à partir des images PL et ECL-seuillées de cellules CHO-K1, pré-remplie à la calcéine, dans des solutions de PBS contenant 0,1 M de TPrA avec différentes concentrations de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$: a) 100 pM, b) 10 pM et c) 1 pM. Barre d'échelle : 20 μ m. Les images SSIM sont enregistrées avec la même échelle de gris.^[102]

II.3.4.2.6. Indice SSIM de l'image ECL- selon la concentration en luminophore

Pour aller plus loin, des analyses SSIM ont été effectuées sur d'autres images ECL- de cellules avec une plus large plage de concentrations en $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ allant de 0,1 mM à 1 pM. La **Figure 2.20** montre que l'indice SSIM devient significatif (SSIM = 0,3) à 10 pM et augmente progressivement jusqu'à la valeur unitaire (quand la correspondance est complète entre les images) à 1 nM et à des concentrations en luminophores plus élevées. Cette tendance montre que l'imagerie ECL- de cellules individuelles fournit des informations fiables même à des concentrations en luminophore de l'ordre du sub-nanomolaire.

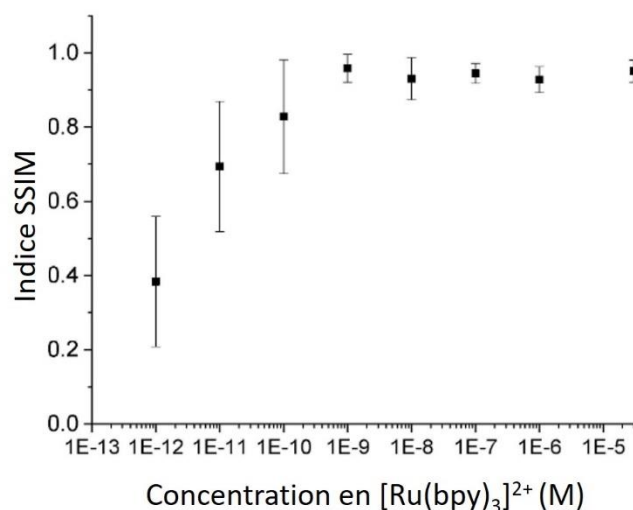


Figure 2.20 : Comparaison de l'indice SSIM d'images de cellules obtenues par PL et ECL- en fonction de la concentration en luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Les barres d'erreur représentent les écart-types calculées sur un total de 50 images.^[102]

Ainsi, les résultats indiquent que l'ECL s'inscrit dans le domaine des méthodes de détection sensibles basées sur de très faibles quantités de sondes analytiques. En effet, le nombre de molécules de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ présentes dans l'environnement d'une seule cellule peut être calculé de la manière suivante : le volume analytique de l'ECL est estimé grossièrement comme la surface observée, soit $100 \times 100 \mu\text{m}$, multipliée par une épaisseur de $5 \mu\text{m}$.^[36,77,96] L'épaisseur de la couche émettrice d'ECL est cependant généralement inférieure à $5 \mu\text{m}$ pour des concentrations élevées en co-réactifs, en raison du confinement par la durée de vie limitée des radicaux TPrA* électrogénérés.^[36,96,97] À noter que cette estimation approximative ne prend pas en compte les changements de réactivité ECL lorsque le luminophore est à faible concentration. Ce calcul conduit cependant à $5 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, soit un volume de 50 pL. En considérant une concentration à 10 pM, le nombre d'espèces luminophores présentes dans ce volume est d'environ 300 molécules. Sur la durée d'intégration d'une image ECL (c'est-à-dire 20 secondes, pendant lesquelles l'électrode est maintenue à un potentiel constant à 1,45 V pour oxyder à la fois le luminophore et le co-réactif), cette quantité de molécules est suffisante pour réaliser des réactions ECL tout autour d'une seule cellule. De plus, la vitesse de diffusion des molécules de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, soit $D = 5,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ dans l'eau,^[55] donne une longueur de diffusion d'environ $200 \mu\text{m}$ sur le temps d'intégration de la caméra de 20 secondes. Une molécule donnée peut donc atteindre n'importe quel endroit de la surface de l'électrode imagée au cours de l'expérience, ce qui suffit à expliquer pourquoi l'imagerie ECL est effectivement possible à des concentrations plus faibles en luminophores. Encore une fois, les changements de réactivité ECL à ces concentrations ne sont pas pris en compte ici. Elucider les mécanismes ECL impliquant une faible quantité de luminophores et de multiples voies de compétition sort du cadre du présent travail dédié à l'imagerie. En effet, cela nécessiterait des expériences électrochimiques, PL et ECL spécifiques par rapport à des simulations de réactions chimiques uniques couplées à la réactivité des radicaux TPrA*. Le faible nombre de molécules luminophores impliquées dans les réactions ECL au niveau de l'électrode soulève des problèmes de résolution transversale (x-y) et d'acquisition de l'image en ECL- négatif. Une seule cellule de quelques dizaines de micromètres se distingue facilement du bruit de fond à 100 pM et à 10 pM en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, mais il reste à étudier si des structures sous-cellulaires plus petites, comme analysé précédemment avec les mitochondries, peuvent être discernées à ces concentrations.

II.3.4.2.7. Application du principe à l'observation des mitochondries

Dans des travaux réalisés auparavant par le Dr. C. Colin, les mitochondries ont été observées par fluorescence combinée à l'ECL- avec des concentrations en luminophore allant du nanomolaire jusqu'au picomolaire (au lieu de 30 μM comme précédemment). Les mitochondries ont également été colorées avec le marqueur MitoTracker Deep Red pour évaluer leur intégrité et leur viabilité. De la même manière que les cellules de la **Figure 2.16**, les mitochondries représentées sur la **Figure 2.21** ont été détectées et dans la plupart des cas bien résolues par ECL- jusqu'à 1 nM en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Le SNR élevé de l'image ECL- a permis de détecter environ 80 % des mitochondries avec le marqueur MitoTracker Deep Red. Lorsque la concentration en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ diminuait à 1 pM, aucun objet ne pouvait être détecté. Cependant, à une concentration de 10 pM en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, un nombre important de mitochondries (20 à 40 % selon l'image) était toujours localisé par ECL-. À une concentration aussi infinitésimale, des organites fonctionnels uniques pouvaient donc aussi être résolus.

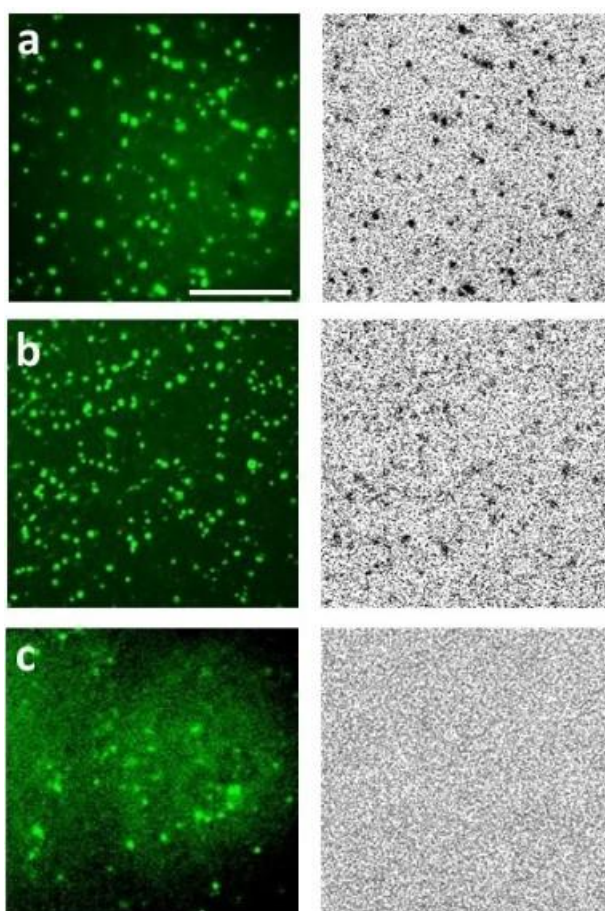


Figure 2.21 : Mitochondrie isolées marquées au colorant MitoTracker imagées par PL (gauche) et ECL (droite) en solutions contenant différentes concentrations en luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$: a) 1 nM, b) 10 pM et c) 1 pM. Les bruits de fond des images ECL- ont été égalisés à un niveau d'intensité similaire pour permettre une comparaison visuelle de la résolution entre les différentes concentrations en luminophore. Barre d'échelle : 20 μm .^[102]

L'analyse SSIM est également appliquée aux images de mitochondries, mais sans succès. Cela était attendu puisque la méthode SSIM compare les zones d'image en fonction des variations nettes d'intensité et de contraste. Dans ces images ECL, la surface affectée par les mitochondries ne représente qu'un pourcentage de la surface de l'image, et les calculs SSIM échouent en raison de la

rareté des objets. Néanmoins, la perte progressive de résolution pour des mitochondries uniques correspond bien à la diminution de l'indice SSIM pour les images cellulaires (**Figure 2.20**) et de la résolution pour les membranes cellulaires lors de la diminution de la concentration de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à un niveau inférieur au nM.

II.3.4.2.8. Lien entre la limite de détection et le temps d'acquisition de l'image

Comme le montrent les résultats des **Figures 2.16** et **2.20**, la concentration en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ affecte la rareté des pixels, c'est-à-dire la probabilité qu'un événement ECL se produise dans une région donnée ou à proximité d'un pixel. Cette concentration détermine le temps d'accumulation nécessaire pour obtenir une image dans laquelle une fraction θ suffisante de pixels a détecté (ou non) un événement ECL. Comme le montre J-F. Rupprecht *et al.*,^[48] le temps d'acquisition T requis pour obtenir une image densément recouverte de pixels de surface σ peut être calculé et varie avec la surface S du champ de vision imagé en raison de la distribution aléatoire (donc inégale) des événements ECL. Ce problème est une variante du « problème du collecteur de coupons ». ^[105] Le principe est l'évaluation du temps d'acquisition de l'image de la même manière que l'on calcule le nombre de paquets contenant des coupons aléatoires (les événements ECL) qui doivent être achetés afin de compléter un album de collection (l'image). À mesure que le remplissage de l'image par les événements ECL augmente avec le temps, la probabilité de redondance augmente également : la probabilité d'apparition de nouveaux événements ECL dans les pixels déjà allumés est alors croissante. Le processus de remplissage de l'image suit donc une loi logarithmique.^[48] En pratique, une image parfaitement dense (dans laquelle chaque pixel est témoin d'au moins un événement ECL) n'est bien sûr pas nécessaire ici, mais un remplissage de pixels jusqu'à un centile θ est acceptable : une fraction $(1 - \theta)$ de pixels restera sombre. Dans ces conditions, en supposant une réactivité idéale à 1, et qu'aucun événement ECL n'est manqué par la caméra, le temps d'acquisition correspond à :

$$T \approx \frac{1}{\sigma\rho} \left\{ \ln \left(\frac{S}{\sigma\theta} \right) + 3 \cdot \ln \ln \frac{S}{\sigma\theta} \right\} \quad (2.11)$$

où ρ est la densité superficielle des ions $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ présents dans l'épaisseur de la couche ECL de 5 μm pendant la durée d'acquisition. Pour une fraction de remplissage d'image choisie (par exemple $\theta = 0,8$, ce qui correspond à l'image ECL obtenue pour 10 pM sur la **Figure 2.16.a**), l'équation (2.12) peut être utilisée pour estimer le temps d'accumulation nécessaire en fonction de la concentration en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, comme le montre la **Figure 2.22**.

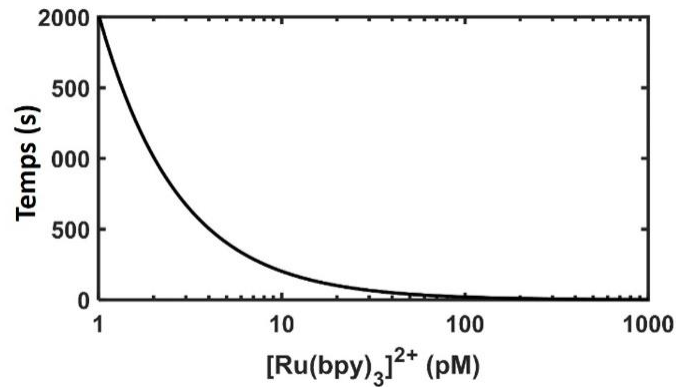


Figure 2.22 : Temps d'acquisition de l'image pour obtenir une fraction de remplissage de pixel de $\theta = 0,8$ en fonction de la concentration en luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en imagerie ECL- de cellules (conditions expérimentales de la Figure 2.16).^[102]

Ce temps augmente considérablement lorsque la concentration est réduite et il faudrait 2000 s pour obtenir une image similaire où $\theta = 0,8$ avec 1 pM. Cette durée invalide clairement les hypothèses de l'estimation actuelle (réactivité idéale, pas de bruit de caméra), et indique donc que des facteurs de remplissage d'image élevés ($\theta > 0,5$) ne sont pas accessibles en dessous de concentrations de 10 pM dans les possibilités expérimentales actuelles. Ces calculs ont été réalisés par le Prof. G. Tessier à l'Institut de la Vision de Paris.

II.3.4.3. Conclusion

À travers cette étude, il a été démontré que la microscopie ECL avait un potentiel pour imager des cellules isolées et des organites à des concentrations infinitésimales en luminophore modèle $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Il est possible de produire des images ECL- nettes avec un luminophore en libre diffusion à des concentrations de l'ordre du nM et du pM. La méthode rapportée est basée sur la dilution du luminophore dans l'espace et sur la gêne de la diffusion des réactifs ECL par les entités biologiques déposées à la surface de l'électrode. Aux niveaux pM, seulement une centaine de molécules de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ diffusent autour d'une seule cellule pour générer de l'ECL à proximité immédiate de la surface de l'électrode. Les analyses comparatives des images PL et ECL- montrent qu'une analyse de l'indice SSIM devient significative à 10 pM et augmente progressivement jusqu'à une valeur unitaire avec des concentrations de luminophore plus élevées. Cela prouve que l'imagerie ECL d'entités biologiques isolées est valable à des concentrations de l'ordre du pM et au-delà.

Cette série d'expériences démontre que des cellules individuelles ainsi que des organites isolés peuvent être imagés avec une résolution au moins micrométrique dans des conditions sensibles. Ceci est en accord avec les simulations qui montrent que, dans les conditions expérimentales actuelles, le temps d'acquisition pour obtenir une image raisonnablement définie d'une cellule augmente considérablement pour des concentrations inférieures à 10 pM. Les performances et la polyvalence de l'ECL- apportent une nouvelle approche dans le domaine de la microscopie ECL sensible. Elles devraient également offrir de nouvelles perspectives pour étudier la réactivité de l'ECL au niveau d'une molécule unique et les voies mécanistiques de l'ECL opérant dans des conditions extrêmes.

II.5. Conclusion du chapitre

L'ECL est un outil développé et commercialisé dans le domaine de l'analyse sous forme de tests immunologiques. L'ECL peut également être une méthode d'imagerie comparable à la microscopie classique par PL et plus simple de lecture que les autres méthodes de microscopie basées sur l'électrochimie. En effet, l'ECL offre un rapport SNR optimal avec un signal lumineux localisé sur une surface en 2D sur l'électrode sans nécessiter de lumière d'excitation. Les stratégies de marquage d'entités biologiques avec le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, renouvelé après chaque mécanisme ECL et ce à un pH physiologique, ont permis d'observer directement des cellules uniques et ont accéléré la recherche de l'application de l'ECL à la bio-imagerie.

À travers ce chapitre, une autre stratégie d'imagerie peu développée est abordée : l'ECL par ombre chinoise ou l'ECL-. Cette méthode d'imagerie est basée sur l'observation d'un objet immergé dans un électrolyte dans lequel les réactifs ECL diffusent librement en solution. L'imagerie par ECL- est d'autant plus adaptée à l'observation d'entités biologiques car elle permet de s'affranchir du marquage de l'entité par liaison covalente et donc de garder ce substrat intact. De cette manière, l'observation de mitochondries vivantes a été possible avec un bon SNR. L'ECL- apporte également un meilleur contrôle de l'imagerie en maîtrisant la concentration en luminophore ainsi que l'épaisseur de la couche ECL à la surface de l'électrode et donc de l'imagerie en plan focal z. Il a été prouvé que des cellules uniques étaient visibles par ECL- avec des concentrations infinitésimales en luminophore modèle $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

La technologie ECL a un fort potentiel en microscopie et en bio-imagerie. Un axe de développement qui sera abordé dans cette thèse est l'ajout d'un nouveau paramètre de contrôle de la génération de l'ECL : une lumière d'« activation » de l'électrode, c'est-à-dire un stimulus d'excitation d'une électrode qui est semi-conductrice. Ce nouveau paramètre pourrait permettre de multiplier les possibilités d'utilisation de l'ECL en analyse et en imagerie et d'étendre ses domaines d'applications.

Références

- [1] H. Hou, Y. Zhao, C. Li, M. Wang, X. Xu, Y. Jin, *Sci Rep* **2017**, *7*, 1759.
- [2] C. Di Primio, V. Quercioli, A. Allouch, R. Gijbers, F. Christ, Z. Debyser, D. Arosio, A. Cereseto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 5636–5641.
- [3] C. Dusny, A. Grünberger, *Current Opinion in Biotechnology* **2020**, *63*, 26–33.
- [4] A.-K. Mahlein, *Plant Disease* **2016**, *100*, 241–251.
- [5] W. R. Hendee, K. Cleary, R. L. Ehman, G. D. Fullerton, W. S. Grundfest, J. Haller, C. A. Kelley, A. E. Meyer, R. F. Murphy, W. Phillips, V. P. Torchilin, *Cytometry Pt A* **2008**, *73A*, 779–784.
- [6] B. F. Brehm-Stecher, E. A. Johnson, *Microbiol Mol Biol Rev* **2004**, *68*, 538–559.
- [7] R. M. R. Gawryluk, J. Del Campo, N. Okamoto, J. F. H. Strassert, J. Lukeš, T. A. Richards, A. Z. Worden, A. E. Santoro, P. J. Keeling, *Current Biology* **2016**, *26*, 3053–3059.
- [8] X. T. Zheng, C. M. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2061–2071.
- [9] “Merck Millipore | Sciences de la vie | Produits chimiques industriels & de laboratoire | Achats en ligne,” can be found under <https://www.merckmillipore.com/FR/fr>, **n.d.**
- [10] “IF imaging: Widefield versus confocal microscopy | Proteintech Group,” can be found under <https://www.ptglab.com/news/blog/if-imaging-widefield-versus-confocal-microscopy>, **n.d.**
- [11] L. R. S. R. S., *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1896**, *42*, 167–195.
- [12] A. S. Stender, K. Marchuk, C. Liu, S. Sander, M. W. Meyer, E. A. Smith, B. Neupane, G. Wang, J. Li, J.-X. Cheng, B. Huang, N. Fang, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2469–2527.
- [13] D. Wildanger, B. R. Patton, H. Schill, L. Marseglia, J. P. Hadden, S. Knauer, A. Schönle, J. G. Rarity, J. L. O’Brien, S. W. Hell, J. M. Smith, *Advanced Materials* **2012**, *24*, DOI 10.1002/adma.201203033.
- [14] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [15] A. J. Meixner, *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407*, 1797–1800.
- [16] T.-E. Lin, S. Rapino, H. H. Girault, A. Lesch, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 4546–4554.
- [17] J. Zhang, T. Zhu, J. Lang, W. Fu, F. Li, *Current Opinion in Electrochemistry* **2020**, *22*, 178–185.
- [18] A. J. Bard, F. R. F. Fan, Juhyou. Kwak, Ovadia. Lev, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 132–138.
- [19] D. Perry, B. Paulose Nadappuram, D. Momotenko, P. D. Voyias, A. Page, G. Tripathi, B. G. Frenguelli, P. R. Unwin, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3152–3160.
- [20] Y. Takahashi, H. Ida, Y. Matsumae, H. Komaki, Y. Zhou, A. Kumatani, M. Kanzaki, H. Shiku, T. Matsue, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 26728–26733.
- [21] R. C. Engstrom, Trevor. Meaney, Ray. Tople, R. Mark. Wightman, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2005–2010.
- [22] R. C. Engstrom, Michael. Weber, D. J. Wunder, Robert. Burgess, Sharon. Winqvist, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 844–848.
- [23] A. J. Bard, F.-R. F. Fan, D. T. Pierce, P. R. Unwin, D. O. Wipf, F. Zhou, *Science* **1991**, *254*, 68–74.
- [24] A. J. Bard, M. V. Mirkin, *Scanning Electrochemical Microscopy, Second Edition*, CRC Press, **2012**.
- [25] S. Amemiya, A. J. Bard, F.-R. F. Fan, M. V. Mirkin, P. R. Unwin, *Annual Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 95–131.
- [26] B. Liu, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9855–9860.
- [27] Y. E. Korchev, C. L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy, M. J. Lab, *Biophysical Journal* **1997**, *73*, 653–658.

- [28] P. K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S. A. C. Gould, C. B. Prater, *Science* **1989**, *243*, 641–643.
- [29] J. Dong, Y. Xu, Z. Zhang, J. Feng, *Angew Chem Int Ed* **2022**, *61*, e202200187.
- [30] A. J. Bard, Ed., *Electrogenerated Chemiluminescence*, Marcel Dekker, New York, **2004**.
- [31] R. C. Engstrom, K. W. Johnson, Scott. DesJarlais, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 670–673.
- [32] R. C. Engstrom, C. M. Pharr, M. D. Koppang, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1987**, *221*, 251–255.
- [33] E. Faatz, A. Finke, H.-P. Josel, G. Prencipe, S. Quint, M. Windfuhr, in *Detection Science* (Ed.: N. Sojic), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2019**, pp. 443–470.
- [34] X. Ma, W. Gao, F. Du, F. Yuan, J. Yu, Y. Guan, N. Sojic, G. Xu, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 2936–2945.
- [35] L. Xu, Z. Zhou, C. Zhang, Y. He, B. Su, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9097–9100.
- [36] M. Sentic, M. Milutinovic, F. Kanoufi, D. Manojlovic, S. Arbault, N. Sojic, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2568–2572.
- [37] H. Ding, B. Su, D. Jiang, *ChemistryOpen* **2023**, *12*, e202200113.
- [38] G. Valenti, S. Scarabino, B. Goudeau, A. Lesch, M. Jović, E. Villani, M. Sentic, S. Rapino, S. Arbault, F. Paolucci, N. Sojic, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16830–16837.
- [39] S. Voci, B. Goudeau, G. Valenti, A. Lesch, M. Jović, S. Rapino, F. Paolucci, S. Arbault, N. Sojic, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14753–14760.
- [40] C. Ma, Y. Cao, X. Gou, J.-J. Zhu, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 431–454.
- [41] C. Ma, S. Wu, Y. Zhou, H. Wei, J. Zhang, Z. Chen, J. Zhu, Y. Lin, W. Zhu, *Angew Chem Int Ed* **2021**, *60*, 4907–4914.
- [42] J. Zhang, S. Arbault, N. Sojic, D. Jiang, *Annual Rev. Anal. Chem.* **2019**, *12*, 275–295.
- [43] D. Han, B. Goudeau, D. Jiang, D. Fang, N. Sojic, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 1652–1657.
- [44] J. Tønnesen, V. V. G. K. Inavalli, U. V. Nägerl, *Cell* **2018**, *172*, 1108–1121.e15.
- [45] N. T. Urban, K. I. Willig, S. W. Hell, U. V. Nägerl, *Biophysical Journal* **2011**, *101*, 1277–1284.
- [46] U. V. Nägerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell, T. Bonhoeffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 18982–18987.
- [47] A. Martinez-Marrades, J.-F. Rupprecht, M. Gross, G. Tessier, *Opt. Express* **2014**, *22*, 29191.
- [48] J.-F. Rupprecht, A. Martinez-Marrades, Z. Zhang, R. Changede, P. Kanchanawong, G. Tessier, *Opt. Express* **2017**, *25*, 23146.
- [49] J. Zhang, R. Jin, D. Jiang, H.-Y. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 10294–10299.
- [50] L. Xu, Y. Li, S. Wu, X. Liu, B. Su, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8192–8196.
- [51] H. Ding, W. Guo, B. Su, *Angew Chem Int Ed* **2020**, *59*, 449–456.
- [52] L. Ding, H. Ding, P. Zhou, L. Xi, B. Su, *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 10885–10892.
- [53] H. Ding, P. Zhou, W. Fu, L. Ding, W. Guo, B. Su, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 11769–11773.
- [54] H. Gao, W. Han, H. Qi, Q. Gao, C. Zhang, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 8278–8284.
- [55] J. Dong, Y. Lu, Y. Xu, F. Chen, J. Yang, Y. Chen, J. Feng, *Nature* **2021**, *596*, 244–249.
- [56] D. Han, B. Goudeau, D. Manojlovic, D. Jiang, D. Fang, N. Sojic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 7686–7690.
- [57] B. Glancy, *Trends in Molecular Medicine* **2020**, *26*, 58–70.
- [58] P. B. Allen, B. R. Doepker, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3784–3791.
- [59] G. Quarato, C. Piccoli, R. Scrima, N. Capitanio, *Mitochondrion* **2011**, *11*, 764–773.
- [60] A. Schneider, S. Kurz, K. Manske, M. Janas, M. Heikenwälder, T. Misgeld, M. Aichler, S. F. Weissmann, H. Zischka, P. Knolle, D. Wohlleber, *Sci Rep* **2019**, *9*, 8492.
- [61] M. Bonora, P. Pinton, *Front. Oncol.* **2014**, *4*, DOI 10.3389/fonc.2014.00302.

- [62] S. Javadov, S. Jang, R. Parodi-Rullán, Z. Khuchua, A. V. Kuznetsov, *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 2795–2813.
- [63] K. Hu, T. D. K. Nguyen, S. Rabasco, P. E. Oomen, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 41–71.
- [64] C. Wang, M. Taki, Y. Sato, Y. Tamura, H. Yaginuma, Y. Okada, S. Yamaguchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 15817–15822.
- [65] J. Dreier, M. Castello, G. Coceano, R. Cáceres, J. Plastino, G. Vicidomini, I. Testa, *Nat Commun* **2019**, *10*, 556.
- [66] K. S. Größmayer, S. Geissbuehler, A. Descloux, T. Lukes, M. Leutenegger, A. Radenovic, T. Lasser, *Nat Commun* **2020**, *11*, 3023.
- [67] N. Wang, H. Gao, Y. Li, G. Li, W. Chen, Z. Jin, J. Lei, Q. Wei, H. Ju, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 199–203.
- [68] H. Qi, C. Zhang, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 524–534.
- [69] L. Scorrano, V. Petronilli, R. Colonna, F. Di Lisa, P. Bernardi, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 24657–24663.
- [70] J. R. Gledhill, J. E. Walker, *Biochemical Journal* **2005**, *386*, 591–598.
- [71] D. Lasne, G. A. Blab, F. De Giorgi, F. Ichas, B. Lounis, L. Cognet, *Opt. Express* **2007**, *15*, 14184.
- [72] S. Adhikari, P. Spaeth, A. Kar, M. D. Baaske, S. Khatua, M. Orrit, *ACS Nano* **2020**, *14*, 16414–16445.
- [73] S.-Y. Choi, P. Huang, G. M. Jenkins, D. C. Chan, J. Schiller, M. A. Frohman, *Nat Cell Biol* **2006**, *8*, 1255–1262.
- [74] R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, J. Tschopp, *Nature* **2011**, *469*, 221–225.
- [75] E. Suraniti, V. S. Vajrала, B. Goudeau, S. P. Bottari, M. Rigoulet, A. Devin, N. Sojic, S. Arbault, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5146–5152.
- [76] Y. Ma, C. Colin, J. Descamps, S. Arbault, N. Sojic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 18742–18749.
- [77] W. Miao, J.-P. Choi, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14478–14485.
- [78] P. Dutta, D. Han, B. Goudeau, D. Jiang, D. Fang, N. Sojic, *Biosensors and Bioelectronics* **2020**, *165*, 112372.
- [79] V. S. Vajrала, E. Suraniti, M. Rigoulet, A. Devin, N. Sojic, S. Arbault, *Integr. Biol.* **2016**, *8*, 836–843.
- [80] S. M. Rafelski, M. P. Viana, Y. Zhang, Y.-H. M. Chan, K. S. Thorn, P. Yam, J. C. Fung, H. Li, L. D. F. Costa, W. F. Marshall, *Science* **2012**, *338*, 822–824.
- [81] S. Van De Linde, M. Sauer, M. Heilemann, *Journal of Structural Biology* **2008**, *164*, 250–254.
- [82] W. Wang, S. Wang, Q. Liu, J. Wu, N. Tao, *Langmuir* **2012**, *28*, 13373–13379.
- [83] E. Kreysing, H. Hassani, N. Hampe, A. Offenhäusser, *ACS Nano* **2018**, *12*, 8934–8942.
- [84] O. V. Klymenko, I. Svir, C. Amatore, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 2237–2250.
- [85] Z. Chen, Y. Zu, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 16663–16667.
- [86] Z. Chen, Y. Zu, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 21877–21882.
- [87] E. Daviddi, A. Oleinick, I. Svir, G. Valenti, F. Paolucci, C. Amatore, *ChemElectroChem* **2017**, *4*, 1719–1730.
- [88] G. Valenti, A. Fiorani, H. Li, N. Sojic, F. Paolucci, *ChemElectroChem* **2016**, *3*, 1990–1997.
- [89] A. Zanut, A. Fiorani, S. Canola, T. Saito, N. Ziebart, S. Rapino, S. Rebecani, A. Barbon, T. Irie, H.-P. Josel, F. Negri, M. Marcaccio, M. Windfuhr, K. Imai, G. Valenti, F. Paolucci, *Nat Commun* **2020**, *11*, 2668.
- [90] W. Guo, H. Ding, C. Gu, Y. Liu, X. Jiang, B. Su, Y. Shao, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 15904–15915.
- [91] R. Qiu, X. Zhang, H. Luo, Y. Shao, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6684–6688.
- [92] J. Hu, N. Zhang, P. Zhang, Y. Chen, X. Xia, H. Chen, J. Xu, *Angew Chem Int Ed* **2020**, *59*, 18244–18248.

- [93] P. Pastore, D. Badocco, F. Zanon, *Electrochimica Acta* **2006**, *51*, 5394–5401.
- [94] Y. Zu, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3223–3232.
- [95] F. Kanoufi, Y. Zu, A. J. Bard, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 210–216.
- [96] W. Guo, P. Zhou, L. Sun, H. Ding, B. Su, *Angew Chem Int Ed* **2021**, *60*, 2089–2093.
- [97] Y. Wang, W. Guo, Q. Yang, B. Su, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1222–1226.
- [98] Y. Wang, R. Jin, N. Sojic, D. Jiang, H. Chen, *Angew Chem Int Ed* **2020**, *59*, 10416–10420.
- [99] A. Zanut, F. Palomba, M. Rossi Scota, S. Rebecani, M. Marcaccio, D. Genovese, E. Rampazzo, G. Valenti, F. Paolucci, L. Prodi, *Angew Chem Int Ed* **2020**, *59*, 21858–21863.
- [100] M. M. Collinson, R. M. Wightman, *Science* **1995**, *268*, 1883–1885.
- [101] S. Chackalamannil, D. Rotella, S. Ward, *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, Elsevier, Oxford, **2017**.
- [102] J. Descamps, C. Colin, G. Tessier, S. Arbault, N. Sojic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *135*, e202218574.
- [103] G. P. Renieblas, A. T. Nogués, A. M. González, N. Gómez León, E. G. Del Castillo, *J. Med. Imaging* **2017**, *4*, 035501.
- [104] Y. Li, B. Huang, H. Yang, G. Hou, P. Zhang, J. Duan, *IET image process* **2020**, *14*, 4401–4411.
- [105] P. Erdős, A. Rényi, *Magyar Tud. Akad. Mat. Kutató Int. Közl* **1961**, *6*, 215–220.

Chapitre III : Développement de systèmes PECL anodiques et cathodiques stables

III. Développement de systèmes PECL anodiques et cathodiques stables

III.1. Introduction

III.1.1. Concept de la PECL

L'ECL est caractérisée par la génération de lumière confinée au voisinage de la surface d'une électrode qui est contrôlée par un potentiostat et sans nécessiter aucune source de lumière externe. Ses propriétés singulières et sa simplicité de mise en place ont permis son développement et sa commercialisation dans le diagnostic clinique avec des tests immunologiques pour des pathologies variées telles que les maladies cardiaques, les dysfonctionnement de la thyroïde, les infections ou les marqueurs tumoraux.^[1,2] Il existe cependant une demande croissante pour un multiplexage, une stabilité et une portabilité dans ces domaines d'application. Avec son SNR élevé, l'ECL est également en plein développement dans les secteurs de la microscopie et de l'imagerie. La possibilité d'un contrôle localisé de la génération de lumière pourrait être une des pistes d'amélioration de la réduction de bruit et de la résolution spatiale.

En parallèle, la photoélectrochimie, qui fut décrite pour la première fois par A. E. Becquerel en 1839,^[3] est un domaine de recherche dont le principe de fonctionnement est l'inverse de l'ECL : la lumière est convertie en porteurs de charges pour déclencher une réaction électrochimique. Pour cela, la WE qui est habituellement un matériau conducteur en électrochimie est remplacée par un semi-conducteur (SC) illuminé. Le SC absorbe les photons ayant un niveau d'énergie suffisant et les convertit en porteurs de charges électron/trou (e^-/h^+). Ces charges se séparent et les h^+ , ou les e^- , sont injectés dans l'électrolyte pour déclencher respectivement une oxydation ou une réduction. Bien que le SC absorbe l'énergie lumineuse pour la convertir en énergie électrique, celle-ci est souvent insuffisante pour déclencher la réaction électrochimique et requiert l'application d'un potentiel au SC. Cette surtension reste toutefois inférieure à celle imposée dans les conditions d'électrochimie classique avec une électrode non photo-active. C'est pourquoi le domaine de la photoélectrochimie est aujourd'hui un acteur important pour la conversion de l'énergie solaire, mais aussi en chimie analytique.

La combinaison de la photoélectrochimie sur SC avec l'ECL offre de nouvelles possibilités de schémas de détection puisque les électrodes peuvent agir à la fois comme absorbeur de lumière et comme émetteur. Ce concept est appelé électrochimiluminescence photo-induite, en anglais « photo-induced electrochemiluminescence » (PECL).^[4-6] Il permet de combiner un SC, comme par exemple le silicium (Si), le gallium-indium (InGa) ou le vanadate de bismuth ($BiVO_4$), ayant chacun une gamme de longueurs d'onde d'absorption caractéristiques, avec des systèmes ECL de différentes couleurs comme par exemple ceux à base de luminol pour émettre du bleu ($\lambda_{em} = 425 \text{ nm}$), de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ pour du rouge ($\lambda_{em} = 620 \text{ nm}$) ou de $[Ir(sppy)_3]^{3-}$ (avec sppy = 5'-sulfo-2-phenylpyridinato-C2,N) pour du vert ($\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$). De cette manière, la PECL est simplement la conversion d'une lumière d'excitation issue d'une LED (λ_{LED}) en une lumière d'émission par PECL (λ_{PECL}) d'énergies différentes.

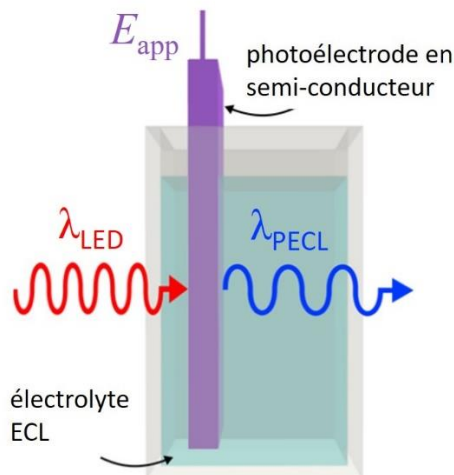


Figure 3.1 : Conversion de la lumière par PECL. La lumière incidente excitatrice du SC provenant d'une LED (λ_{LED}) est convertie en lumière d'émission par PECL (λ_{PECL}) à l'interface solide/liquide lorsqu'un le potentiel E_{app} est appliqué à la photoélectrode.

Il est alors possible de concevoir un dispositif pour une conversion d'énergie descendante, *i.e.* de type Stokes comme en photoluminescence où $\lambda_{LED} < \lambda_{PECL}$. À l'inverse, la conversion peut aussi être ascendante, *i.e.* de type anti-Stokes avec $\lambda_{LED} > \lambda_{PECL}$. Cette dernière conversion est intéressante pour pouvoir mettre en place l'imagerie PECL à partir d'une lumière infra-rouge (IR), invisible à l'œil. La PECL présente donc un fort potentiel pour la bioanalyse, mais aussi pour l'étude des photoélectrodes utilisées dans les applications de conversion de l'énergie solaire telles que la division photoélectrochimique de l'eau.^[7-9] L'introduction du contrôle par la lumière IR peut également permettre la localisation de la PECL sur l'électrode^[5,10] ou bien même aboutir vers un système portable sans connectiques ni potentiostat. En effet, la photoélectrochimie permet de diminuer les potentiels électrochimiques nécessaires pour générer l'émission ECL, qui sont toujours très exergoniques et nécessitent généralement l'application de potentiels élevés.^[11,12] Cette réduction s'explique par le photovoltage V_{oc} créé par la lumière à la surface du SC, du côté de l'électrolyte.^[4] Ce V_{oc} peut être modulé par une ingénierie de la structure des SC impliqués, par exemple avec le dopage, la superposition de couche, la forme de la surface, etc. Pour mieux comprendre le potentiel de la PECL en imagerie et analyse, il faut d'abord expliquer les principes de la photoélectrochimie sur les matériaux SC.

III.1.2. Propriétés des SC

III.1.2.1. Bandes d'énergies

Afin d'introduire un contrôle de la réaction électrochimique par la lumière dans le cas de la photoélectrochimie, l'électrode utilisée doit être faite d'un matériau de type SC à la place d'un matériau conducteur. En effet, l'activité du SC dépend d'un apport énergétique extérieur appelé « excitation », par la chaleur ou la lumière par exemple, pour qu'il puisse obtenir des propriétés conductrices. En effet, le matériau présente un écart d'énergie entre deux bandes d'énergies caractéristiques : la bande de valence (« valence band » ou VB) qui est occupée par des e^- impliqués

dans les liaisons covalentes du cristallin et la bande de conduction (« conduction band » ou CB) qui est vide. Comme schématisé dans la **Figure 3.2** ci-dessous, lorsqu'un dimère ou une nanoparticule est formée, la proximité des orbitales des molécules entraîne la division des niveaux HOMO et LUMO des atomes et produit des sous-niveaux vibrationnels discrets légèrement différents les uns des autres. Il y a autant de sous-niveaux vibrationnels par niveau d'énergie qu'il y a de molécules qui interagissent ensemble. Dès l'instant où l'agrégat est plus grand, donc plus d'atomes impliqués, leurs niveaux d'énergie se fondent alors dans un continuum et forment les bandes d'énergie. De cette manière, les niveaux HOMO forment la VB et les niveaux LUMO constituent la CB.

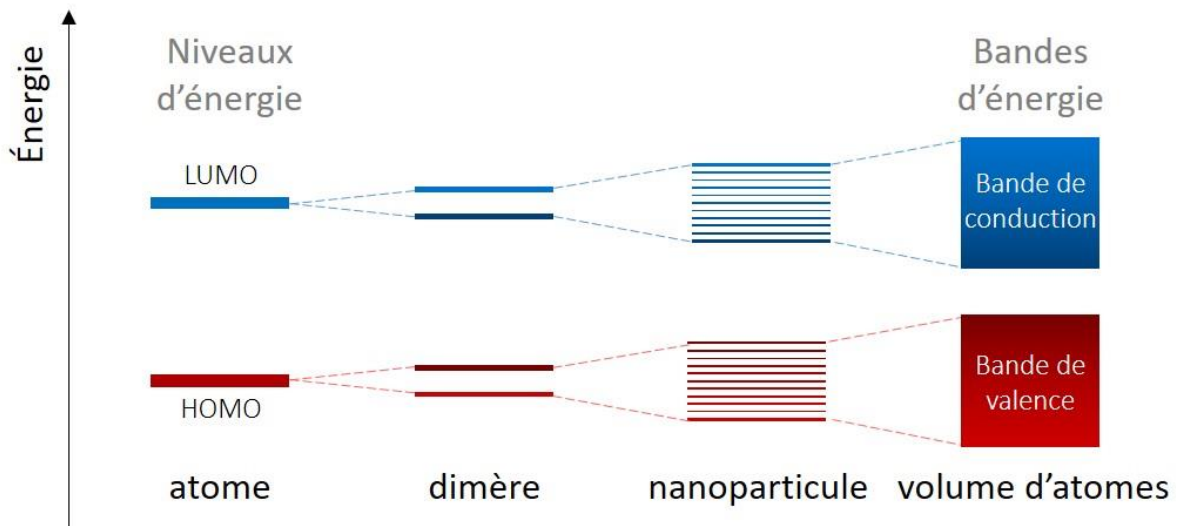


Figure 3.2 : Schéma graphique des niveaux d'énergie de l'atome unique jusqu'à un volume d'atomes.^[13]

Lorsque le matériau est conducteur, la VB et la CB se superposent et les e^- peuvent se déplacer dans le cristal. Le SC se distingue du matériau conducteur par un faible écart énergétique, appelé bande interdite (« energy gap » ou E_g), entre le niveau d'énergie le plus haut de la VB et le niveau d'énergie le plus bas de la CB. D'après R. Memming, la valeur de cet écart E_g varie pour un SC entre 0,66 et 3,68 eV selon la nature du matériau.^[14] Il est par exemple de 1,1 eV pour du Si à maille cristalline de type diamant, de 2,5 eV pour le BiVO_4 ,^[15] ou de 1,4 eV pour l'InP,^[16] à température ambiante. Lorsque cet E_g est trop grand pour être comblé, le matériau est alors isolant (**Figure 3.3**). Après absorption d'une énergie supérieure à E_g , des paires e^-/h^+ sont formées dans la VB. Les e^- libres de la VB sont promus vers la CB dans laquelle ils peuvent se déplacer. Les h^+ générés par l'absence des e^- sont également mobiles dans la VB. Le matériau est alors devenu conducteur par absorption d'un photon. Le phénomène inverse est aussi possible par recombinaison radiative, autrement dit la recombinaison d'un e^- avec un h^+ qui génère l'émission d'un photon, mais il ne sera pas utilisé dans cette thèse.

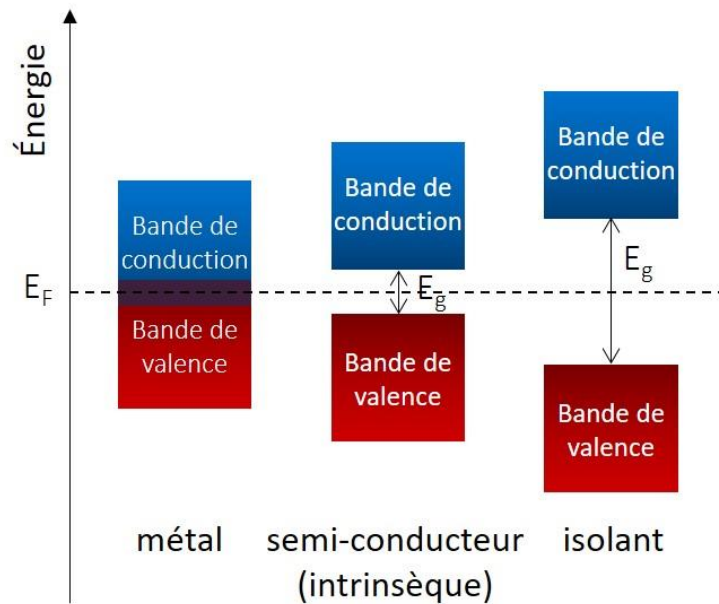


Figure 3.3 : Schéma graphique des bandes d'énergies d'un métal, d'un semi-conducteur et d'un isolant.^[17]

III.1.2.2. Dopage

Un SC est dit intrinsèque lorsqu'il est pur. Dans ce cas, il présente un nombre égal d' e^- dans la CB et de h^+ dans la VB car tous les électrons présents dans la CB proviennent de la VB.^[18] Le niveau de Fermi E_F est alors centré par rapport à ces bandes d'après la distribution de Fermi-Dirac (**Équation 3.1**).^[19] En effet, E_F est l'énergie où la probabilité d'occupation par un électron est de $\frac{1}{2}$ et dépend de la température tel que :

$$f(E) = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{E-E_F}{k_B T}\right)}} \quad (3.1)$$

Avec l'énergie E , la constante de Boltzmann k_B et la température T .

Cependant, ces charges ne sont pas assez mobiles pour que le SC puisse être utilisé pour des applications de conversion de lumière. Pour augmenter leur conductivité, les SC sont dopés : une partie des atomes d'origine est remplacée par des dopants, c'est-à-dire des atomes donneurs d' e^- ou des atomes donneurs de h^+ , à une concentration contrôlée. Le SC est alors appelé extrinsèque. Il est soit dopé de type n (chargé négativement) par ajout de donneur d' e^- , soit dopé de type p (chargé positivement) par ajout de donneur de h^+ . Le SC a alors des charges majoritaires (e^- pour le dopage n et h^+ pour le dopage p) et des charges minoritaires (h^+ pour le dopage n et e^- pour le dopage p). De cette manière, l'équilibre entre les charges est modifié et les porteurs majoritaires favorisent la conduction électrique. Dans le cas du SC en Si cristallin, il peut être dopé de type n en remplaçant un atome de Si par un atome de phosphore qui a un doublet non liant. À l'opposé, il peut être dopé de type p avec l'atome du bore qui est trivalent et présente une lacune électronique (**Figure 3.5**).

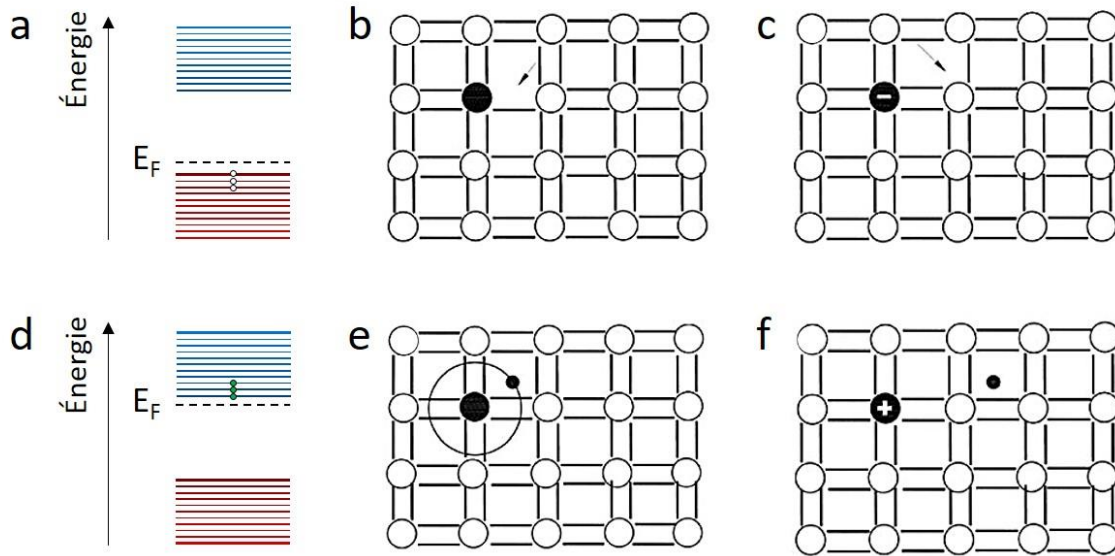


Figure 3.5 : a) Diagramme de bande du Si de type p avec les h^+ dans la VB abaissant le niveau de Fermi E_F . b) Impureté dans le réseau cristallin avec un donneur de h^+ qui présente une lacune électronique. c) Mouvement des h^+ dans le Si cristallin au niveau des doubles liaisons, indiqué par les flèches. d) Diagramme de bande du Si de type n avec les e^- dans la CB élevant le niveau de Fermi E_F . e) Impureté dans le réseau cristallin avec un donneur d' e^- qui a un e^- libre. f) Mouvement des e^- libres dans le Si cristallin.^[20]

Avec l'ajout d' e^- ou de h^+ , le niveau E_F est déplacé selon la concentration en dopant. Pour un SC dopé p, la probabilité d'existence des électrons dans la VB est réduite et E_F devient plus proche de la VB que de la CB (Équation 3.2 et Figure 3.5.a,b,c). À l'inverse, pour un SC dopé n, le niveau E_F se rapproche de la CB (Équation 3.3 et Figure 3.5.d,e,f).

$$E_F = E_V - k_B T \times \log\left(\frac{N_V}{N_A}\right) \quad (3.2)$$

$$E_F = E_C - k_B T \times \log\left(\frac{N_C}{N_D}\right) \quad (3.3)$$

Avec E_C et E_V qui sont respectivement les énergies minimums de la CB et maximum de la VB ; k_B est la constante de Boltzmann ; T la température ; N_C et N_V sont les densités d'états électroniques de la CB et de la VB respectivement ; N_D est la concentration d'atomes donneurs d' e^- et N_A la concentration d'atomes accepteurs d' e^- . Selon la concentration en dopant, la conductivité du SC peut être augmentée jusqu'à la gamme des semi-métaux ou métaux, notés p^{++} ou n^{++} .^[17]

III.1.2.3. Type de bande interdite

Les SC ont en réalité deux types de bande interdite, ce qui est un critère important pour sélectionner un SC pour l'absorption de photon (par exemple dans le photovoltaïque) ou une émission de photon (par exemple pour une diode). Pour les distinguer, il faut ajouter aux diagrammes d'énergie une abscisse selon le vecteur d'onde k qui est associé au moment électronique, autrement dit selon la structure du cristal. En effet, le niveau énergétique le plus élevé de la VB et le niveau le plus bas de la

CB ne sont pas linéaires selon le vecteur k comme illustré dans la **Figure 3.6**. La bande interdite est directe si le moment électronique est le même dans le bas de la CB et le haut de la VB. Si le moment électronique est différent, alors la bande interdite est indirecte.

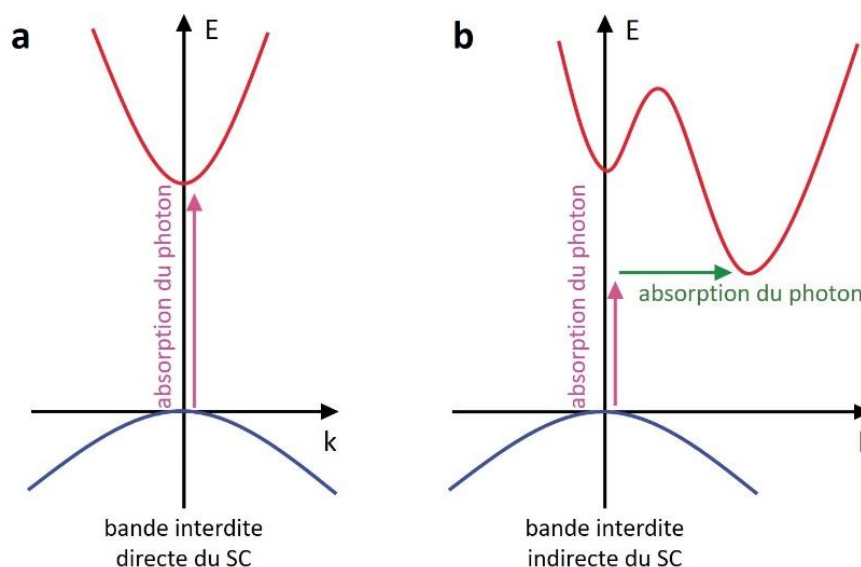


Figure 3.6 : Schéma de l'énergie électronique illustrant la transition optique par rapport au vecteur d'onde k dans a) une bande interdite directe SC et b) une bande interdite indirecte SC où l'assistance d'un phonon est nécessaire pour assurer la transition.^[4]

Le choix du type de bande interdite du SC, direct ou indirect, est important selon l'application souhaitée. La bande interdite directe est plus favorable pour une émission de lumière générée par la recombinaison des e^- et des h^+ qui est rapide, par exemple avec le Si amorphe et quelques matériaux III-V tels que l'arséniure d'indium (InAs) ou l'arséniure de gallium (GaAs). Ce type de SC est retrouvé dans les LED ou les diodes laser. La recombinaison radiative est cependant plus lente pour les SC à bande interdite indirecte car elle implique l'émission d'un phonon. À l'inverse, ces SC sont plus adaptés pour absorber les photons et les convertir en charges. Comme l'absorption du photon est plus lente car elle implique également celle d'un phonon, la lumière peut donc pénétrer plus profondément dans le matériau avant qu'il convertisse les photons en paires e^-/h^+ , à condition que le matériau soit assez épais pour ne pas être seulement traversé par les photons.^[4] C'est pourquoi les SC à bande interdite indirecte, comme par exemple le Si cristallin, sont préférables pour une application en photoélectrochimie.

III.1.3. Principe de la photoélectrochimie

III.1.3.1. Interface SC/électrolyte

La photoélectrochimie est un domaine hybride qui traite de l'oxydo-réduction de molécules et/ou d'ions sur une surface sensible à la lumière telle que les SC. La photoélectrochimie est à la jonction entre l'étude de matériaux solides SC dopés et celle de l'électrochimie en solution, aqueuse ou organique. Pour un PECL anodique, l'énergie de la VB du SC doit être supérieure au potentiel

d'oxydation du luminophore et du co-réactif ($E_{VB} > -qE_{ox}^0$ en eV), tandis que la CB doit être inférieure au potentiel de réduction du couple ECL ($E_{CB} < -qE_{red}^0$) pour un PECL cathodique (à noter que le potentiel est multiplié par la charge élémentaire q afin d'homogénéiser les valeurs d'énergie en eV et le signe négatif est négatif car la charge est un électron). Cela permet d'éviter la recombinaison e^-/h^+ et donc la réduction du rendement de la photoconversion.

Lorsque le SC dopé est mis en contact avec la solution électroactive, un flux de charges se produit pour rééquilibrer le niveau énergétique du SC avec celui de l'électrolyte, sans modification des niveaux de la VB et de la CB à l'interface. Avec un SC de type n (avec $E_{VB} > -qE_{ox}^0$), un transfert d' e^- du SC vers l'électrolyte entraîne un abaissement de E_F , et la LUMO du luminophore et du co-réactif restant constante jusqu'à ce que l'équilibre soit établi. Étant donné que la couche à la surface de SC s'appauvrit en e^- et que les h^+ s'accumulent, cette région est appelée zone de déplétion et les bandes VB et CB se courbent vers le haut. Pour les semi-conducteurs de type p (avec $E_{CB} < -qE_{red}^0$), les e^- sont transférés de la HOMO du luminophore et du co-réactif vers le SC ; cela augmente la concentration en e^- dans la couche près de la surface du SC appelée région d'accumulation. Dans ce cas, E_F se déplace vers le haut en raison de l'accumulation d' e^- près de la surface, provoquant une courbure de la bande vers le bas (voir **Figure 3.7**).^[21,22]

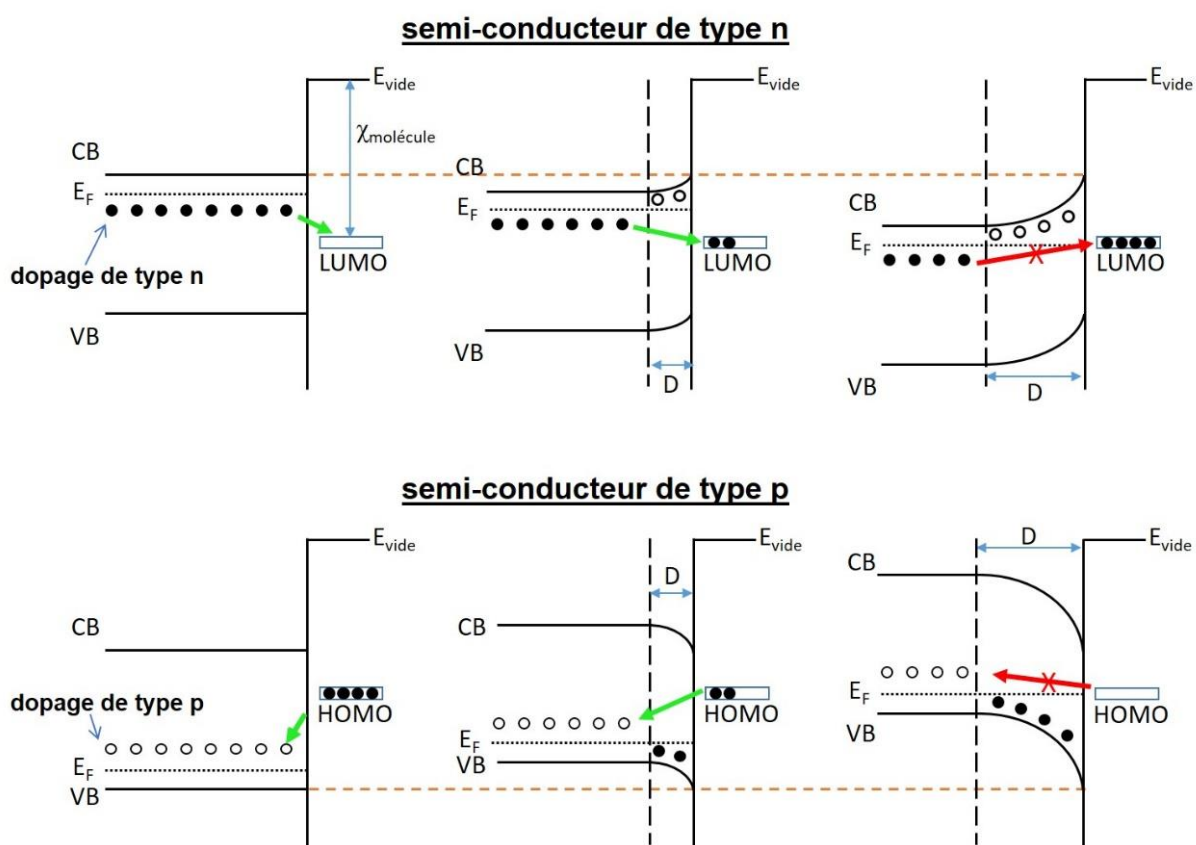


Figure 3.7 : Diagramme d'énergie de SC de type n et de type p , avant le changement d'équilibre (à gauche) et à la fin de l'équilibre (à droite) de la chimisorption de la surface en contact avec l'électrolyte. D est la zone de déplétion, $\chi_{molécule}$ est l'affinité électronique de la molécule redox. Le déplacement d'un e^- (rond noir) entraîne l'apparition d'un trou h^+ (rond blanc). Les e^- ne peuvent pas se déplacer vers un niveau d'énergie supérieur (flèche rouge) mais seulement lorsqu'il est inférieur (flèche verte).^[22]

En réalité, les populations porteuses de charge ne peuvent plus être décrites dans cette situation par un seul niveau de Fermi E_F mais par des niveaux quasi-Fermi séparés pour chaque bande, c'est-à-dire le niveau quasi-Fermi $E_{F,p}$ pour les h^+ , et le niveau quasi-Fermi $E_{F,n}$ pour les e^- . Ces niveaux se séparent lorsque le SC est illuminé et la différence d'énergie est le photovoltage.

III.1.3.2. Photovoltage

C'est grâce au photovoltage V_{OC} que le potentiel à appliquer pour générer la réaction électrochimique est réduit en photoélectrochimie. Sous illumination, le semi-conducteur absorbe la lumière et crée des e^- et des h^+ . Dans le cas du SC de type n , la concentration en h^+ augmente dans la région appauvrie (en e^-). Ces porteurs minoritaires photogénérés, c'est-à-dire les h^+ , sont transférés à l'interface semi-conducteur/électrolyte et peuvent alors déclencher les réactions électrochimiques. L'illumination entraîne la séparation des niveaux quasi-Fermi : le niveau $E_{F,p}$ reste au même niveau que E°_{ox} tandis que $E_{F,n}$ augmente avec la VB et CB (**Figure 3.7a,b**). Le niveau $E_{F,p}$ est alors plus proche de la VB. Le phénomène est inversé pour les SC de type p et illustré dans la **Figure 3.7c,d**. L'écart entre les deux niveaux quasi-Fermi $E_{F,p}$ et $E_{F,n}$ à la jonction semi-conducteur/électrolyte est le V_{OC} . Il peut être mesuré expérimentalement car il correspond à l'écart entre le potentiel du début de la réaction électrochimique à la surface d'une photoanode illuminée et celui d'une anode non photo-active dans le noir. Les charges à plus faibles potentiel sous illumination sont alors photogénérées. Le V_{OC} est aussi repéré par la variation du potentiel de circuit ouvert (« open circuit potential » ou OCP) de la WE dans le noir et sous illumination. À noter que dans le cas des SC fortement dopés n^{++} ou p^{++} , il n'y a pas de photovoltage car ils sont plus conducteurs et non photoactifs.

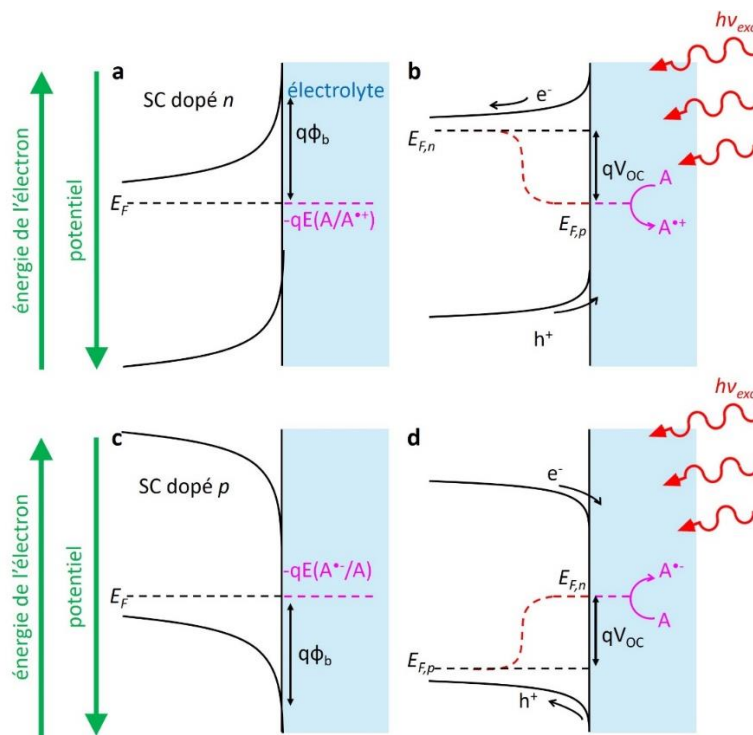


Figure 19.7 : a) Schéma montrant un SC de type n en équilibre avec un électrolyte contenant le couple rédox (A/A^{**}) et b) un SC de type p en équilibre avec un électrolyte contenant le couple rédox (A^+/A) , dans l'obscurité

avec une hauteur de barrière $q\Phi_b$ (en eV). Schéma montrant l'effet de l'éclairage ($h\nu_{exc} > E_g$) sur cette jonction avec un SC b) de type n et e) de type p.^[4]

III.2. État de l'art

Les travaux antérieurs sur la PECL sont répertoriés dans le **Tableau 1** ci-dessous. Il n'existe que peu d'articles sur la PECL car l'ECL et la photoélectrochimie sur SC sont deux domaines distincts. Mais surtout, l'ECL se caractérise par l'absence d'illumination extérieure contrairement à la photoluminescence, la rendant peu compatible *a priori* avec la photoélectrochimie. Cependant, le concept avait déjà été proposé par A. J. Bard dans les années 70 qui avait reporté l'ECL par réaction d'annihilation d'un dérivé du diphénylanthracène en milieu organique sur des SC Si dopées p, en phosphore d'indium (InP) et de GaAs.^[5,6]

Tableau 1 : Caractéristiques des systèmes PECL reportés dans la littérature.^[23]

Référence	Type de PECL	SC	Système/ mécanisme ECL	Type d'électrolyte	E_{app} (V) ^a	λ_{exc} (eV)	λ_{em} (eV)	Décalage λ (nm)	Durée de fonctionnement (min)
[5]	anti-Stokes	p-Si p-InP p-GaAs	annihilation	organique	- ^b	1,7 ^c	3	-316	≈ 2
[6]	anti-Stokes	p,n-GaAs p,n-InP	annihilation	organique	1,6 ^d	<1,7	2,8 ^e	-293	- ^f
[11]	anti-Stokes	n-Si	[Ru(bpy) ₃] ²⁺ /TPrA	aqueux	0,5	1,5	1,9	-175	15
[10]	anti-Stokes	n-Si	luminol/H ₂ O ₂	aqueux	-0,1	1,7 ^g	2,9	-300	≈ 3
[12]	Stokes	n-BiVO ₄	L-012/H ₂ O ₂	aqueux	-0,4	3,3	2,5	128	120
[24]	Stokes	n-Fe ₂ O ₃	L-012/H ₂ O ₂	aqueux	-0,2	3	2,5	123	120
[25]	anti-Stokes	TiO ₂ ^h	L-012/H ₂ O ₂	aqueux	0,2	2,3	2,6	-57	- ^f

a : potentiel de début d'émission PECL en V vs. Ag/AgCl par défaut.

b : l'électrode de référence n'est pas indiquée.

c : $\lambda_{exc} = 674$ nm (1,8 eV) est aussi reportée.

d : différence entre le E_{app} anodique et le E_{app} cathodique pour le n-GaAs.

e : pour le système TMPD/DPA (N,N,N',N'-tetraméthyl-p-phénylènediamine /9,10 diphényl-anthracène) sur le n-GaAs.

f : la durée n'est pas reportée.

g : $\lambda_{exc} = 625 \text{ nm}$ (2 eV) est aussi reportée.

h : absorption de la lumière au niveau de nanoparticules d'Or plasmoniques

Les travaux sur la PECL n'ont été repris qu'en 2019 par les groupes de G. Loget à l'ISCR de Rennes et de N. Sojic à l'ISM de Bordeaux sur l'émission photoinduite du système ECL modèle $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ sur une électrode à base de Si dopée n en milieu aqueux et non dans des solvants organiques comme précédemment (**Figure 3.8**).^[11] Ces derniers résultats furent une étape cruciale pour le développement de la PECL. Dans un premier temps, ils ont montré qu'il était possible de stabiliser une photoanode en Si pendant 15 minutes avec un potentiel relativement élevé (autour de 1 V) en milieu aqueux alors que le Si est exposé à la photocorrosion dans ce milieu (voir le suivi du potentiel dans la mesure de chronopotentiométrie CP avec une densité de courant j fixée à 1 mA cm^{-2} , **Figure 3.8.e**). Pour cela, l'électrode fut protégée par une couche isolante de quelques nanomètres de Si oxydé, SiO_x , sous un autre dépôt de métal en Ni de quelques nanomètres également (**Figure 3.8.a**). Cette structure Métal-Isolant-SC (MIS) a ainsi permis la génération de la PECL avec le système ECL le plus utilisé dans le domaine. De plus, la gamme de longueur d'onde d'absorption du Si étant grande (avec un E_g étroit), il a été possible de convertir une lumière IR de basse énergie à 850 nm (issue d'une LED) en une lumière de plus haute énergie à 620 nm (la PECL), le tout avec un V_{oc} réduisant le potentiel électrochimique d'environ 400 mV (**Figure 3.8.c,d**). Les travaux de ce chapitre de thèse reposent principalement sur ces premiers résultats et cette approche.

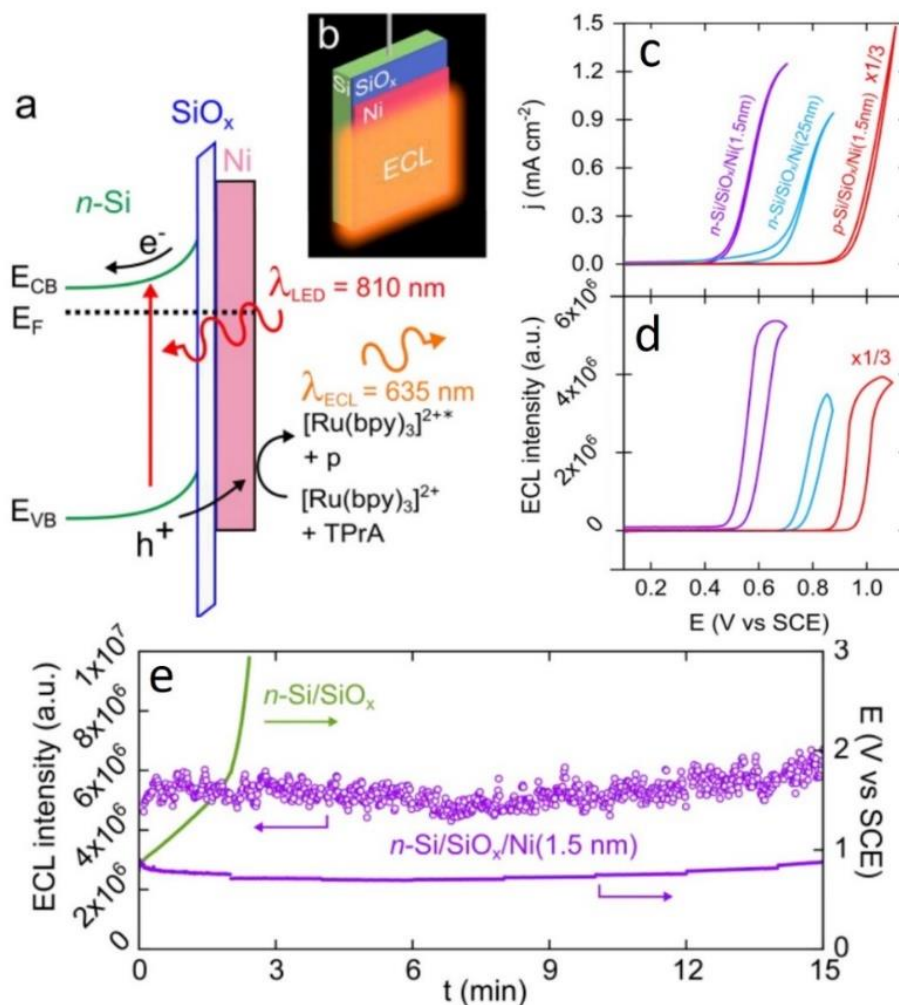


Figure 3.8 : a) Schéma montrant une photoanode MIS $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ au cours de la PECL (le produit secondaire des radicaux TPrA formés pendant le processus ECL est noté P). b) Schéma montrant la structure des électrodes $\text{Si/SiO}_x/\text{Ni}$ utilisées dans cette étude avec émission ECL (λ_{ECL}). c) CVs enregistrés dans l'obscurité sur $p^+\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (1,5 nm) (courbe rouge) et sous illumination sur $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (1,5 nm) (courbe violette) et $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (25 nm) (courbe bleue). e) Intensité ECL correspondante par rapport aux courbes c). Ces mesures ont été effectuées dans du PBS ($\text{pH} = 7,3$) avec 5 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPrA à 20 mV s^{-1} . Les courbes rouges en c) et d) ont été divisées par 3 pour plus de clarté. e) Courbes (lignes) de chronopotentiométrie (CPs) enregistrées à une densité de courant j à 1 mA cm^{-2} sur $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (1,5 nm) (courbe violette) et $n\text{-Si/SiO}_x$ (courbe verte) sous illumination à 810 nm, l'évolution de l'intensité ECL sur $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (1,5 nm) est représentée par des cercles violets. Ces mesures ont été effectuées dans du PBS ($\text{pH} = 7,3$) avec 5 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPrA.^[11]

Une année plus tard, le groupe de S. Ciampi utilise la PECL pour une application en imagerie et permettre les contrôles spatial et temporel de la réaction ECL du luminol avec le H_2O_2 à la surface d'une électrode en Si dopé n (Figure 3.9).^[10] Une fois de plus le système permet une conversion de type anti-Stokes de la lumière avec une diminution du potentiel à appliquer. Cette fois-ci, le Si est protégé en milieu aqueux par une monocouche de molécule 1,8-nonadiyne (liaison Si-C-) pour stabiliser le signal ECL et permettre un photo-adressement de la lumière incidente en illumination arrière sur le SC. Les résultats obtenus en imagerie inspireront grandement les travaux de cette thèse dans ce chapitre ainsi que dans le suivant.

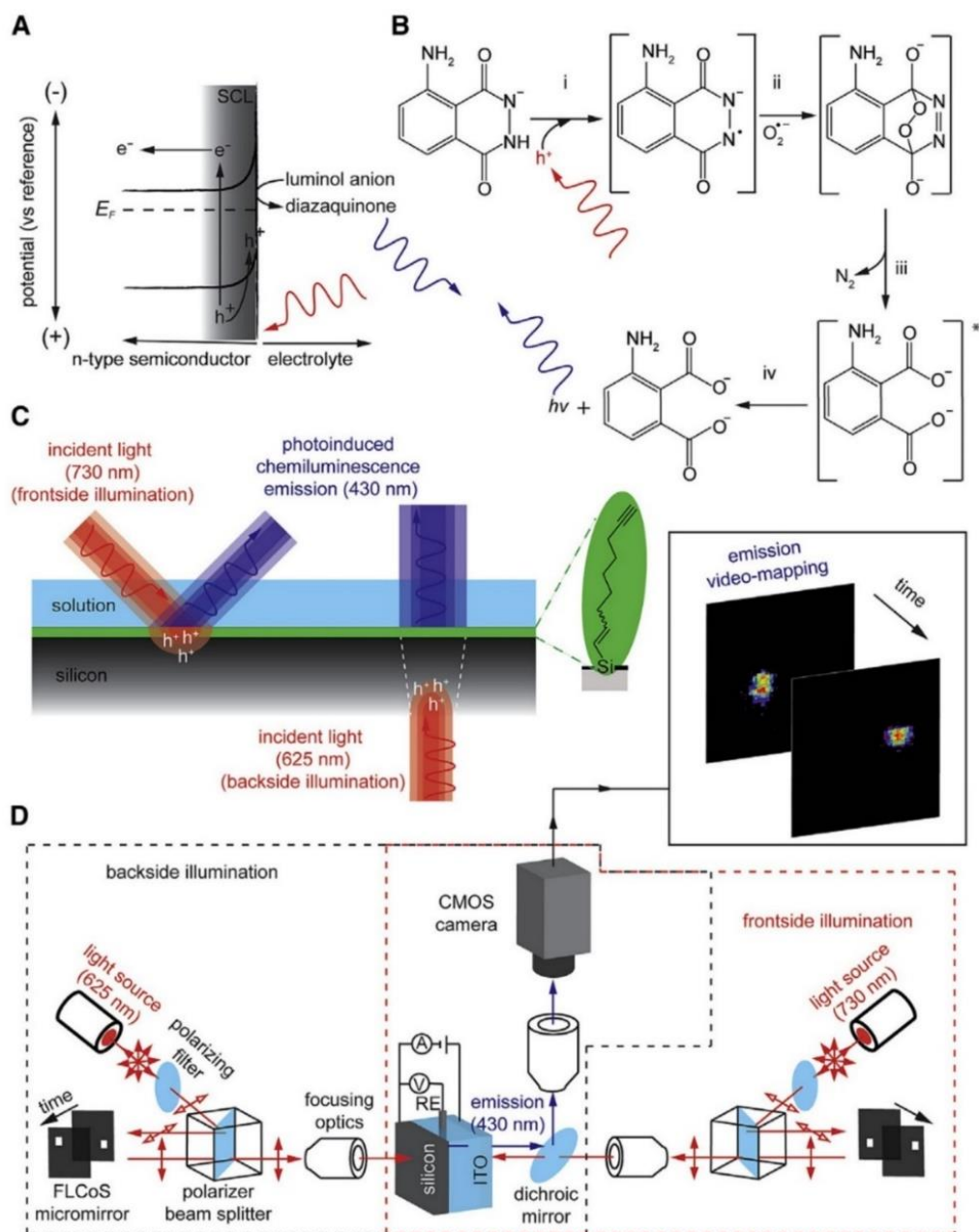


Figure 3.9 : Contrôle spatio-temporel de l'ECL sur une surface macroscopique et non structurée d'un SC. (A) Diagramme de bande d'un SC de type n éclairé. Les photons incidents dont l'énergie est supérieure à la bande interdite (flèches rouges ondulées) créent des paires électrons/trous (e^-/h^+). Le champ électrique présent dans la couche de charge d'espace (SCL) conduit les e^- vers le sc et les h^+ vers l'interface liquide. Les h^+ sont capturés par une molécule de luminol pour produire un radical intermédiaire diazasemiquinone. (B) Mécanisme proposé pour l'ECL anodique photoinduite du luminol. (C) Schémas illustrant la monocouche et le contrôle spatio-temporel de l'ECL en mode d'éclairage avant (gauche) ou arrière (droite). (D) Modulation spatiale 2D du faisceau lumineux réalisée par un réseau de micro miroirs d'éléments à cristaux liquides ferroélectriques sur Si (FLCoS). Des séquences d'images définies par l'utilisateur (réseaux de 3,1 millions de pixels ON-OFF) sont projetées sur le substrat SC. Chaque élément du micro miroir FLCoS peut soit modifier (pixels ON, représentés en blanc), soit laisser inchangée (pixels OFF, représentés en noir) la polarisation de la lumière réfléchiée vers le SC. La présence d'un séparateur de faisceau polariseur entre le FLCoS et le SC crée une image « pixels ON uniquement » sur ce dernier. L'image rouge incidente (730 nm ou 625 nm) génère en 2D une émission PECL bleue (430 nm). Les images d'émission sont collectées par une caméra CMOS.^[10]

Le photo-adressage et le potentiel de la PECL en imagerie ont orienté les recherches des différents groupes vers un SC plus adapté pour ces applications. Pour cela, le Si est remplacé par un autre SC de type *n*, l'hématite (α -Fe₂O₃), car il présente une plus faible mobilité de charge. Bien que cette diminution de la mobilité soit associée à un taux de recombinaison plus élevé, elle permettait d'améliorer la résolution du photo-adressage par ECL car les charges photogénérées diffuseraient moins dans le SC.^[24]

La PECL a ensuite été développée pour d'autres applications. Certains auteurs ont montré qu'elle permettait d'amplifier l'intensité lumineuse globalement produite par un chromophore avec un montage PECL en conversion de type Stokes, comme en photoluminescence.^[12] Une photoanode en BiVO₄, prometteuse dans le domaine de la photoélectrochimie,^[15] a été choisie pour photogénérer l'ECL du luminophore L-012, un analogue au luminol qui est optimal à un pH neutre, avec le H₂O₂. Ce sont les premiers résultats qui montrent explicitement les bénéfices que peut tirer la microscopie PL de la PECL. Dans une autre série d'expérience, la possibilité d'utiliser l'ECL comme source d'excitation du SC a été démontrée expérimentalement. Pour cela, un système « émetteur/récepteur » a été mis en place : l'émetteur ECL correspondait à une électrode non photo-active en carbone et le récepteur était une électrode photo-active en Si dopé *p* recouverte par une couche mince de Ni.^[26]

III.3. Développement de la PECL de type anti-Stokes sur du Si

III.3.1. Objectifs

III.3.1.1. Développement d'une photoanode modèle par ingénierie de surface

Le premier objectif de ce chapitre de thèse est de mettre en place un système PECL modèle pour permettre son développement dans des applications en analyse, en imagerie et en microscopie. Dans ce but, l'amélioration de la stabilité de la PECL est cruciale or la meilleure stabilité reportée jusqu'ici est d'environ 15 minutes seulement.^[11] Pour améliorer cette stabilité, l'étude se focalise sur la conception des électrodes qui sont testés avec les couples ECL de référence : [Ru(bpy)₃]²⁺/TPrA en oxydation à pH neutre et le luminol/H₂O₂ en oxydation à pH alcalin.

Pour le choix de la photoanode, plusieurs oxydes de métaux de type *n*, tels que le dioxyde de titane (TiO₂) ou le trioxyde de tungstène (WO₃), ont une grande stabilité chimique.^[27] Cependant, les charges sont moins mobiles dans ces matériaux et la bande interdite E_g est large, ce qui restreint le spectre d'absorption.^[4] La largeur de ce spectre est importante car elle permet de sélectionner des longueurs d'onde d'excitation plus éloignées que celle de l'émission ECL, et donc de mettre en place une conversion de type anti-Stokes avec $\lambda_{exc} > \lambda_{em}$ et d'utiliser la lumière IR pour exciter le SC.

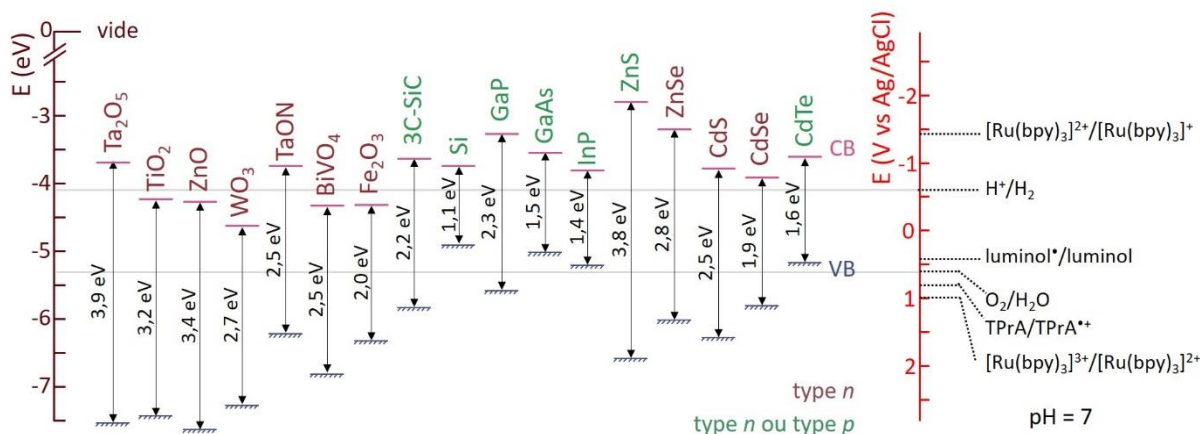


Figure 3.10 : Schéma montrant les positions des VB et CB au niveau des bords des SC sélectionnés et leurs valeurs de bande interdite, ainsi que le potentiel standard des couples redox sélectionnés à pH 7. Les SC de type n sont indiqués en marron et les SC qui peuvent être réalisés en type n ou p sont indiqués en vert. Les valeurs réelles de la bande interdite peuvent varier d'environ 0,2 eV.^[4]

Cependant, les photoanodes capables de fournir un spectre d'absorption large, donc avec un petit E_g , sont sensibles à la photocorrosion, autrement dit l'oxydation du métal solide en ion solvaté en solution (**Équation 3.4**),



Le problème de photocorrosion est d'ailleurs un sujet d'intense recherche dans le domaine des cellules photoélectrochimiques.^[28] La photopassivation (**Équation 3.5**) est un autre domaine d'instabilité de l'électrode avec la formation d'une couche protectrice qui par ce fait empêche la poursuite de la corrosion (**Équation 3.4**) mais qui peut être imperméable aux transferts d' e^{-} à la surface de l'électrode,



Avec la zone d'immunité dans laquelle le métal est naturellement stabilisé, la corrosion et la passivation sont les zones d'instabilité du métal qui sont délimitées par les diagrammes potentiel/pH de Pourbaix.^[29] Malgré les problèmes d'instabilité des photoanodes^[30], le Si est un SC particulièrement approprié pour la PECL de type anti-Stokes en raison de son abondance, de sa non-toxicité et de sa bande interdite étroite à $E_g = 1,12$ eV (**Figure 3.10**) permettant d'utiliser une λ_{exc} jusqu'au proche IR à 1107 nm. Pour ces raisons, il s'agit du semi-conducteur le plus important de l'industrie photovoltaïque^[31] et d'un candidat de choix pour les dispositifs photoélectrochimiques.^[32,33]

L'application d'un revêtement protecteur sur Si est une stratégie pour résoudre ce problème^[34,35] et plusieurs publications ont rapporté des propriétés de photoanodes en Si stabilisées avec des films minces à base de Ni pour la réaction d'oxydation de l'eau à pH élevé.^[36-41] À partir de ces recherches, il a récemment été possible de réaliser de la PECL dans un électrolyte aqueux en utilisant des photoanodes métal-isolant-SC (MIS) comprenant un substrat absorbant Si de type n (n-Si), une couche isolante à effet tunnel SiO_x et un film mince métallique (en Ni) protecteur exploité avec le système modèle $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$.^[11] La photoanode est notée n-Si/ SiO_x /Ni. En effet, les photoanodes en Si de type n basées sur la jonction MIS, attirent une attention considérable en raison

de leurs propriétés car il a été rapporté qu'elles peuvent être utilisées pour oxyder l'eau de manière efficace.^[40,42-44] Pour cela, le film mince métallique doit avoir une épaisseur de l'ordre du nanomètre pour permettre une transmission de la lumière garantissant la photogénération de paires e^-/h^+ dans le SC.^[35] Cette couche métallique joue plusieurs rôles : i) elle protège le SC en évitant sa corrosion,^[28,30] ii) elle assure une collecte efficace des porteurs de charge à travers la couche tunnel isolante SiO_x ,^[35,45] iii) elle garantit une cinétique rapide de la réaction électrochimique,^[46] et iv) elle assure une jonction Schottky à haute barrière pour favoriser un V_{OC} élevée.^[47,48]

On parle de jonction Schottky lorsqu'un SC est en contact avec un autre matériau, en particulier avec un métal.^[49,50] Son nom vient de la règle Mott-Schottky permettant d'expliquer l'alignement des niveaux d'énergie au SC et au métal, dont la hauteur de la barrière de Schottky ϕ_b (« Schottky Barrier Height » ou SBH).^[48] Les e^- libres sont transférés entre le métal et le SC en raison de la différence de leurs fonctions de travail W_M et W_S respectivement. Lorsque la fonction de travail du métal est supérieure à celle du SC ($W_M > W_S$), les e^- sont transférés de la CB du SC vers le métal jusqu'à ce que les niveaux de Fermi du métal ($E_{F,M}$) et du SC ($E_{F,S}$) soient alignés. Lorsque les e^- pénètrent dans le métal, le niveau $E_{F,S}$ et les bords des bande du semi-conducteur diminuent jusqu'à ce que $E_{F,S}$ soit égal à $E_{F,M}$. Ce réarrangement est défini comme une courbure des bandes d'énergie ou « band bending » en anglais, de la même manière que lorsqu'un SC est mis en contact avec un électrolyte. Le degré de courbure des bandes d'énergie du SC à l'interface métal/SC est égal à la différence entre les fonctions de travail du métal et du SC,

$$V_{BB} = |W_M - W_S| \quad (3.3)$$

C'est lorsque $W_M > W_S$ avec un SC de type n que la barrière de Schottky ϕ_b se forme à l'interface métal/SC,

$$\phi_b = (W_M - \chi_S) \quad (3.4)$$

Avec χ_S étant l'affinité électronique du SC. À l'inverse, quand $W_M < W_S$ avec un SC de type n , il n'y a pas de barrière Schottky et le contact entre le métal et le SC est ohmique.^[21]

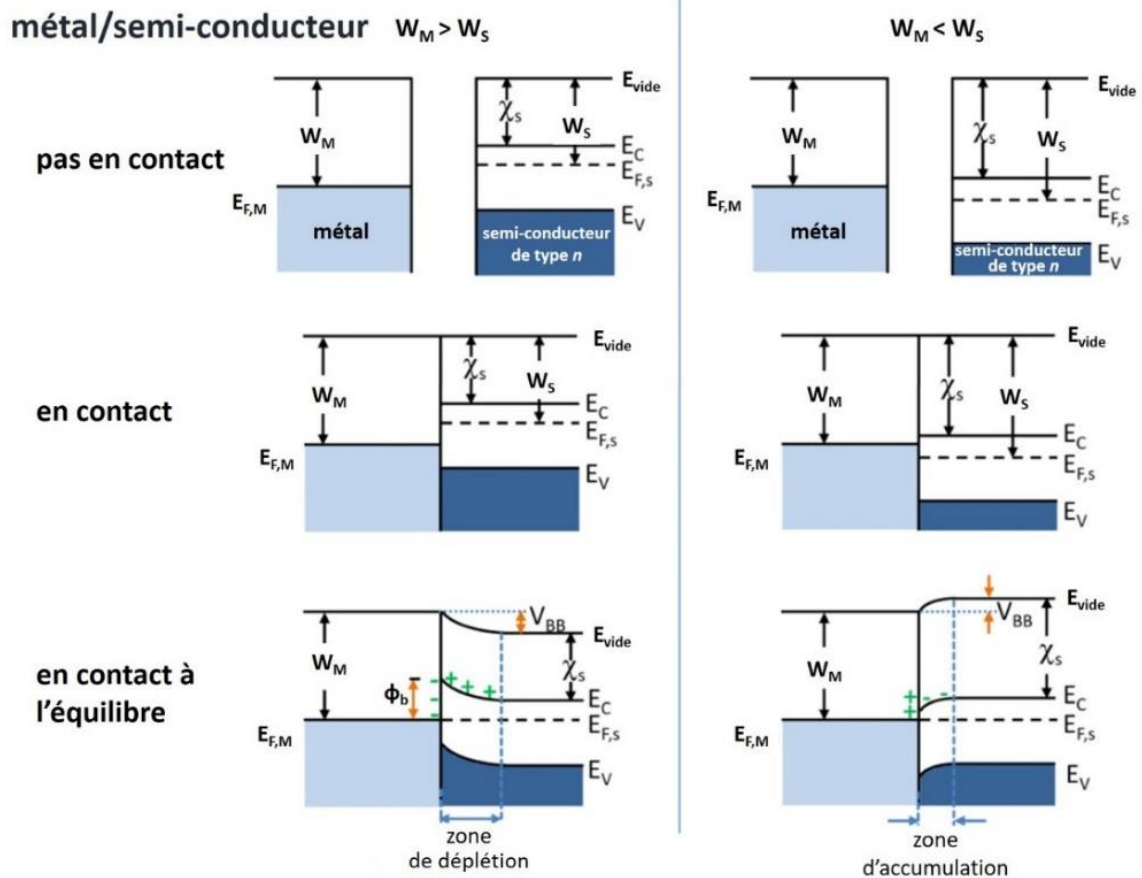


Figure 3.11 : Diagramme des bandes d'énergie du contact entre un métal et un SC de type n. E_{vide} est l'énergie du vide; E_c est l'énergie minimum de la CB; E_v est l'énergie maximum de la VB; W_M est la fonction de travail du métal; W_S est la fonction de travail du SC; χ_s est l'affinité électronique du SC.^[21]

III.3.1.2. Développement d'un système PECL cathodique original

Le Si sera également choisi pour étudier la PECL en voie cathodique, inexplorée depuis le milieu des années 70, lorsque le PECL cathodique anti-Stokes a été proposé avec un dérivé du diphénylanthracène par voie d'annihilation.^[5,6] Pour cela, une photocathode à base de Si dopé p sera utilisée avec le couple ECL comprenant le luminophore $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ et le co-réactif BPO en milieu organique. Ces travaux sont le premier exemple de PECL cathodique avec un luminophore de référence avec une utilisation de type anti-Stokes. Cette étude a pour objectif d'ouvrir la voie à l'utilisation d'autres SC à bandes interdite étroite qui ont une diffusion plus faible des charges et de permettre la mise en place d'une imagerie par IR, c'est-à-dire une image PECL qui localise exactement la position des photons IR sur le SC (par exemple un motif lumineux IR serait révélé par PECL).

III.3.2. Montage pour la PECL

Le montage pour la détection et l'analyse de la PECL s'apparente à celui utilisé en microscopie à épifluorescence. Similairement à la PL, il comprend une lumière d'excitation λ_{LED} , provenant d'une LED monochromatique, qui irradie le SC pour qu'il puisse générer une lumière d'émission λ_{PECL} issue de l'ECL du luminophore avec le co-réactif. La lumière d'excitation λ_{LED} diffusée par la LED est réfléchiée par le miroir dichroïque qui l'oriente vers le SC. La lumière émise par PECL λ_{PECL} se propage à travers le miroir dichroïque, qui filtre la lumière de la LED, pour atteindre une fibre optique. Cette fibre est couplée à un spectromètre afin de réaliser des mesures d'intensité et d'identifier le spectre d'émission du signal PECL.

Il est important de noter que la génération de la PECL nécessite un deuxième apport énergétique qui est fourni par l'application d'une surtension à l'électrode. En effet, le V_{oc} engendré par l'illumination du SC est souvent insuffisant par rapport à la surtension requise pour déclencher les mécanismes ECL. Pour cela, le SC est placé dans une cellule électrochimique conçue pour un montage à 3 électrodes. Le SC qui joue le rôle de WE est disposé verticalement pour être orienté perpendiculairement à la direction de la lumière d'excitation. Le SC est en contact depuis l'extérieur d'une fenêtre avec l'électrolyte dans lequel sont plongées la REF et la CE.

Dans les montages étudiés, la conversion de la lumière excitatrice est de type anti-Stokes ($\lambda_{LED} < \lambda_{PECL}$) dans l'optique de pouvoir réaliser de l'imagerie IR. La longueur d'onde de la LED est choisie à 850 nm car cette valeur est un compromis entre un bon rendement de conversion par le Si, dont le taux d'absorption diminue lorsque la longueur d'onde augmente, et une invisibilité à l'œil nu. Pour une étude ciblée sur la stabilité, il a été choisi d'impliquer des couples ECL robustes et efficaces tels que les systèmes modèles $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$ et luminol/ H_2O_2 .

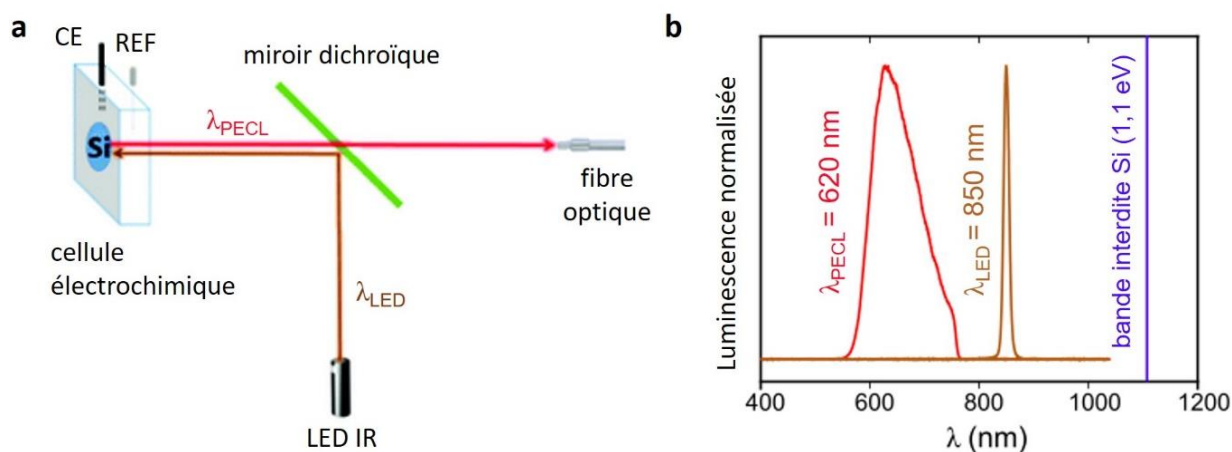


Figure 3.12 : a) Schéma du montage de photoélectrochimie employé pour étudier la PECL. b) Spectres normalisés de l'émission de la LED (marron), de l'émission par PECL (rouge) du système ECL $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$ et position de l'énergie de la bande interdite du Si (bleu).^[51]

III.3.3. Développement de la PECL cathodique avec le luminophore de référence $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

III.3.3.1. Introduction

Les travaux présentés ici rapportent le premier exemple de PECL avec le système modèle $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ /BPO sur une photocathode nue de Si de type *p*. La PECL cathodique est générée sur cette électrode (*p*-Si) en utilisant le mécanisme co-réactif dans lequel $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ agit comme le luminophore et le BPO comme le co-réactif sacrificiel, comme représenté sur la **Figure 3.13**. Les réactifs ECL sont mélangés dans un solvant organique, l'acétonitrile (ACN), en présence de l'électrolyte support hexafluorophosphate de tétrabutylammonium (TBAPF₆). Dans les expériences présentées, le *p*-Si est stable en polarisation cathodique contrairement à la polarisation anodique car aucune dégradation n'est attendue. En effet la solution est sèche et préalablement dégazée sous argon. De plus, le Si est hydrogéné (traités par une solution de HF à 10 %) juste avant d'être rapidement immergé dans l'électrolyte, pour éviter la formation d'une couche d'oxyde de Si, et utilisé sous polarisation cathodique. Comme présenté dans le schéma de **Figure 3.13**, des e⁻ libres sont photogénérés sous illumination IR au sein de la couche de Si et peuvent diffuser vers la zone de déplétion près de la surface du *p*-Si pour participer à la réaction électrochimique avec le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et le BPO, comme détaillé dans la partie I.5.1.2. À l'interface *p*-Si/électrolyte, les électrons réduisent le BPO qui se décompose alors immédiatement et irréversiblement en un ion $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2^-$ et en un radical $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2^\bullet$ fortement réactif.^[52] Les électrons réduisent également $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^+$. Le radical $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2^\bullet$ oxyde le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^+$ avec un transfert d'électrons hautement exergonique conduisant à son état excité $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$. Le luminophore revient alors à l'état fondamental en émettant un photon à $\lambda_{\text{ECL}} = 620$ nm.

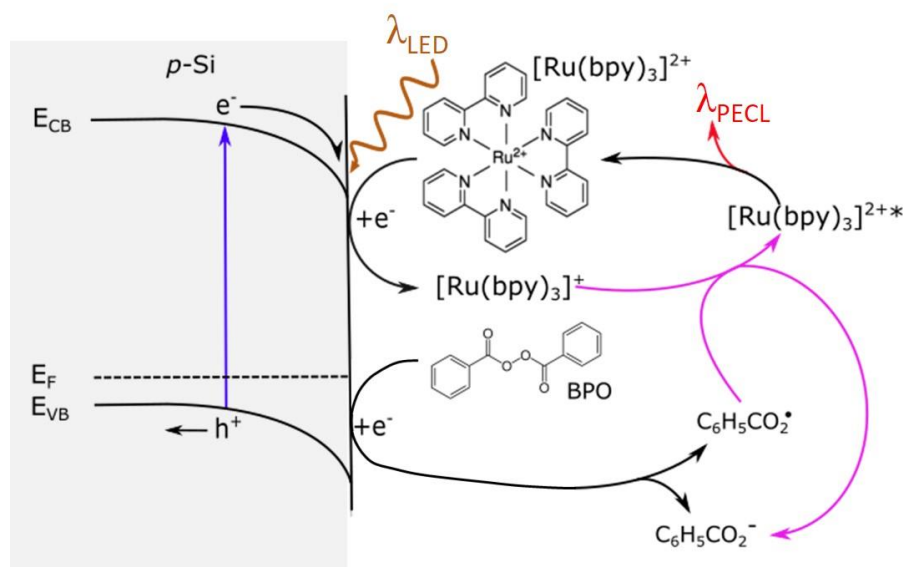


Figure 3.13 : Schéma du processus de transfert de charge photo-induit et du mécanisme de la réaction produite à la photocathode Si, initié par l'absorption de la lumière IR (λ_{LED}) et entraînant l'émission de lumière par PECL (λ_{PECL}).^[51]

III.3.3.2. Résultats et discussions

III.3.3.2.1. PECL cathodique

La photoélectrochimie et l'intensité de l'ECL généré en réduction sur le SC *p*-Si sont d'abord étudiés par voltamétrie cyclique en imposant un potentiel allant de 0 à -2 V (tous les potentiels sont référencés par rapport à une électrode de quasi-référence en fil d'Ag) sous irradiation IR à $\lambda_{LED} = 850$ nm ($6,6 \text{ mW cm}^{-2}$) et dans l'obscurité. L'objectif est dans un premier temps de s'assurer que les charges (e^-) impliquées dans la réaction électrochimique sont bien photogénérés en comparant les mesures de densité de courant sous illumination IR (*p*-Si illuminé) et dans le noir (*p*-Si noir). Il s'agit ensuite de vérifier que l'irradiation du SC entraîne bien une réduction de la surtension à appliquer à l'électrode pour générer la réaction d'ECL et donc de mesurer le V_{OC} . Enfin, ces enregistrements permettent également de vérifier l'impact du système PECL sur l'intensité lumineuse et le mécanisme ECL. Pour ces deux derniers points, la configuration PECL avec le SC *p*-Si est comparée à celle en ECL dans laquelle l'électrode est remplacée par un SC de type *n* fortement dopé (*n*⁺-Si) de sorte à ce qu'il se comporte comme un conducteur et ne nécessite pas d'être excité, *i.e.* il est non photo-actif et est étudié l'obscurité.

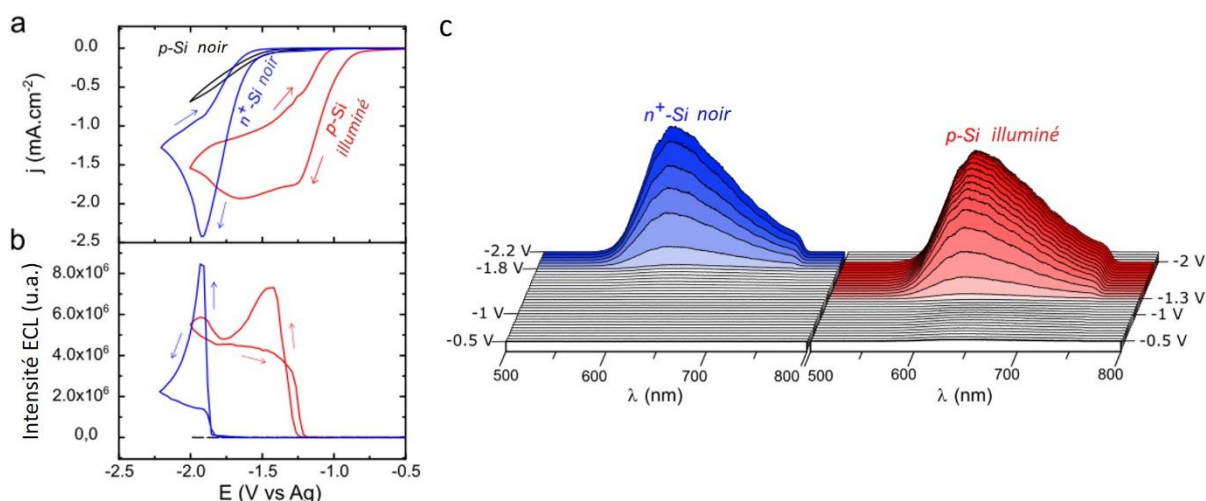


Figure 3.14 : a) CVs enregistrés sous illumination IR sur une électrode *p*-Si (rouge) et dans le noir sur des électrodes *p*-Si (noir) et *n*⁺-Si (bleu). b) Profils d'intensité ECL correspondants. c) Spectres d'émission ECL mesuré selon le potentiel imposé. Vitesse de balayage : 50 mV s^{-1} . Les expériences sont réalisées dans une solution avec une concentration contenant $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 1 mM, BPO à 10 mM et 0,2 M de TBAPF₆ dans l'ACN.^[51]

Les CV la **Figure 3.14.a** montrent que même si une densité de courant relativement faible est enregistrée dans l'obscurité, la densité de courant j apparaît plus élevée à partir de -0,69 V sous éclairage IR (courbe rouge). Comme le montre la **Figure 3.14.b**, une forte émission lumineuse est détectée sous illumination IR à partir de -1,24 V, démontrant l'activité PECL de cette photocathode. Les spectres ECL enregistrés lors des CV^[53] montrent une bande d'émission centrée à 620 nm typique de l'état excité par transfert de charge métal-ligand $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ (comme détaillé dans la partie I.3.2.1) que l'ECL soit photo-induit ou non (**Figure 3.14.c**).

Les courbes bleues des **Figures 3.14a** et **3.14b** montrent que l'onde cathodique associée à l'émission ECL avec le n^+ -Si est observée à des potentiels beaucoup plus négatifs. Ce décalage est mis en avant en comparant les spectres 3D ECL collectés sur les deux SC n^+ -Si et p -Si lors des CV (**Figure 3.14.c**). Cela met en évidence l'effet de photovoltage, généré dans le Si appauvri en électrons, qui déplace le potentiel de début d'émission vers des valeurs moins négatives. Les CV présentent un décalage de +510 mV en PECL à la photocathode p -Si par rapport à l'ECL à la cathode n^+ -Si. Pour aller plus loin, une étude comparative réalisée sur une série de 7 photocathodes p -Si et de 5 cathodes n^+ -Si révèle que les valeurs potentielles de début d'émission peuvent varier dans une plage de potentiel d'environ 200 mV. Ce comportement est attribué à la différence d'état de surface du Si, qui peut être altérée lors de sa manipulation dans l'air entre l'hydrogénation chimique et l'étude électrochimique.

III.3.3.2.2. Stabilité du PECL cathodique

La stabilité du signal PECL est ensuite étudiée avec un potentiel imposé à $E_{app} = -1,6$ V en allumant alternativement la LED IR pendant 5 min et en l'éteignant pendant 1 min sur une durée totale de 30 minutes.

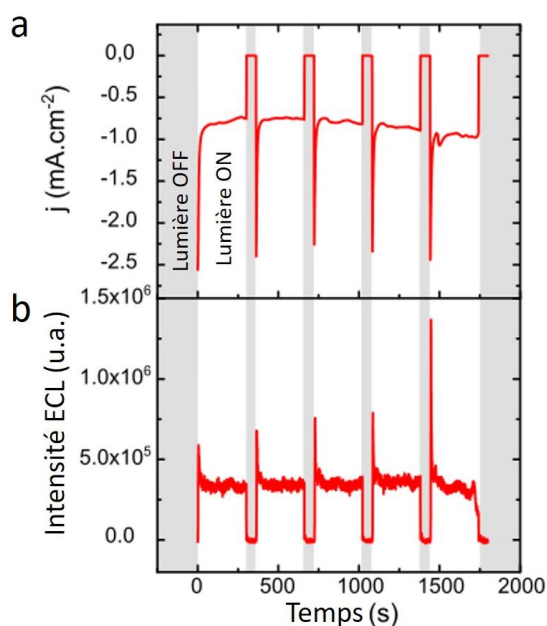


Figure 3.15 : a) Chronoampérogramme mesuré à un potentiel de -1,6 V appliqué à une électrode p -Si irradiée par une LED IR successivement allumée puis éteinte. b) Intensité ECL correspondante. Les expériences sont réalisées dans une solution avec une concentration en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 1 mM, en BPO à 10 mM et avec 0,2 M de TBAPF_6 dans de l'ACN.^[51]

Le chronoampérogramme (CA) de la **Figure 3.15** montre que la densité du photocourant et les signaux PECL sont parfaitement stables pendant au moins 30 minutes. Cette stabilité met en évidence que le Si ne présente pas de changement à sa surface au cours de la réaction. En effet, le test est effectué à l'air libre en présence de O_2 , H_2 ou H_2O avec une potentielle variation de la composition de l'ACN, aurait pu modifier l'intensité du photo-courant au cours du temps. Ces résultats montrent qu'une émission PECL stable peut être générée au niveau de photocathodes à base de p -Si hydrogéné. À chaque

extinction de lumière, le photo-courant devient instantanément nul, de même pour l'intensité PECL. De ce fait, l'émission PECL répond instantanément aux conditions d'éclairage. La **Figure 3.15** met aussi en évidence une bonne corrélation entre l'intensité ECL et le courant. Dès que la LED est allumée, la PECL présente un courant capacitif pendant quelques secondes pour atteindre un plateau correspondant au courant faradique. L'intensité ECL suit la même tendance avec une intensité maximale au début du courant capacitif puis un plateau lorsque le courant est stabilisé. Cette réactivité est encourageante pour le développement de la PECL en réduction pour des applications en analytique ou en imagerie IR.

III.3.3.3. Conclusion

Ces travaux constituent le premier exemple de PECL cathodique qui implique le luminophore de référence en ECL, le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. L'émission se produit par une voie d'oxydation réductrice avec le BPO utilisé comme co-réactif sacrificiel. Cette étude a démontré que le *p*-Si hydrogéné peut être utilisé pour le PECL anti-Stokes afin de convertir la lumière infrarouge invisible ($\lambda_{\text{LED}} = 850 \text{ nm}$) en lumière visible ($\lambda_{\text{PECL}} = 620 \text{ nm}$) avec une stabilité de fonctionnement satisfaisante. De plus, l'usage d'une photocathode est une alternative relativement simple et fiable pour la conversion de type anti-Stokes de la PECL lorsqu'elle est utilisée avec des systèmes ECL cathodiques. Les prochaines études sur la PECL porteront sur la voie anodique en milieu aqueux car elle offre des perspectives pour le développement de la bio-imagerie ou l'étude de matériaux en photoélectrochimie, par exemple pour des applications dans les piles à combustibles ou « fuels cells » en anglais.

III.3.4. Développement d'une photoanode MIS modèle avec le système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$

III.3.4.1. Introduction

Un des axes d'amélioration de la stabilité de la PECL anodique en milieu aqueux repose sur le choix du métal de la structure MIS. En effet, la structure *n*-Si/SiO_x/Ni qui a été étudiée pour le système modèle $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ n'est pas idéale par rapport au pH de la solution (7,4) et au potentiel appliqué (supérieur à 1 V),^[11] ce qui favorise la dissolution du film mince de Ni et provoque la dégradation de la photoanode après quelques dizaines de minutes.^[29] D'après les diagrammes de Pourbaix, les métaux Ru, Pt et Ir semblent être de meilleurs candidats que le Ni.^[29] De plus, ces métaux sont connus pour leurs bonnes activités électrocatalytiques et possèdent des W_M élevées entre 4,7 eV et 5,9 eV,^[54,55] essentielles pour créer une jonction photoactive avec le *n*-Si et produire des V_{oc} élevées.^[48] L'étude des trois photoanodes de structures *n*-Si/SiO_x/M avec M correspondant à l'Ir, au Pt ou au Ru, pour la conversion de type anti-Stokes par PECL du système modèle $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ est présentée ci-dessous.

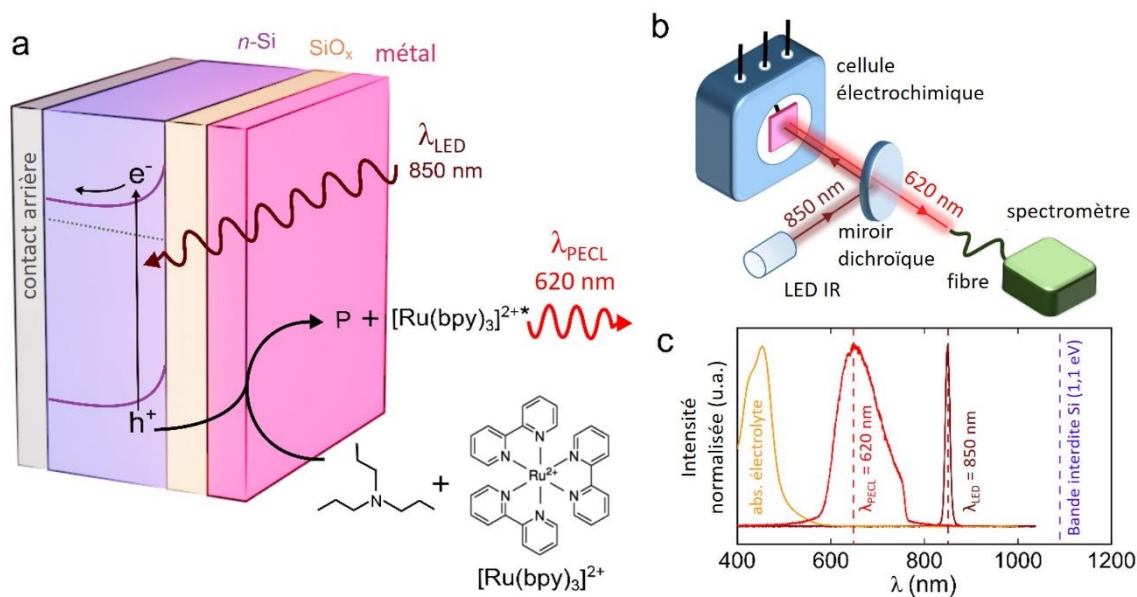


Figure 3.16 : a) Schéma du processus de transfert de charge photoinduit de la photoanode MIS vers l'électrolyte, initié par l'absorption de la lumière IR (λ_{LED}) et générant l'émission d'une lumière visible (λ_{PECL}) par PECL du système $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$. b) Schéma du montage PECL. c) Spectres normalisés d'absorption (orange), d'émission de la LED utilisée (marron), de l'émission PECL (rouge) et de la position de la bande interdite du Si (bleu).^[23]

III.3.4.2. Préparation et caractérisation des surfaces MIS

Les électrodes sont fabriquées au laboratoire ISCR. Elles sont d'abord préparées en oxydant chimiquement des surfaces de $1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$ de Si (100) dopé et préalablement nettoyé pour former la couche tunnel SiO_x à une épaisseur contrôlée entre 1,5 et 2 nm.^[39,56] Ensuite, la couche SiO_x est recouverte par un dépôt métallique de 3 nm d'épaisseur par pulvérisation magnétron à courant continu. Cette valeur d'épaisseur est spécifiquement choisie car des recherches antérieures dans le domaine des anodes MIS à base de Si ont révélé que des épaisseurs de métal inférieures à 5 nm favorisent les performances photoélectrochimiques, c'est-à-dire le V_{oc} et le rendement quantique ϕ .^[11,36,38] Cette épaisseur est contrôlée *in situ* à l'aide d'une microbalance à cristal de quartz (QCM) et contrôlée *ex situ* par microscopie à force atomique (AFM). L'AFM permet également de mesurer la rugosité des surfaces métalliques. De cette manière, les images AFM des surfaces Si/ SiO_x /Ru, Si/ SiO_x /Pt et Si/ SiO_x /Ir présentées sur la **Figure 3.17** ci-dessous révèlent une planéité et une uniformité des films métalliques avec des faibles valeurs de rugosité quadratique moyenne (« roughness mean square » ou RMS) de 0,36, 0,28 et 0,33 nm respectivement.

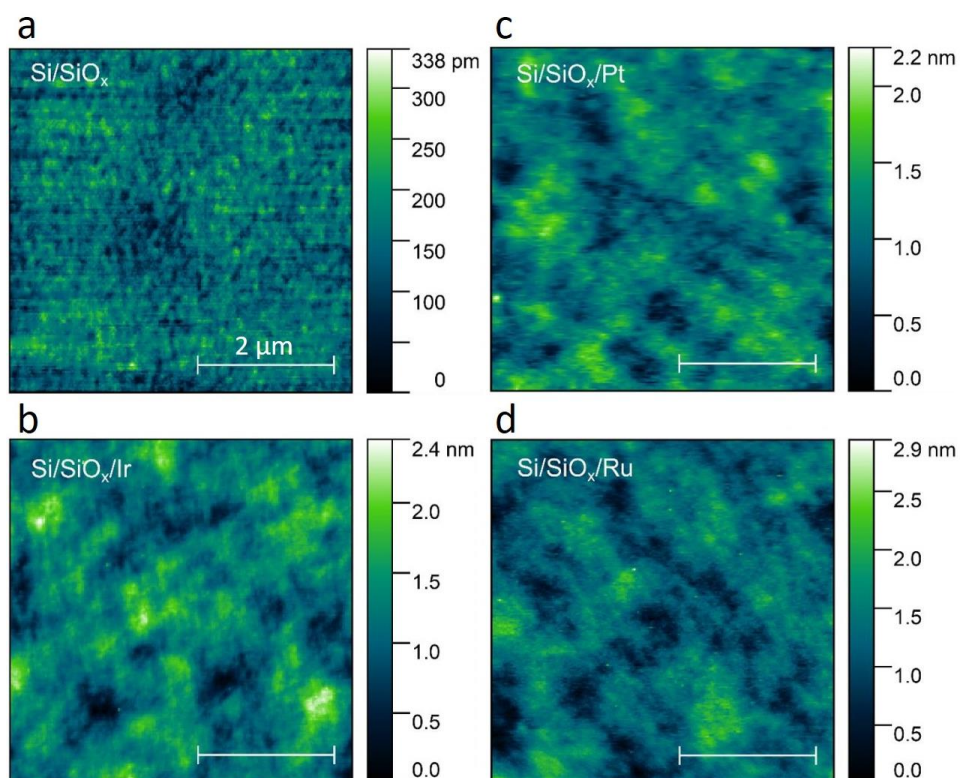


Figure 3.17 : Images AFM de la surface p^{++} -Si/SiO_x a) avant dépôt, b) p^{++} -Si/SiO_x/Ir, c) p^{++} -Si/SiO_x/Pt et d) p^{++} -Si/SiO_x/Ru après dépôt métallique.^[23]

III.3.4.3. Études des surfaces MIS en ECL

III.3.4.3.1. Comparaison des CVs des électrode MIS en ECL

Dans un premier temps, les électrodes MIS sont évaluées avec le système ECL $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ /TPrA. Pour s'affranchir de l'impact de l'irradiation de l'électrode lors des mesures ECL, les électrodes étudiées sont fabriquées à partir du Si fortement dopé p (notées p^{++} -Si) qui est non photo-actif avec une faible résistivité.

L'effet du film mince métallique sur les trois anodes p^{++} -Si/SiO_x/M est analysé par CVs et par mesure de l'intensité ECL correspondantes dans l'électrolyte ECL comprenant de la TPrA à une concentration de 0,1 M et du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 5 mM mélangés dans du PBS à 0,1 M (pH = 7,4). Les résultats sont présentés dans la **Figure 3.18** ci-dessous. Celle-ci présente les CVs (**Figure 3.18.a**) et les courbes d'intensité ECL en fonction du potentiel correspondant (**Figure 3.18.b**)

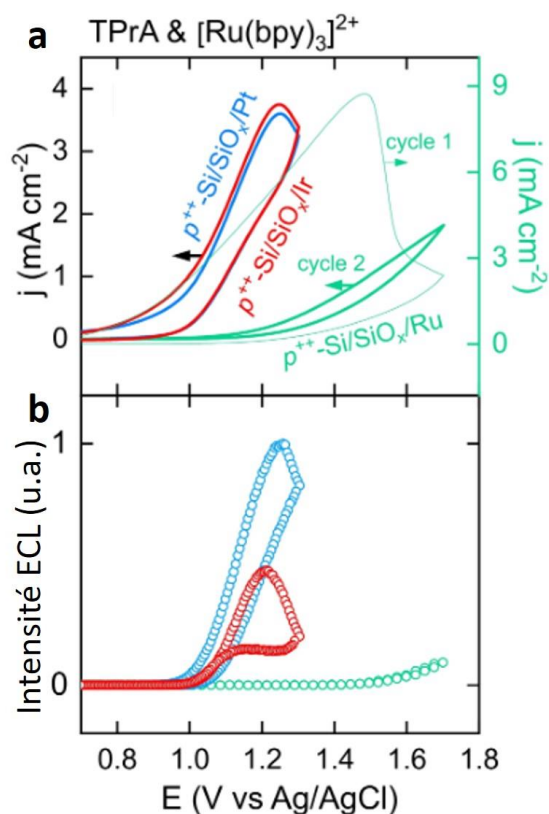


Figure 3.18 : a) CVs mesurés dans le noir en présence de 5 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de 0,1 M TPrA dans du PBS à 0,1 M (pH 7,4) sur une électrode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (rouge), $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (bleu) et $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$ (vert). b) Intensités ECL correspondantes, dont celle du $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$ correspond au cycle 2. Vitesse de balayage : 50 mV s^{-1} .^[23]

Les courbes de densité de courant entre les anodes $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (courbes rouges) et $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (courbes bleues) sont similaires et génèrent toutes deux une émission ECL à partir de 1 V. Quant à l'anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$, elle présente un comportement différent. La première observation est que cette anode a une activité plus faible car elle permet la génération de l'ECL qu'à un potentiel supérieur à 1,35 V. Ensuite, les caractéristiques électrochimiques de cette électrode changent entre deux cycles de balayages. Le premier cycle, représenté par une fine ligne verte sur la **Figure 3.18**, présente une vague d'oxydation avec une valeur de j jusqu'à $8,7 \text{ mA cm}^{-2}$, tandis que le cycle suivant présente une valeur de j plus petites inférieures à $1,7 \text{ mA cm}^{-2}$ avec une intensité ECL décroissante.

III.3.4.3.2. Étude du cas de l'électrode MIS avec le Ru

Pour aller plus loin dans l'étude électrochimique de l'anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$, plusieurs cycles de CV ont été effectués (jusqu'à 6). Une fois de plus, la valeur de j diminue dès le deuxième cycle et reste stabilisée (**Figure 3.19.a**). Pour mieux comprendre l'origine de cette baisse, deux CVs sont réalisés sur l'anode en l'absence des réactifs ECL, c'est-à-dire dans un électrolyte avec uniquement du PBS (**Figure 3.19.d**). Un comportement similaire est observé dans ces conditions, ce qui suggère que le courant important observé lors du premier balayage est principalement dû à l'oxydation du film mince de Ru et à l'oxydation de l'eau. Ces observations sont en bon accord avec les mesures AFM présentées sur la **Figure 3.19.c**, complétées par le profil d'épaisseur d'une électrode après 20 cycles d'ECL avec le

système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ sur la **Figure 3.19.e**. Elles présentent une forte rugosité de la surface indiquant que celle-ci a été impactée par la réaction électrochimique. L'évolution des CVs s'explique alors par un fort endommagement du film mince de Ru au cours du premier cycle, conduisant à sa désactivation et à une baisse de la densité de courant.

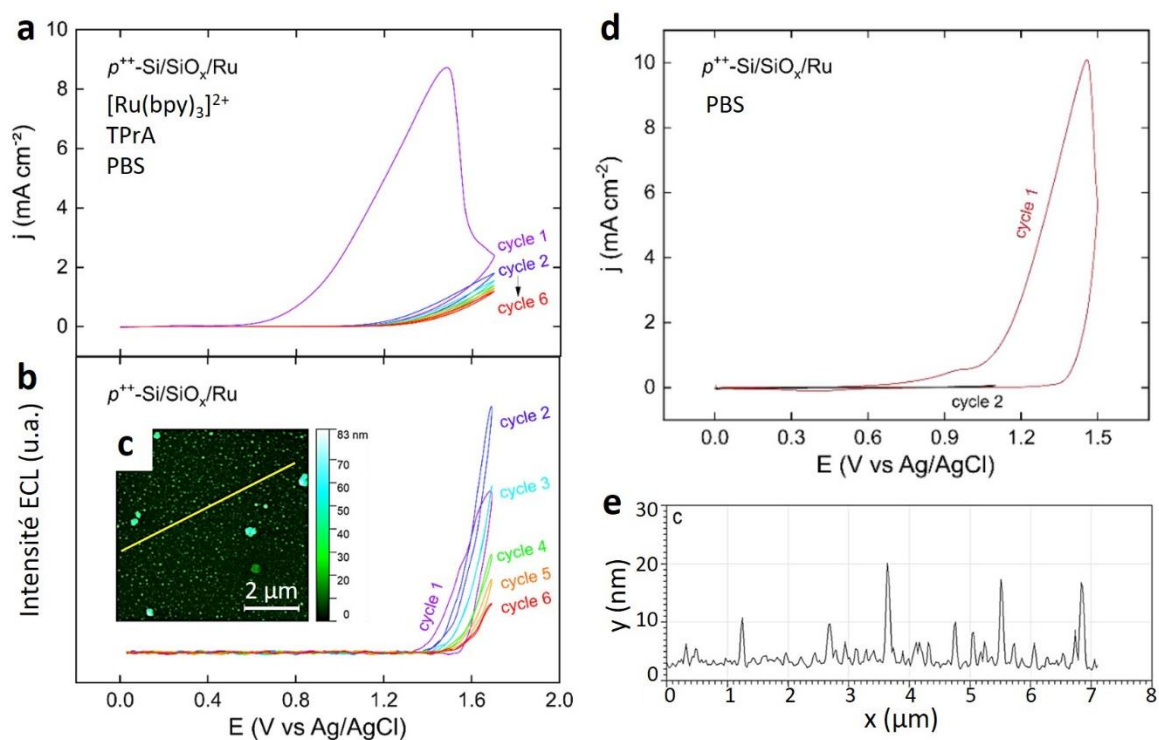


Figure 3.19 : a) CVs mesurés dans le noir en présence de 5 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de 0,1 M TPrA dans du PBS à 0,1 M (pH 7,4) sur une électrode $p^+-\text{Si}/\text{SiO}_x/\text{Ru}$. b) Intensités ECL correspondantes. c) Image AFM de la surface du après 20 cycles de CV de 0 à 1,5 V dans les mêmes conditions que a). d) Les deux premiers cycles de CV mesurés sur le $p^+-\text{Si}/\text{SiO}_x/\text{Ru}$ dans le noir et dans du PBS seulement. e) Profil d'épaisseur de la ligne blanche tracée sur l'image AFM. Vitesse de balayage des CVs : 50 mV s^{-1} .^[23]

III.3.4.3.3. Stabilité des électrode MIS en ECL

La stabilité des trois électrodes MIS est ensuite évaluée par des mesures galvanostatiques dans lesquelles potentiel anodique a été surveillé lorsque j est fixée à 1 mA cm^{-2} . Une partie de ces analyses est réalisée au laboratoire ISCR. Dans ces tests, l'électrolyte n'est plus à l'état stationnaire et circule dans la cellule à l'aide d'une pompe péristaltique avec un débit à $0,7 \text{ mL s}^{-1}$. Le transport de masse des réactifs ECL à l'interface solide/liquide est alors plus efficace conduisant à une émission ECL homogène et plus intense pour une longue durée.^[26]

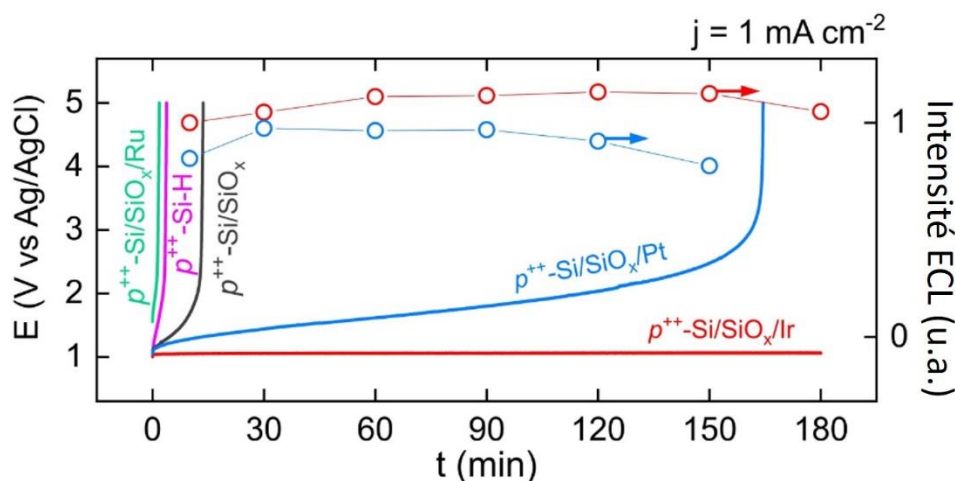


Figure 3.20 : Mesures CPs enregistrées (lignes continues) dans le noir à une densité de courant de 1 mA cm^{-2} sur une électrode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$ (vert), $p^{++}\text{-Si-H}$ (rose), $p^{++}\text{-Si/SiO}_x$ (noir), $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (bleu) et $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (rouge). Les intensités ECL correspondantes sont représentées par des cercles bleus pour $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ et des cercles rouges pour $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$. Les expériences sont réalisées dans une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 5 mM et de TPrA à 0,1 M dans du PBS à 0,1 M (pH 7,4).^[23]

Les chronoampérogrammes (CPs) de la **Figure 3.20** ci-dessus montrent que le $p^{++}\text{-Si}$ fraîchement hydrogéné, noté $p^{++}\text{-SiH}$, (rose), le $p^{++}\text{-Si/SiO}_x$ sans revêtement métallique (gris) et le $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$ (vert) sont les moins stables. Ces trois électrodes présentent une augmentation de potentiel survenant quelques minutes après le début de l'essai, résultant de la dégradation de l'interface des électrodes. Cette instabilité témoigne de la nécessité de protéger l'anode Si en milieux aqueux et confirme les observations évoquées précédemment concernant l'électrode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$.

Par rapport à ces anodes, le $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (bleu) est plus stable et fonctionne à un potentiel inférieur à 2 V pendant près de 2 h. Cependant, cette électrode se dégrade après 160 minutes, entraînant une augmentation de son potentiel. À l'inverse, le potentiel du $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (rouge) reste constant pendant 3 h. Dans ces conditions, $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ et $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ ont produit une émission ECL intense et visible à l'œil nu pendant toute l'expérience (cercles sur la **Figure 3.20**). L'anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ est donc l'électrode la plus prometteuse pour le développement des applications PECL et mérite une analyse plus poussée.

III.3.4.3.4. Effet des réactifs sur l'électrode MIS avec l'Ir en ECL

Pour aller plus en détail, les effets de chacun des réactifs ECL dissous dans le PBS sont étudiés sur l'anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$. Les CVs (**Figure 3.21.a**) et les intensités ECL (**Figure 3.21.b**) sont enregistrés sur chaque réactif individuellement, puis comparés au mélange ECL.

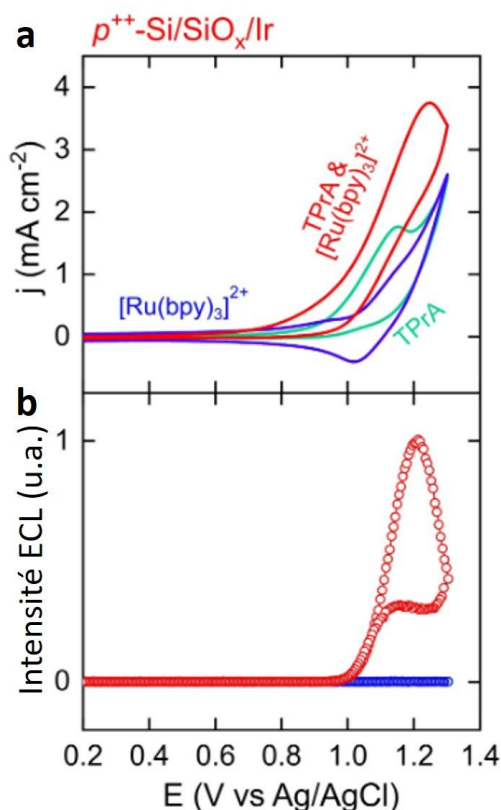


Figure 3.21 : a) CVs mesurés dans le noir sur une électrode $p^+-Si/SiO_x/Ir$ en présence de 5 mM de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ seul (bleu), de 0,1 M TPrA seul (vert) ou du mélange de 5 mM de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ avec 0,1 M TPrA (rouge), dans du PBS à 0,1 M (pH 7,4). b) Intensités ECL correspondantes. Vitesse de balayage : 50 mV s^{-1} .^[23]

Lorsqu'ils sont étudiés individuellement, la TPrA (cyan) et le $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (bleu) sont oxydés à des potentiels supérieurs à 0,9 V et 1 V et n'émettent pas d'ECL détectable. Leurs potentiels d'oxydation sont donc similaires à ceux que l'on peut mesurer sur une électrode classique en GC. Cela prouve aussi que la couche nanométrique d'Ir ne participe pas à la réaction ECL, étant donné qu'il existe aussi des systèmes ECL avec des complexes d'Ir.^[57] Enfin, lorsque le luminophore et le co-réactif sont présents ensemble dans l'électrolyte (rouge), leur oxydation concomitante produit une ECL à partir de 1 V, validant l'aptitude de l'anode $p^+-Si/SiO_x/Ir$ à générer l'ECL à partir du système $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$. Les surfaces peuvent alors être étudiées en montage PECL dans les sous-parties suivantes.

III.3.4.4. Études des surfaces MIS en PECL

III.3.4.4.1. Comparaison du photovoltage sur les meilleures structures MIS

Après avoir identifié que les électrodes en Pt et en Ir étaient les meilleures interfaces pour l'ECL, celles-ci sont ensuite testées pour une application en PECL. Pour cela, des structures MIS sont cette fois-ci préparées sur du Si modérément dopé n , noté $n-Si$, pour produire des anodes photo-actives $n-Si/SiO_x/Pt$ et $n-Si/SiO_x/Ir$. Les réponses en PECL sur ces surfaces MIS illuminées par une LED IR à $\lambda_{LED} = 850 \text{ nm}$ sont comparées à celles d'ECL sur les surfaces MIS équivalentes non photo-actives

qui ont été étudiées dans les sous-parties précédentes. Leurs CVs et les courbes d'intensité ECL en fonction du potentiel correspondant sont superposées dans la **Figure 3.22** ci-dessous.

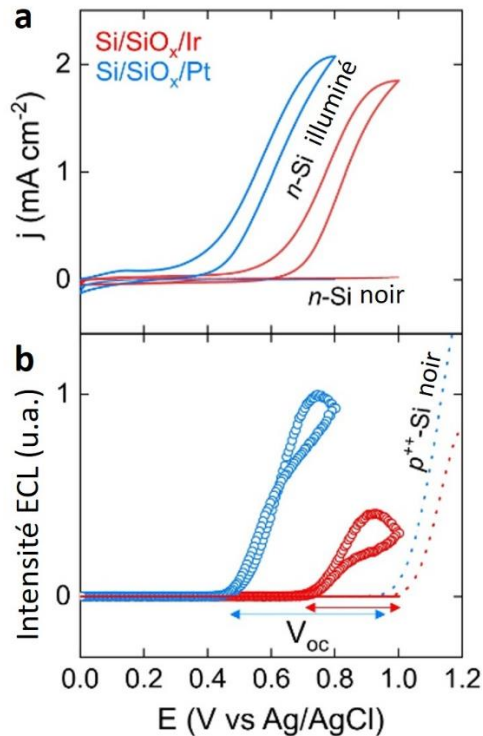


Figure 3.22 : a) CVs mesurés sur une électrode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (rouge) et $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (bleu) dans le noir et sous illumination IR 850 nm. b) Intensités PECL correspondantes (cercles) comparées aux mesures ECL (points) effectuées sur les électrodes $p^+-\text{Si/SiO}_x/\text{Ir}$ et $p^+-\text{Si/SiO}_x/\text{Pt}$ dans le noir. Les expériences sont réalisées dans une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 5 mM et de TPrA à 0,1 M dans du PBS à 0,1 M (pH 7,4). Vitesse de balayage : 50 mV s⁻¹.^[23]

Les CVs de la **Figure 3.22.a** révèlent l'inactivité des électrodes $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (bleu) et $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (rouge) dans l'obscurité. Elles génèrent un photocourant et de la PECL (**Figure 3.22.b**) dès lorsqu'elles sont éclairées par la LED IR. En regardant l'intensité ECL, les deux anodes non photo-actives $p^+-\text{Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (pointillés bleus) et $p^+-\text{Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (pointillés rouges) produisent de l'ECL à un potentiel d'apparition similaire autour de 1 V (**Figure 3.22.b**), tandis que les photoanodes $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (bleu) et $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (rouge) génèrent du PECL à des potentiels distincts. Ce décalage de potentiel est caractéristique d'un V_{oc} qui dépend de la constitution de la jonction MIS. Ce V_{oc} correspond à l'écart de potentiel d'apparition de l'ECL ($p^+-\text{Si/SiO}_x/\text{M}$ dans l'obscurité) et du PECL ($n\text{-Si/SiO}_x/\text{M}$ éclairé) qui est mesurée à 485 mV avec du Pt et à 280 mV avec de l'Ir. Le V_{oc} de la structure $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ correspond aux meilleures performances mesurées dans la littérature sur des photoanodes à base de $n\text{-Si}$.^[35,39,47] Le V_{oc} obtenu avec le Pt est aussi supérieur à celui rapportée pour le $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ qui atteignait 410 mV dans des conditions similaires.^[11] La différence d'intensité d'émission ECL observé entre le Pt et l'Ir pourrait s'expliquer par l'évolution du film métallique au cours du balayage du potentiel : à potentiel élevé, l'Ir est oxydé en IrO_x tandis que le Pt reste inchangé.

III.3.4.4.2. Diagramme de bande de la jonction $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{M}$

Les valeurs de V_{oc} sont par la suite corrélées à la hauteur de la barrière ϕ_b du dispositif MIS, qui est théoriquement contrôlée par la fonction de travail du métal W_M et la position du niveau de Fermi dans le Si, comme indiqué dans la **Figure 3.23** ci-dessous.

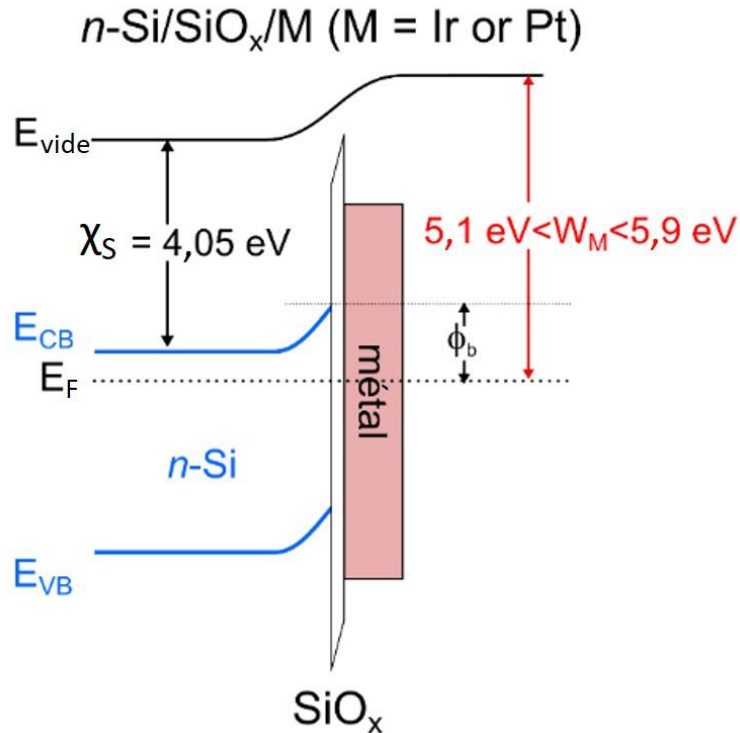


Figure 3.23 : Schéma du diagramme de bande de la jonction $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{M}$ avec la hauteur de barrière ϕ_b , l'affinité électronique χ_S , le niveau de Fermi E_F du Si, et la fonction de travail W_M du métal.^[23]

Cependant, en pratique, la valeur de ϕ_b est également affectée par d'autres paramètres tels que la qualité et l'homogénéité de l'interface.^[48] Si Ir et Pt ont des valeurs de W_M comprises entre 5,1 et 5,9 eV,^[54,55] Pt produit ici une barrière plus élevée avec $n\text{-Si}/\text{SiO}_x$. Ce résultat est tout à fait conforme aux travaux récents de W. A. Smith *et al.* dans lequel des couches de Pt de 2 nm d'épaisseur ont permis d'améliorer le V_{oc} des photoanodes MIS à base de $n\text{-Si}$ pour l'oxydation de l'eau (dans le domaine du « water splitting »).^[47]

III.3.4.4.3. Stabilité des photoanodes en PECL

Par la suite, la stabilité à long terme est testée à l'ISCR pour les deux photoanodes à une j fixée à 1 mA cm^{-2} dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, sauf que, dans ce cas, toute la surface de l'électrode est éclairée de face et de manière homogène par une LED avec $\lambda_{\text{LED}} = 850 \text{ nm}$.

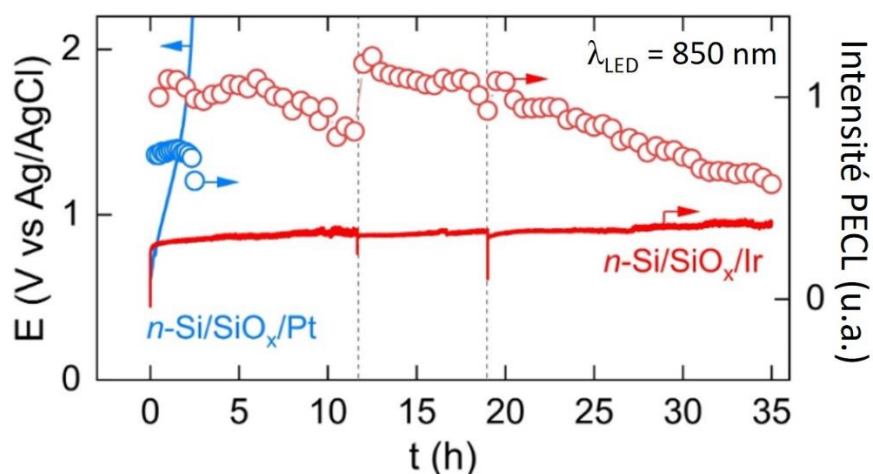


Figure 3.24 : Mesures CPs enregistrées (lignes continues) à une densité de courant de 1 mA cm^{-2} sur une électrode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ (rouge) et $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ (bleu) sous illumination IR à 850 nm. Les intensités PECL correspondantes sont représentées par des cercles. Le renouvellement de l'électrolyte (du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 5 mM et du TPrA à 0,1 M dans du PBS à 0,1 M au pH 7,4) est indiqué par les lignes en pointillé verticales.^[23]

Comme étudié précédemment sur la **Figure 3.20**, l'électrode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ présente dans la **Figure 3.24** un profil de stabilité (courbe bleu) très proche de celui de son homologue à base de $p^{++}\text{-Si}$. Une fois de plus, la photoanode fonctionne avec un potentiel en dessous de 2 V pendant 140 min, suivi par sa désactivation qui est caractérisée par une augmentation du potentiel. Comparativement, $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ présente une stabilité remarquable tout en générant un PECL intense (ronds rouges) pendant au moins 35 h de fonctionnement, et ce avec une augmentation de potentiel minimale (courbe rouge). À la fin du test, cette photoanode fonctionne toujours à un potentiel de 0,95 V et avec une intensité PECL de 60 % de la valeur initiale, démontrant les performances exceptionnelles de la structure $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$. Pour valider la répétabilité, quatre autres photoanodes $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ préparées indépendamment ont été testées pendant au moins 6 h et ont toutes généré le PECL de manière identique, sans diminution notable des performances. Après le test de stabilité, la surface de $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ est contrôlée *ex situ* à l'ISCR par analyses AFM et comparée avant et après utilisation par XPS (**Figure 3.25**)

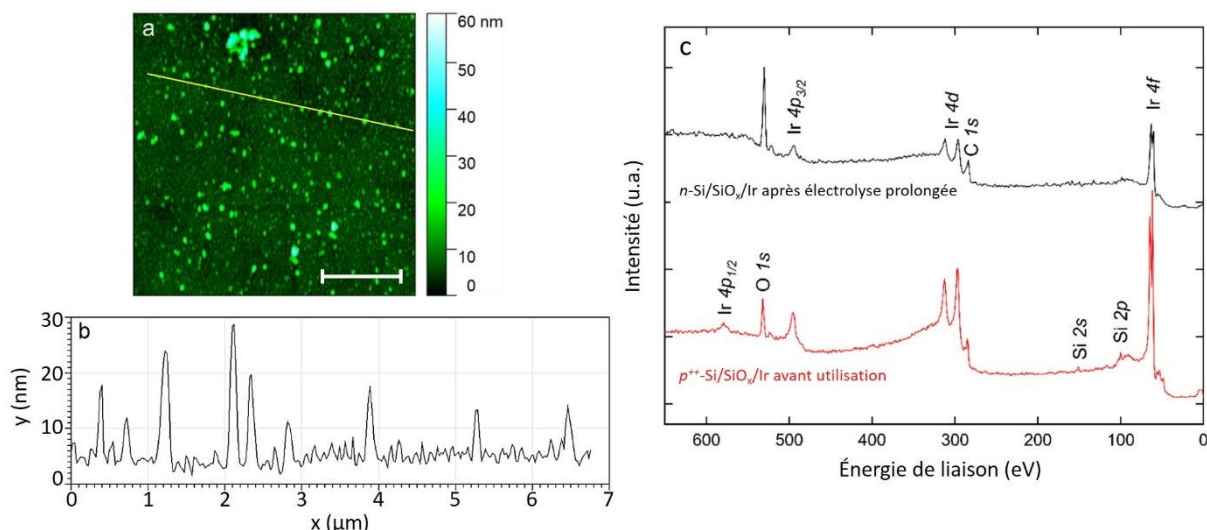


Figure 3.25 : a) Image AFM d'une surface $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ après un PECL généré pendant 33,5 h. Barre d'échelle : 2 μm . b) Profil d'épaisseur de l'image AFM au niveau de la ligne blanche. c) Spectres XPS des surfaces $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ avant utilisation (rouge) et $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ après le test de 33,5 h (noir).^[23]

L'analyse AFM montre que la surface est devenue rugueuse après 33,5 h d'utilisation avec l'apparition de particules plus grosses. Ces éléments pourraient être corrélées à la précipitation d'espèces insolubles sur la photoanode. Pour vérifier cette hypothèse, les mesures XPS ont été réalisées sur les surfaces avant leur utilisation PECL (rouge) et après le test de 33,5 h (noir). De fortes bandes de l'Ir 4f et 4d et de faibles bandes du Si 2s et 2p ont été identifiées sur la surface après le test, démontrant que le film Ir est toujours présent et recouvre densément la surface Si/SiO_x. Une augmentation du pic d'O 1s peut également être remarquée sur le spectre et être corrélée à l'oxydation de la surface lors de l'expérience photoélectrochimique. Cela pourrait expliquer la diminution de l'intensité PECL et l'augmentation de la rugosité de la surface après le test.

Ces résultats démontrent que les films minces de Pt et d'Ir permettent de favoriser la conversion de type anti-Stokes par PECL dans de l'eau avec des stabilités records. Tandis que ce phénomène n'a été rapporté que pendant 15 minutes avec le $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$,^[11] les résultats présentés montrent que le $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ et surtout le $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ permettent de générer la PECL pendant des dizaines d'heures, sans nécessiter de régénérer la surface ou de réactivation, comme habituellement effectués en imagerie ECL classique ou avec les essais biologiques.^[58,59]

III.3.4.5. Conclusion

Les anodes MIS Si/SiO_x/M, avec M = Ru, Pt et Ir, ont été étudiées pour la conversion de type anti-Stokes par PECL avec le système modèle aqueux [Ru(bpy)₃]²⁺/TPRA à un pH physiologique. Les performances des anodes ont d'abord été évaluées en ECL classique dans l'obscurité avec des substrats $p^{++}\text{-Si}$ non photoactifs, puis sous éclairage IR avec des substrats $n\text{-Si}$ photoactifs. Bien que Si/SiO_x/Ru est instable en régime anodique en raison de l'oxydation de la couche métallique, les surfaces de structures Si/SiO_x/Pt et Si/SiO_x/Ir présentent des performances inédites. Plus précisément, $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$ génère de la PECL avec un photovoltage élevé de 480 mV et $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ permet de générer une PECL

intense pendant au moins 35 h. Ces résultats apportent une avancée notable sur l'amélioration de la faible stabilité des photoanodes en Si et en vue de la précédente étude PECL en conversion de type anti-Stokes dont le temps de fonctionnement maximum atteint était de 15 minutes.^[11] Ces résultats apportent des solutions au phénomène d'instabilité du Si en milieu aqueux, ce qui ralentissaient le développement de la PECL, ouvrent des opportunités d'application de la PECL dans les domaines de l'imagerie IR, de la (bio)analyse et de la microscopie.

III.3.5. Amélioration de la stabilité de la photoanode MIS avec le système luminol/H₂O₂

III.3.5.1. Introduction

La précédente étude a permis de trouver une réponse satisfaisante face au problème de stabilité de la photoanode en Si à pH neutre en remplaçant le revêtement de Ni par un métal noble tel que l'Ir ou le Pt.^[23] Cependant, le coût de ces matériaux et l'application de surpotentiels relativement élevés (> 1 V) avec le couple [Ru(bpy)₃]²⁺/TPPrA peuvent être un frein pour le développement de la PECL. C'est pourquoi il est important de trouver une alternative moins onéreuse et moins énergivore. Au départ, le remplacement du métal Ni par d'autres métaux avait pour objectif d'empêcher la dissolution du Ni qui avait lieu dans des conditions de pH neutre et de surpotentiel élevé requis avec le système ECL [Ru(bpy)₃]²⁺/TPPrA.^[26] Or, une autre stratégie pour empêcher la dissolution du Ni, donc améliorer sa stabilité, consiste à utiliser un système ECL alcalin tel que le luminol/H₂O₂. En effet, ce système ECL est généralement utilisé dans des solutions à 0,1 M de KOH ou de NaOH. À ce pH, le Ni est anodiquement stable et reste sur le substrat *n*-Si.^[29] Un autre avantage d'utiliser ce système est qu'il émet à une longueur d'onde plus courte à 425 nm, par rapport au [Ru(bpy)₃]²⁺/TPPrA à 620 nm. Cela permet une conversion de type anti-Stokes plus importante par rapport à la lumière incidente en IR, comme indiqué sur la **Figure 3.26.a**.

Des travaux antérieurs sur la PECL de ce système ont été décrits. Premièrement, l'amplification de l'ECL du luminol au niveau d'électrodes de carbone vitreuses éclairées au-dessus de 500 nm a été observée par Z. Cao et al.^[60] Deuxièmement, Y.B. Vogel et coll. ont rapporté le PECL du luminol/H₂O₂ au niveau de photoanodes *n*-Si modifiées de manière covalente avec des monocouches protectrices de 1,8-nonadiyne.^[10] Dans cette étude, le PECL du luminol/H₂O₂ est testé et analysé à la surface de photoanodes *n*-Si/SiO_x/Ni. Les résultats montrent que cette combinaison est adaptée à la conversion de la lumière avec un décalage anti-Stokes de -425 nm (**Figure 3.26.a**) à un faible potentiel d'apparition et qu'elle conserve son activité pendant des heures.

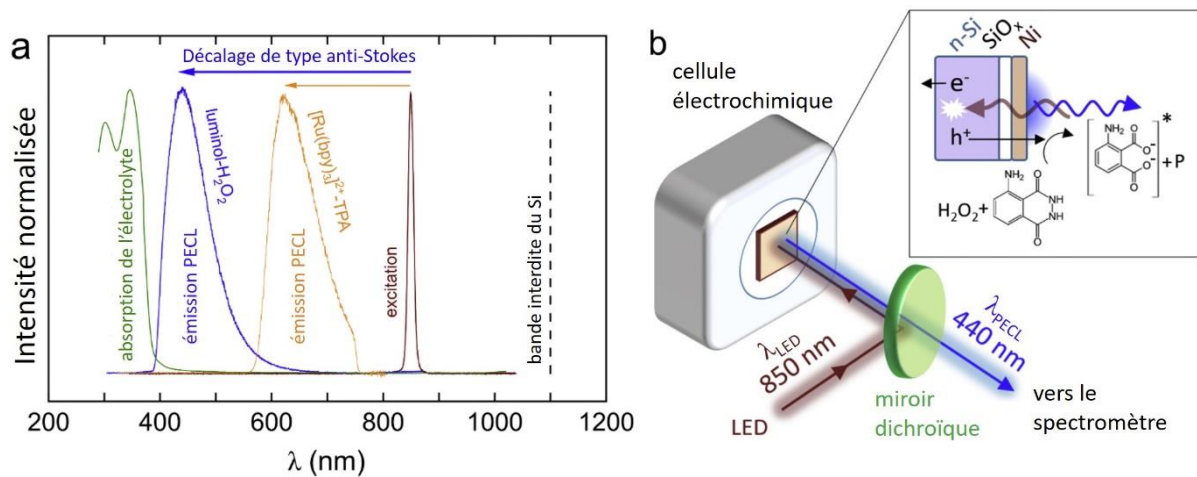


Figure 3.26 : a) Spectres normalisés de l'absorption de l'électrolyte contenant le luminol et le H_2O_2 (vert), de l'émission PECL du luminol/ H_2O_2 (bleu), de l'émission PECL du $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPRA$ (orange), de la lumière d'excitation IR (marron) et de la bande interdite du Si (noir). Les décalages de type anti-Stokes sont indiqués par les flèches bleu et orange. b) Schéma du montage PECL. Dans l'encadré : schéma du transfert de charge de l'électrode vers l'électrolyte impliquant le système luminol/ H_2O_2 .^[9]

III.3.5.2. Résultats et discussions

III.3.5.2.1. Caractérisation de la surface

Les électrodes $Si/SiO_x/Ni$ sont également conçues à l'ISCR. Elles sont d'abord préparées par oxydation chimique d'une surface p^{++} -Si(100) ou n -Si(100), suivie d'une pulvérisation magnétron CC, comme décrit précédemment.^[11,23,39] Après la pulvérisation du film de Ni d'environ 2 nm d'épaisseur (encadré de la **Figure 3.27.a**) sur le p^{++} -Si/ SiO_x , la morphologie du revêtement est évaluée par AFM. L'image AFM de la **Figure 3.27.a** montre que le film est principalement homogène.

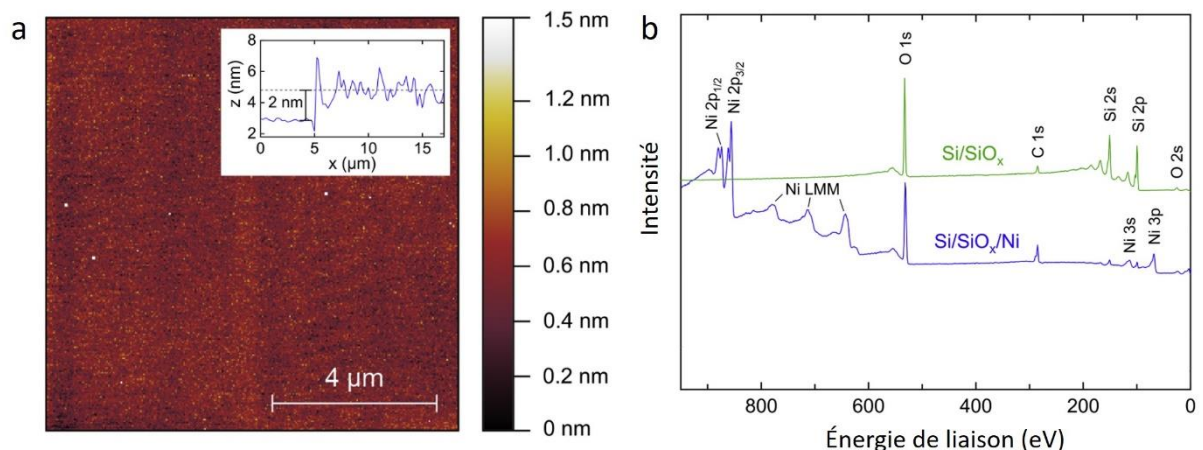


Figure 3.27 : a) Image AFM de la surface de l'électrode p^{++} -Si/ SiO_x/Ni . Dans l'encadré : profil d'épaisseur du Ni déposé sur p^{++} -Si/ SiO_x après le dépôt métallique. b) Spectres XPS de p^{++} -Si/ SiO_x (vert) et de p^{++} -Si/ SiO_x/Ni (bleu).^[9]

La composition de la surface la plus externe est ensuite étudiée par XPS sur place, avant (**Figure 3.27.b**, spectre vert) et après (**Figure 3.27.b**, spectre bleu) le dépôt du film mince de Ni. Le spectre vert montre que Si/SiO_x est uniquement composé d'atomes de Si et O avec une faible teneur en carbone. Des analyses de coupe transversale en microscopie électronique à transmission publiées précédemment ont révélé que la couche de SiO_x ainsi préparée avait une épaisseur comprise entre 1 et 2 nm.^[39,56,61] Le spectre XPS bleu, enregistré après dépôt du film mince de Ni, présente les caractéristiques d'un film mince de Ni dense et homogène sur la couche de SiO_x. La présence du pic de O 1s à 530 eV provient principalement de l'oxyde/hydroxyde de Ni natif. La présence de cette couche native est confirmée par les valeurs d'énergie de liaison des pics Ni 3s, Ni 2p_{3/2} et Ni 2p_{1/2}.^[62,63] L'analyse des régions Ni 2p et O 1s montre que le film de Ni est principalement composé de NiO et de Ni(OH)₂, produits par oxydation naturelle dans les conditions ambiantes. Par simplification, ces électrodes sont notées *n*-Si/SiO_x/Ni.

III.3.5.2.2. Étude de l'anode *p*⁺⁺-Si/SiO_x/Ni en ECL

Tout d'abord, l'électrochimie est testée dans l'obscurité sur des anodes *p*⁺⁺-Si/SiO_x/Ni fortement dégénérées qui sont non photo-actives et se comporte comme un conducteur.

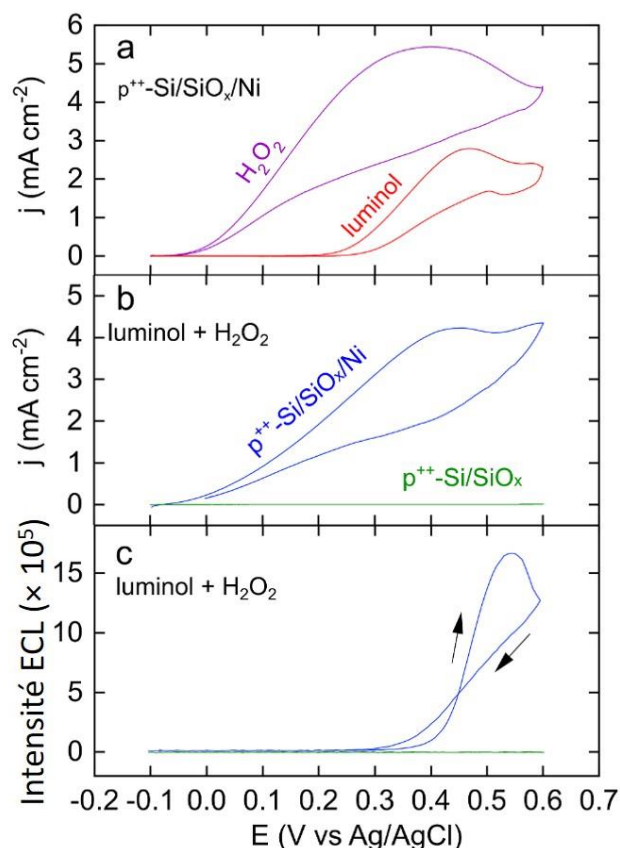


Figure 3.28 : a) CVs enregistrées dans le noir sur une anode *p*⁺⁺-Si/SiO_x/Ni dans une solution aqueuse à pH contenant 33 mM de H₂O₂ (violet) ou 10 mM de luminol (rouge). b) CVs enregistrées dans le noir avec le mélange de 33 mM de H₂O₂ et de 10 mM de luminol dans 0,1 M de KOH (pH 13) sur une anode *p*⁺⁺-Si/SiO_x/Ni (bleu) et une anode *p*⁺⁺-Si/SiO_x (vert). c) Profils d'intensité ECL correspondant. Vitesse de balayage : 50 mV s⁻¹.^[9]

La **Figure 3.28.a** montre les CVs enregistrés séparément à pH 13 pour les deux réactifs ECL. L'oxydation du luminol est représentée par la courbe rouge et l'oxydation du H₂O₂ est représentée par la courbe violette. Ces CVs présentent une grande différence entre les deux potentiels de début d'oxydation : l'oxydation du H₂O₂ commence à 0,05 V et l'oxydation du luminol à 0,2 V. Sur la **Figure 3.28.b**, les deux réactifs ECL (10 mM de luminol avec 33 mM de H₂O₂) sont étudiés ensemble sur une anode p⁺⁺-Si/SiO_x (courbe verte) sans Ni et une anode p⁺⁺-Si/SiO_x/Ni (courbe bleue) avec Ni. La **Figure 3.28.c** affiche l'intensité ECL correspondante. L'anode p⁺⁺-Si/SiO_x ne produit ni courant ni ECL, ce qui suggère que le transfert de charge à la surface solide/liquide est inhibé par la couche isolante de SiO_x. Cependant, p⁺⁺-Si/SiO_x/Ni produit un courant anodique important avec densité de courant maximale $j_{\max} \approx 4 \text{ mA cm}^{-2}$ qui démarre à 0,06 V, ce qui est cohérent avec le potentiel de début d'oxydation de H₂O₂ (**Figure 3.28.a**, courbe violette). Sur cette électrode, l'émission ECL (**Figure 3.28.c**, courbe bleue) ne démarre qu'à un potentiel de 0,3 V, ce qui est légèrement plus positif que le potentiel de début d'oxydation du luminol déterminé précédemment (**Figure 3.28a**, courbe rouge). Cela montre que la génération d'ECL nécessite l'oxydation à la fois du H₂O₂ et du luminol. Comme schématisé dans l'encadré de la **Figure 3.26b**, l'émission ECL provient de l'oxydation de H₂O₂ et de luminol à la surface du Ni, ce qui induit un mécanisme de rupture de liaison où le 3-aminophthalate* excité retourne à l'état fondamental S₀ en émettant un photon à 425 nm, comme détaillé dans la partie I.5.2.

III.3.5.2.3. Étude de la photoanode n-Si/SiO_x/Ni en PECL

Ensuite, le système luminol/H₂O₂ est étudié en PECL sur des surfaces n-Si/SiO_x/Ni préparées avec une surface n-Si modérément dopée et photo-active. Les enregistrements sont réalisés avec le même électrolyte dans lequel de luminol est à une concentration de 10 mM et le H₂O₂ à 33 mM à pH 13.

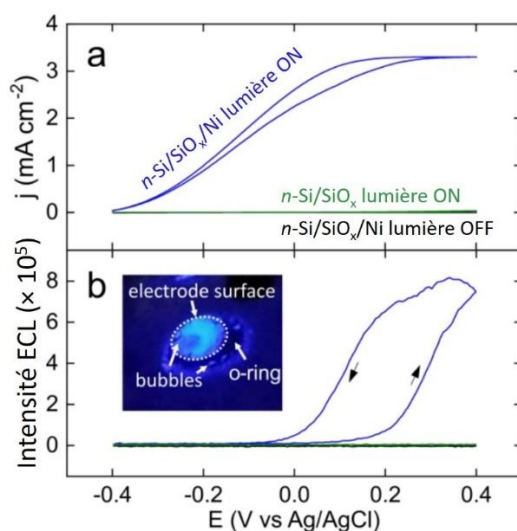


Figure 3.29 : a) CVs enregistrés dans le noir sur la photoanode n-Si/SiO_x/Ni (noir) et sous illumination IR avec les photoanodes n-Si/SiO_x (vert) et n-Si/SiO_x/Ni (bleu). b) Profils d'intensité ECL correspondants aux potentiels appliqués. Dans l'encadré : photo de la surface du n-Si/SiO_x/Ni pendant l'émission PECL. L'électrolyte contient un mélange de 33 mM de H₂O₂ et de 10 mM de luminol dans 0,1 M de KOH (pH 13). Vitesse de balayage : 50 mV s⁻¹.^[9]

Les CVs présentés dans la **Figure 3.29.a** sont enregistrés dans l'obscurité sur $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (noir) et sous illumination par une LED IR à $\lambda_{\text{LED}} = 850 \text{ nm}$ avec une densité de puissance (P_{LED}) de $6,6 \text{ mW cm}^2$ sur $n\text{-Si/SiO}_x$ (vert) et sur $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (bleu). Les profils d'intensité ECL correspondants sont présentés dans la **Figure 3.29.b** avec le même code couleur. La photoanode $n\text{-Si/SiO}_x$ ne génère ni courant, ni émission par PECL, indiquant que le transfert de h^+ n'est pas favorisé vers la phase électrolytique. Ce résultat est cohérent avec l'inhibition de l'oxydation précédemment observée pour le $p^{++}\text{-Si/SiO}_x$ (**Figure 3.28.b,c** courbes vertes). L'électrode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ ne parvient pas non plus à favoriser le transfert de charge dans l'obscurité. (**Figure 3.29.a**, courbes noires). À l'inverse, un photocourant est généré lorsque l'électrode est sous éclairage IR. Celui-ci apparaît à partir de $-0,4 \text{ V}$ et atteint un plateau avec une densité de courant d'environ 3 mA cm^{-2} à $0,2 \text{ V}$. La densité maximale de photocourant est inférieure à celle enregistrée avec l'électrode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$, ce qui suggère qu'il est limité par le flux de photons à un surpotentiel élevé.^[64] L'intensité PECL enregistrée simultanément commence autour de 0 V et augmente considérablement à environ $0,2 \text{ V}$. Par rapport à la situation précédente où l'émission ECL était déclenchée par l'oxydation des réactifs via le transfert des e^- du liquide à la phase solide, dans le cas présent, la PECL est générée via le transfert de h^+ photogénérés à la surface de l'électrode vers la phase liquide, comme le montre la **Figure 3.26.b**.

Il est intéressant de noter que la courbe PECL présente une hystérésis prononcée : la PECL émise lors du balayage vers des potentiels plus faibles (retour) est plus intense que celle émise lors du balayage vers des potentiels plus élevés (aller). Cela peut être attribué au changement de la surface Ni(OH)_2 en NiOOH par l'oxydation du Ni^{II} en Ni^{III} à la fin du balayage aller,^[29] car une hystérésis a également été observée pour le signal ECL sur $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ à la **Figure 3.28.c**.

Le fait que l'hystérésis du PECL soit plus prononcée que l'ECL pourrait indiquer une jonction de type adaptatif dont les propriétés physiques évoluent au cours du fonctionnement.^[43,65] Comme c'était le cas pour l'ECL, l'émission PECL peut être facilement vue à l'œil nu, comme le montre la photographie numérique présentée dans l'encadré de la **Figure 3.29.b**. Cette image capturée à l'ISCR montre que des bulles, probablement de O_2 et de N_2 (produites par l'oxydation du H_2O_2 et du luminol), ont évolué à l'interface solide-liquide au cours de la PECL.

III.3.5.2.4. Efficacité de la photoconversion

Pour étudier le rendement de photoconversion, la spectroscopie de photocourant (IPCE) est réalisée sur la surface $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ au laboratoire ISCR. Ce spectre représente l'efficacité de conversion des photons incidents de différentes longueurs d'ondes en un courant électrique. L'IPCE est mesurée sur la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ avec un potentiel appliqué à $0,4 \text{ V}$.

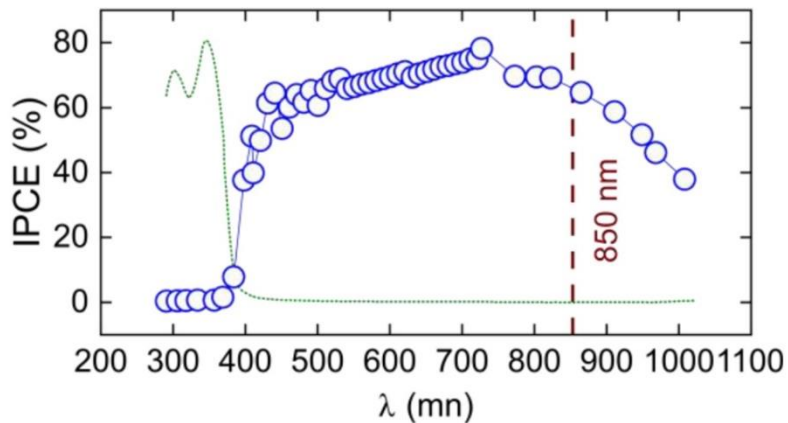


Figure 3.30 : Spectre IPCE mesuré sur une photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (bleu) à 0,4 V superposé à l'absorption normalisée de l'électrolyte (vert, données extraites à partir de la Figure 3.26a). La longueur d'onde d'excitation est représentée par la ligne en tirets marron. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H_2O_2 dans 0,1 M de KOH (pH 13).^[9]

Le spectre IPCE de la **Figure 3.30** montre que l'efficacité de photoconversion est nulle dans le proche ultraviolet (UV) et commence à augmenter à partir de 360 nm. L'inactivité des UV est causée par l'absorption de l'électrolyte qui est tracée sous la forme d'une courbe en pointillés verts sur la même figure. L'IPCE est supérieur à 40 % dans le visible, atteint un maximum d'environ 75 % à 725 nm et varie de 69 à 38 % de 800 à 1010 nm. La diminution de l'IPCE est causée par la diminution du coefficient d'absorption du Si aux longueurs d'onde élevées. À 850 nm (ligne pointillée marron), qui est la longueur d'onde d'excitation utilisée dans nos expériences PECL, l'IPCE est de 65 % ce qui équivaut à une valeur de j de 3 mA cm^{-2} pour une puissance incidente de $6,6 \text{ mW cm}^{-2}$.^[36] Ceci est en bon accord avec les mesures voltamétriques (**Figure 3.29.a**, courbe bleue).

III.3.5.2.5. Détermination du photovoltage du $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$

Pour observer l'effet du photovoltage V_{OC} du $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$, les voltammogrammes (balayages allers) et les intensités ECL correspondantes au niveau d'une anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ (courbes noires) sont superposés à ceux d'une photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ sous illumination IR (courbes bleues) dans la **Figure 3.31** ci-dessous. Ce V_{OC} est mis en évidence par l'apparition du courant et l'émission de lumière au niveau de la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ qui démarrent à un potentiel inférieur à celui de l'anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$.

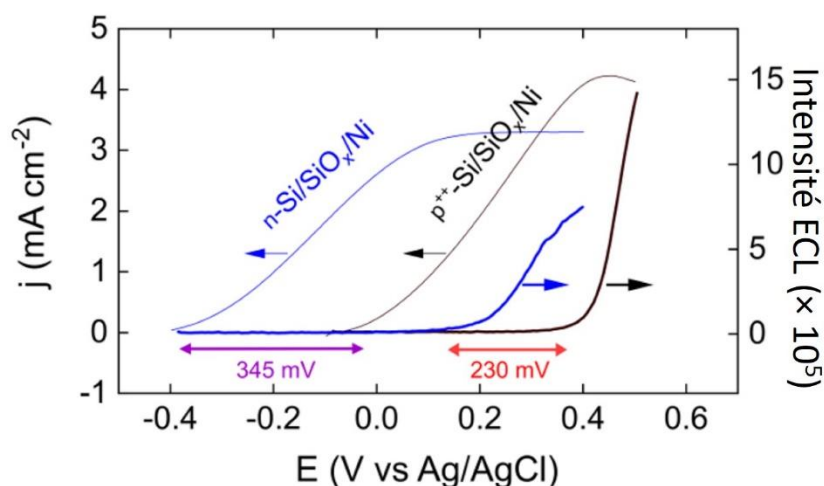


Figure 3.31 : Voltammogrammes (lignes fines) et intensités ECL correspondantes (lignes épaisses) enregistrés sur une anode p^{++} -Si/SiO_x/Ni (noir) et une photoanode n -Si/SiO_x/Ni sous illumination IR (bleu) dans 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ dans 0,1 M de KOH (pH 13). Vitesse de balayage : 50 mV s⁻¹.^[9]

Ce V_{oc} est également déterminé par les mesures d'OCP de la photoanode n -Si/SiO_x/Ni dans la **Figure 3.32**. Il correspond à la différence d'OCP sous illumination IR et dans l'obscurité.

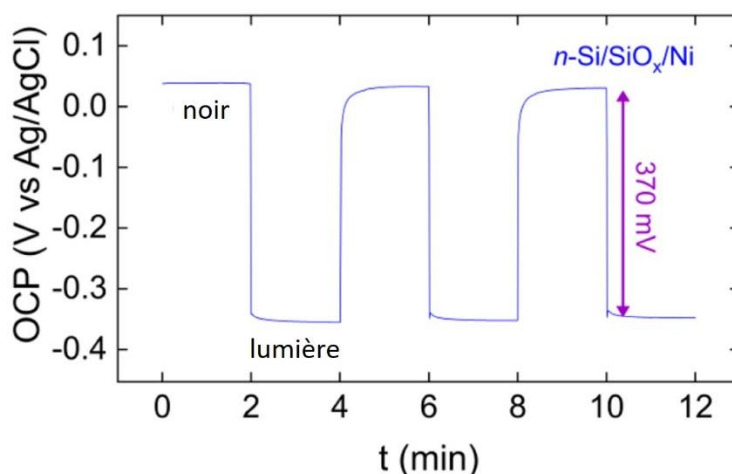


Figure 3.32 : Mesure de l'OCP au cours du temps d'une photoanode sous illumination IR intermittente dans 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ dans 0,1 M de KOH (pH 13).^[9]

À partir de données présentées sur les **Figures 3.31** et **3.32**, la valeur de V_{oc} peut être estimée de trois manières : i) à partir de la différence des potentiels de génération de courant entre p^{++} -Si/SiO_x/Ni et n -Si/SiO_x/Ni (**Figure 3.31**, courbes fines), ii) avec la différence de potentiel d'apparition de l'ECL entre p^{++} -Si/SiO_x/Ni et n -Si/SiO_x/Ni (**Figure 3.31**, courbes épaisses), et iii) en mesurant la différence entre les valeurs d'OCP dans l'obscurité et sous illumination au niveau de n -Si/SiO_x/Ni (**Figure 3.32**).

La différence entre les potentiels d'apparition du courant et celle entre les OCP donne des valeurs de V_{oc} relativement similaires de 345 et 370 mV, respectivement. Cependant, cette différence de potentiel de début de génération d'ECL est beaucoup plus faible avec un V_{oc} à 230 mV. Cet écart de V_{oc} peut indiquer un comportement adaptatif dans lequel les changements chimiques induits pendant

la polarisation de la photoanode affectent la hauteur de la barrière de la jonction photovoltaïque, modifiant ainsi la tension photovoltaïque effective à des surtensions élevés.^[43,65]

III.3.5.2.6. Effet de la puissance d'illumination de la LED sur la PECL

Ensuite, l'effet de la puissance de la LED P_{LED} sur la PECL est étudié comme le montre la **Figure 3.33** ci-dessous. Cette étude a été réalisée au laboratoire ISCR. Au cours de cette expérience, un potentiel constant de 0,4 V est appliqué à la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ dans une cellule à flux avec un débit de 1 mL s^{-1} . La P_{LED} varie de 0 à $5,2 \text{ mW cm}^{-2}$ et le courant résultant et l'intensité PECL sont enregistrés.

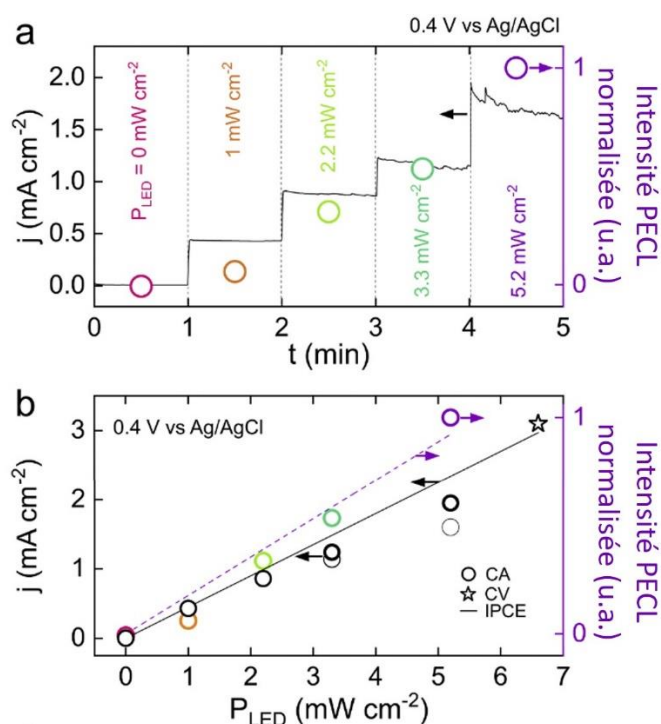


Figure 3.33 : a) CA (courbe noire) et intensité PECL moyennée (ronds colorés) mesurés à un potentiel de 0,4 V appliqué sur la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ lorsque la P_{LED} est augmentée toutes les minutes. b) Densité de photocourant (noir) et intensité PECL (coloré) selon la P_{LED} . Les ronds sont des valeurs expérimentales extraites de a), les ronds noirs épais sont les valeurs de j quand la P_{LED} est tout juste appliquée, les ronds noirs fins sont les valeurs de j après 1 min d'illumination à une P_{LED} à 3,3 et 5,2 mW cm^{-2} . L'étoile en noir est la valeur de j extraite du CV de la Figure 3.29a, la courbe noire représente la variation de photocourant attendu par rapport à l'IPCE déterminé expérimentalement, les courbe en tirets violette est la linéarisation des données PECL. L'électrolyte est un mélange de 10 mM de luminol et 33 mM de H_2O_2 dans 0,1 M de KOH (pH 13) et il est sous flux avec un débit de 1 mL s^{-1} .^[9]

Cette étude montre que le photocourant (courbe noire) et l'intensité PECL (ronds colorés) augmentent avec le P_{LED} dans la **Figure 3.33.a**. Ces intensités PECL semblent varier linéairement avec la P_{LED} et peuvent donc être représentées par la droite en tirets violets de la **Figure 3.33.b**, bien que la valeur P_{LED} la plus basse à 1 mW cm^{-2} fasse exception à cette linéarité. Il est également possible d'observer comment la P_{LED} affecte la densité de photocourant (**Figure 3.33.b**, données noires). Encore une fois, il semble qu'il existe une relation quasi-linéaire entre ces deux paramètres, ce qui correspond bien à une

densité de photocourant limitée par la lumière à ce potentiel. En conséquence, les valeurs j extraites des CPs de la **Figure 3.33.a** (**Figure 3.33.b**, ronds noirs) et des CVs de la **Figure 3.29.a** (**Figure 3.33.b**, étoile noire) sont relativement proches de celles attendues à partir de la valeur IPCE déterminée à 65 % (**Figure 3.33.b**, droite en noir). Pour les valeurs P_{LED} les plus élevées, j diminue après 1 minute de polarisation (**Figure 3.33.b**, ronds noirs épais et fins pour $P_{LED} = 3,3$ et $5,2 \text{ mW cm}^{-2}$ respectivement), s'écartant de la valeur attendue de l'IPCE. Cette diminution peut être attribuée à la formation de bulles d' O_2 et de N_2 à la surface de l'électrode, comme observé lors des expériences de voltamétrie (encadré de la **Figure 3.29.b**), qui réduisent la surface active de la photoanode.

III.3.5.2.7. Stabilité de la photoanode en PECL

La stabilité PECL de ce système est ensuite testée à l'ISCR en appliquant un photocourant constant j de $1,8 \text{ mA cm}^{-2}$ à la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ sous éclairage IR avec une P_{LED} à $5,2 \text{ mW cm}^{-2}$. Les mesures du potentiel et de l'intensité PECL sont présentées sur la **Figure 3.34** ci-dessous.

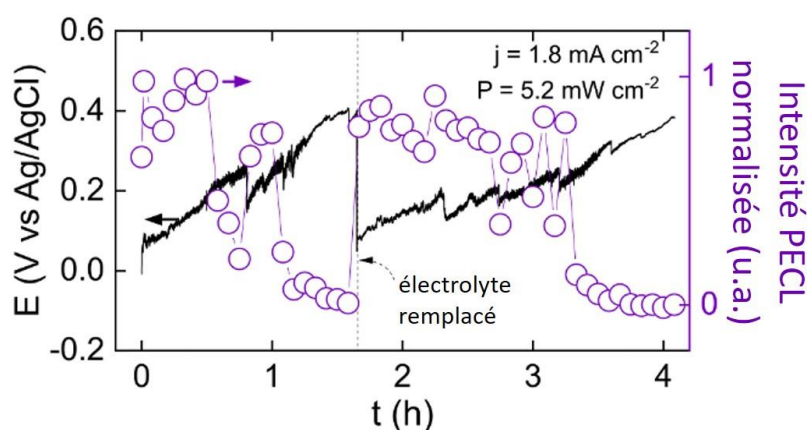


Figure 3.34 : CP (courbe noire) et intensité PECL (ronds violets) mesurés sur une photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ à $j = 1,8 \text{ mA cm}^{-2}$, $P_{LED} = 5,2 \text{ mW cm}^{-2}$. L'électrolyte est un mélange de 10 mM de luminol et 33 mM de H_2O_2 dans 0,1 M de KOH (pH 13) et il est sous flux avec un débit de 1 mL s^{-1} .^[9]

La courbe noire montre que le potentiel de la photoanode varie de 50 à 400 mV au cours des 1,6 premières heures. Bien que son intensité évolue considérablement, du PECL est émis pendant la première heure de l'expérience. Après environ 1 h, le PECL s'estompe et disparaît. Pour évaluer si la désintégration du PECL est causée par la dégradation de la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ ou par celle de l'électrolyte, ce dernier est remplacé au bout de 1,6 h par un électrolyte fraîchement préparé. Ce changement restaure immédiatement la valeur de potentiel initial ainsi que l'intensité du PECL. Après le changement d'électrolyte, l'électrode émet du PECL pendant environ 1,5 h au bout de laquelle une dégradation similaire se produit. Cela montre que la perte de PECL est causée par la consommation des réactifs ECL dans l'électrolyte. De plus, une forte variation de l'intensité du PECL peut être observée. Par exemple, à 0,5 h, l'intensité diminue puis augmente soudainement au bout de 0,8 h. Des profils plus courts mais similaires sont également observés dans la deuxième partie des expériences, par exemple à 2,3 h. Le fait que le PECL augmente lorsque le potentiel diminue brusquement suggère que de telles variations sont causées par la libération de bulles d' O_2 et de N_2 , comme discuté précédemment, qui modifient l'intensité du signal d'émission.

Pour mieux comprendre l'évolution de la surface de la photoanode, celle-ci est de nouveau analysée par XPS après une longue polarisation à 0,2 V pendant 4,5 h.

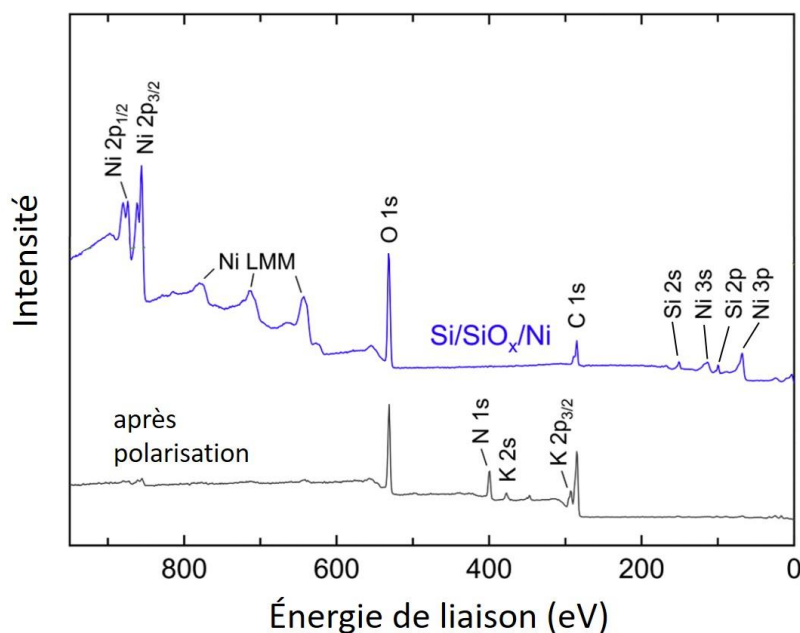


Figure 3.35 : Spectres XPS de $p^+-Si/SiO_x/Ni$ (bleu) (identique à celui de la Figure 3.27) et $n-Si/SiO_x/Ni$ (noir) après une polarisation potentiastatique à 0,2 V pendant 4,5 h sous illumination IR dans l'électrolyte ECL.^[9]

La figure ci-dessus compare le spectre XPS de la photoanode $n-Si/SiO_x/Ni$ avant polarisation (bleu) à celui après une polarisation. Après le test de stabilité, les pics de Si 2p et 2s ne sont plus observables et l'intensité des pics de Ni 2p a considérablement diminué. En revanche, l'intensité du pic C 1s a augmenté et de nouveaux pics attribués à N 1s (399 eV), K 2s et (378 eV) et K 2p_{3/2} (293 eV) sont apparus. Ceci suggère qu'une polarisation prolongée dans le milieu induit la précipitation d'un revêtement insoluble composé de K⁺ (initialement présent dans l'électrolyte support) et de matières organiques résultant des produits P de la dégradation du luminol. Cette couche pourrait entraver l'activité des photoanodes lors d'expériences plus longues.

III.3.5.2.8. Comparaison des systèmes ECL alcalin et neutre avec la photoanode

Enfin, la dernière expérience a pour objectif de vérifier que cette photoanode en Ni est en effet mieux adaptée à un système alcalin comme le luminol/H₂O₂ qu'à un système à pH neutre qui requiert une surtension plus élevée tel que le couple [Ru(bpy)₃]²⁺/TPrA étudié en 2019.^[11] Pour cela, la stabilité du $n-Si/SiO_x/Ni$ est comparée avec les deux systèmes ECL par des enregistrements de CPs pendant 90 min. Le premier système (bleu) contient 10 mM de luminol et 33 mM de H₂O₂ dans 0,1 M de KOH et la densité de courant est fixée à 1,8 mA cm⁻². Le second système est un mélange de 5 mM de [Ru(bpy)₃]²⁺ et 0,1 M de TPrA dans 0,1 M de PBS avec une densité de courant est fixée à 0,5 mA cm⁻². Dans les deux cas, l'électrolyte est sous flux et l'électrode illuminée par une LED IR à 850 nm à une P_{LED} de 5,2 mW cm⁻². Les mesures sont effectuées au laboratoire ISCR.

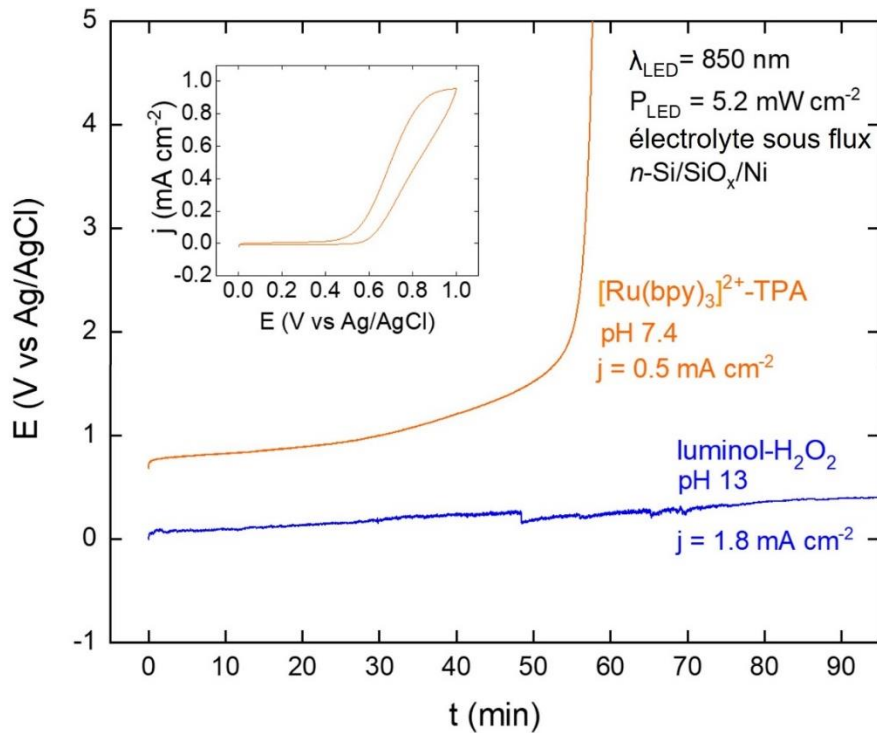


Figure 3.36 : CPs mesurées sur des photoanodes $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ illuminées par une LED à 850 nm ($P_{\text{LED}} = 5,2 \text{ mW cm}^{-2}$) dans une électrolyte ECL neutre (5 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, 0,1 M de TPrA, 0,1 M de PBS, pH ajusté à 7,4, courbe orange) avec $j = 0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ et dans un électrolyte alcalin (10 mM de luminol, 33 mM de H_2O_2 , 0,1 M de KOH avec un pH à 13, courbe bleue extraite depuis la Figure 3.34 où $j = 1,8 \text{ mA cm}^{-2}$). Dans l'encadré : CV (20 mV s⁻¹) enregistrée sur une photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$ dans un électrolyte ECL neutre (5 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, 0,1 M de TPrA, 0,1 M de PBS, pH ajusté à 7,4) illuminée par une LED à 850 nm ($P_{\text{LED}} = 5,2 \text{ mW cm}^{-2}$).^[9]

La mesure CP de la photoanode avec l'électrolyte contenant le mélange $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ à pH = 7,4 présente un potentiel qui reste relativement stable en début de mesures, avec une légère augmentation. Au bout de 30 minutes, le potentiel augmente plus rapidement jusqu'à une dégradation après 55 minutes de fonctionnement. Quant à l'électrolyte composé du mélange luminol/ H_2O_2 à pH = 13, le potentiel d'oxydation reste stable jusqu'à la fin du test de 90 minutes, avec une légère augmentation. Cette étude permet de confirmer que le couple luminol/ H_2O_2 est un système alcalin qui mieux adapté pour générer de l'ECL sur une surface en NiO et $\text{Ni}(\text{OH})_2$ que le couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ qui nécessite un pH neutre et une surtension plus élevée.

III.3.5.3. Conclusion

Cette étude a permis l'amélioration de la stabilité PECL avec une conversion de type anti-Stokes et en milieu aqueux avec l'utilisation d'un système ECL alcalin adapté aux photoanodes $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ni}$. Ici, l'excitation IR ($\lambda_{\text{LED}} = 850 \text{ nm}$) de la photoanode produit une émission PECL à $\lambda_{\text{PECL}} = 425 \text{ nm}$ générée par le système ECL luminol/ H_2O_2 . Cette combinaison entraîne un décalage de type anti-Stokes de -425 nm. En raison du pH approprié de l'électrolyte, le système peut être utilisé pendant une durée plus longue que celle rapportée pour des photoanodes similaires à pH neutre^[11] avec un IPCE élevé. De plus, cette analyse a permis de révéler que l'intensité PECL peut être contrôlée par des paramètres physiques simples tels que le potentiel appliqué et la densité de puissance de la lumière

IR incidente. D'après les CVs et les mesures en OCP, le V_{oc} du $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ni}$ dans ce milieu est d'environ 360 mV, ce qui est proche des 410 mV du précédemment répertorié sur cette photoanode.^[11] Cependant, le début de l'émission n'est décalé que de 230 mV lorsque la photoanode est comparée avec une anode similaire mais non photo-active. L'électrode peut être utilisée pendant des heures et la dégradation de la PECL peut être facilement restaurée en remplaçant l'électrolyte. Une électrolyse prolongée a montré que l'évolution des bulles provoquée par la dégradation des réactifs ECL produit une variation de la densité du PECL. En raison du pH élevé de l'électrolyte ECL luminol/ H_2O_2 et de la structure de la photoanodes basée sur du Si, ce rapport pourrait être prometteur pour de futures recherches fondamentales appliquées à la conversion de l'énergie solaire.^[7,8,37-41]

III.4. Conclusion du chapitre

La PECL allie la photoélectrochimie sur SC à l'ECL et se caractérise par la conversion d'une lumière d'excitation en lumière d'émission d'une différente longueur d'onde. La polyvalence de ce système permet la mise en place d'un décalage de type anti-Stokes avec la génération d'une lumière d'une énergie supérieure à la lumière incidente, ou bien de type Stokes dans le cas inverse. La conversion de type anti-Stokes a un fort potentiel pour de l'imagerie PECL visible en excitant le SC par une lumière invisible à plus basse énergie telle que l'IR. Le Si est un SC adapté pour cette conversion de type anti-Stokes car sa faible bande interdite élargit le spectre des longueurs d'ondes d'excitation. En plus de cette conversion, l'illumination du SC génère un photovoltage V_{oc} qui réduit significativement la surtension à appliquer à l'électrode pour générer l'ECL. Cependant, cette photoconversion ne permettait pas d'émettre de la PECL sur Si pendant plus de 15 minutes.

À travers ces trois travaux de recherche, la stabilité de la PECL avec un SC en Si a pu être améliorée avec les luminophores de références, c'est-à-dire le luminol et le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, en voie anodique en milieu aqueux. Leurs durées d'émission en PECL ont pu augmenter grâce à la structure MIS adaptée au pH de l'électrolyte et au potentiel requis pour le couple ECL. La longévité de la PECL du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ avec la TPrA a été augmentée de 15 minutes à 35 heures. La PECL à base de luminol avec du H_2O_2 est également restée intense pendant au moins 90 minutes. Il a aussi été démontré que le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ pouvait être utilisé en PECL en voie cathodique en milieu organique pendant 30 minutes. La mise en place d'une PECL robuste ouvre la voie vers des perspectives d'application de la PECL en analyse et en imagerie.

Références

- [1] C. Ma, Y. Cao, X. Gou, J.-J. Zhu, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 431–454.
- [2] F. Du, Y. Chen, C. Meng, B. Lou, W. Zhang, G. Xu, *Current Opinion in Electrochemistry* **2021**, *28*, 100725.
- [3] A. E. Becquerel, *C.R. Acad. Sci.* **1839**, *9*, 145–149.
- [4] Y. Zhao, L. Bouffier, G. Xu, G. Loget, N. Sojic, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 2528–2550.
- [5] D. Laser, A. J. Bard, *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *34*, 6.
- [6] J. D. Luttmmer, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1979**, *126*, 414–419.
- [7] G. Loget, B. Fabre, S. Fryars, C. Mériadec, S. Ababou-Girard, *ACS Energy Lett.* **2017**, *2*, 569–573.
- [8] F. A. L. Laskowski, S. Z. Oener, M. R. Nellist, A. M. Gordon, D. C. Bain, J. L. Fehrs, S. W. Boettcher, *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 69–76.
- [9] Y. Zhao, J. Descamps, Y. Léger, L. Santinacci, S. Zanna, N. Sojic, G. Loget, *Electrochim. Acta* **2023**, *444*, 142013.
- [10] Y. B. Vogel, N. Darwish, S. Ciampi, *Cell Rep. Phys. Sci.* **2020**, *1*, 100107.
- [11] Y. Zhao, J. Yu, G. Xu, N. Sojic, G. Loget, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13013–13016.
- [12] J. Yu, H. Saada, R. Abdallah, G. Loget, N. Sojic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *132*, 15269–15272.
- [13] G. Watson, “Introduction to Electronic Band Structure,” can be found under <https://www.physics.udel.edu/~watson/scen103/99s/clas0416.html>, **1996**.
- [14] R. Memming, *Semiconductor Electrochemistry*, John Wiley & Sons, **2015**.
- [15] J. H. Kim, J. S. Lee, *Advanced Materials* **2019**, *31*, 1806938.
- [16] S. Ehsanfar, F. Kanjouri, H. Tashakori, A. Esmailian, *Journal of Elec Materi* **2017**, *46*, 6214–6223.
- [17] K. Oh, Electrochemical Nanostructuring of Silicon for Energy Applications, Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, **2020**.
- [18] D. Guyomard, *J. Chim. Phys.* **1986**, *83*, 355–391.
- [19] S. M. Sze, Y. Li, K. K. Ng, *Physics of Semiconductor Devices*, John Wiley & Sons, **2021**.
- [20] G. Eranna, *Crystal Growth and Evaluation of Silicon for VLSI and ULSI*, CRC Press, **2014**.
- [21] Z. Zhang, J. T. Yates, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5520–5551.
- [22] M. Kumar, B. Meena, P. Subramanyam, D. Suryakala, C. Subrahmanyam, *NPG Asia Mater* **2022**, *14*, 88.
- [23] Y. Zhao, J. Descamps, S. Ababou-Girard, J.-F. Bergamini, L. Santinacci, Y. Léger, N. Sojic, G. Loget, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202201865.
- [24] J. Yu, H. Saada, N. Sojic, G. Loget, *Electrochim. Acta* **2021**, *381*, 138238.
- [25] J.-W. Xue, C.-H. Xu, W. Zhao, H.-Y. Chen, J.-J. Xu, *Nano Lett.* **2023**, *23*, 4572–4578.
- [26] Y. Zhao, J. Yu, J.-F. Bergamini, Y. Léger, N. Sojic, G. Loget, *Cell Reports Physical Science* **2021**, *2*, 100670.
- [27] K. Lee, A. Mazare, P. Schmuki, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9385–9454.
- [28] D. Bae, B. Seger, P. C. K. Vesborg, O. Hansen, I. Chorkendorff, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1933–1954.
- [29] M. Pourbaix, *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*, National Association Of Corrosion Engineers, Houston, Texas, **1974**.
- [30] K. Sun, S. Shen, Y. Liang, P. E. Burrows, S. S. Mao, D. Wang, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8662–8719.
- [31] H. Savin, P. Repo, G. Von Gastrow, P. Ortega, E. Calle, M. Garín, R. Alcubilla, *Nature Nanotech* **2015**, *10*, 624–628.

- [32] S. W. Boettcher, J. M. Spurgeon, M. C. Putnam, E. L. Warren, D. B. Turner-Evans, M. D. Kelzenberg, J. R. Maiolo, H. A. Atwater, N. S. Lewis, *Science* **2010**, *327*, 185–187.
- [33] Z. Luo, T. Wang, J. Gong, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 2158–2181.
- [34] S. Hu, M. R. Shaner, J. A. Beardslee, M. Lichterman, B. S. Brunschwig, N. S. Lewis, *Science* **2014**, *344*, 1005–1009.
- [35] A. G. Scheuermann, J. P. Lawrence, K. W. Kemp, T. Ito, A. Walsh, C. E. D. Chidsey, P. K. Hurley, P. C. McIntyre, *Nature Mater* **2016**, *15*, 99–105.
- [36] M. J. Kenney, M. Gong, Y. Li, J. Z. Wu, J. Feng, M. Lanza, H. Dai, *Science* **2013**, *342*, 836–840.
- [37] K. Sun, M. T. McDowell, A. C. Nielander, S. Hu, M. R. Shaner, F. Yang, B. S. Brunschwig, N. S. Lewis, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 592–598.
- [38] F. A. L. Laskowski, M. R. Nellist, R. Venkatkarthick, S. W. Boettcher, *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 570–579.
- [39] G. Loget, C. Mériadec, V. Dorcet, B. Fabre, A. Vacher, S. Fryars, S. Ababou-Girard, *Nat Commun* **2019**, *10*, 3522.
- [40] S. Lee, L. Ji, A. C. De Palma, E. T. Yu, *Nat Commun* **2021**, *12*, 3982.
- [41] J. Ma, H. Chi, A. Wang, H. Jing, T. Yao, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 17540–17548.
- [42] J. C. Hill, A. T. Landers, J. A. Switzer, *Nature Mater* **2015**, *14*, 1150–1155.
- [43] Y. W. Chen, J. D. Prange, S. Dühnen, Y. Park, M. Gunji, C. E. D. Chidsey, P. C. McIntyre, *Nature Mater* **2011**, *10*, 539–544.
- [44] K. Oh, V. Dorcet, B. Fabre, G. Loget, *Adv. Energy Mater.* **2020**, *10*, 1902963.
- [45] A. G. Scheuermann, K. W. Kemp, K. Tang, D. Q. Lu, P. F. Satterthwaite, T. Ito, C. E. D. Chidsey, P. C. McIntyre, *Energy Environ. Sci.* **2016**, *9*, 504–516.
- [46] G. Valenti, A. Fiorani, H. Li, N. Sojic, F. Paolucci, *ChemElectroChem* **2016**, *3*, 1990–1997.
- [47] I. A. Digdaya, G. W. P. Adhyaksa, B. J. Trzeźniewski, E. C. Garnett, W. A. Smith, *Nat Commun* **2017**, *8*, 15968.
- [48] R. T. Tung, *App. Phys. Rev.* **2014**, *1*, 011304.
- [49] W. Schottky, *Z. Physik* **1939**, *113*, 367–414.
- [50] F. Mott, *Proc. R. Soc. A* **1939**, *171*, 27–38.
- [51] J. Descamps, Y. Zhao, J. Yu, G. Xu, Y. Léger, G. Loget, N. Sojic, *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 6686–6688.
- [52] S. Antonello, F. Maran, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9668–9676.
- [53] M. Hesari, Z. Ding, *Nat Protoc* **2021**, *16*, 2109–2130.
- [54] J. Hölzl, F. K. Schulte, H. Wagner, Eds., *Solid Surface Physics*, Springer, Berlin Heidelberg, **1979**.
- [55] G. N. Derry, M. E. Kern, E. H. Worth, *J. Vac. Sci. Technol. A* **2015**, *33*, 060801.
- [56] P. Aroonratsameruang, P. Pattanasattayavong, V. Dorcet, C. Mériadec, S. Ababou-Girard, S. Fryars, G. Loget, *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 25907–25916.
- [57] W. Miao, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2506–2553.
- [58] E. Faatz, A. Finke, H.-P. Josel, G. Prencipe, S. Quint, M. Windfuhr, in *Detection Science* (Ed.: N. Sojic), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2019**, pp. 443–470.
- [59] D. Han, B. Goudeau, D. Jiang, D. Fang, N. Sojic, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 1652–1657.
- [60] Z. Cao, B. Su, *Electrochemistry Communications* **2019**, *98*, 47–52.
- [61] J. Dabboussi, R. Abdallah, L. Santinacci, S. Zanna, A. Vacher, V. Dorcet, S. Fryars, D. Floner, G. Loget, *J. Mater. Chem. A* **2022**, *10*, 19769–19776.

- [62] J. F. Moulder, J. Chastain, Eds. , *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of XPS Data*, Perkin-Elmer Corporation, Eden Prairie, Minn, **1992**.
- [63] N. S. McIntyre, M. G. Cook, *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 2208–2213.
- [64] J. R. Hemmerling, A. Mathur, S. Linic, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 1992–2002.
- [65] S. Ciampi, P. K. Eggers, G. Le Saux, M. James, J. B. Harper, J. J. Gooding, *Langmuir* **2009**, *25*, 2530–2539.

Chapitre IV : Application de la PECL pour la caractérisation de photoélectrodes

IV. Application de la PECL pour la caractérisation de photoélectrodes

IV.1. Conversion localisée de la lumière en porteurs de charge

IV.1.1. Introduction

Dans le cas de la PECL sur SC, la luminescence n'est observée à la surface de l'électrode que lorsque les charges sont photo-induites. Ce phénomène est intéressant pour étudier la relation entre la lumière d'excitation et l'électrode en localisant sur celle-ci la génération de la PECL. Le couplage entre la microscopie optique et la PECL pourrait alors être un moyen de visualiser directement la réaction électrochimique au niveau d'une photoélectrode. Cette approche est pertinente dans le contexte actuel où la recherche sur la photoélectrochimie de SC illuminés est un domaine prometteur pour des applications dans la conversion de l'énergie comme par exemple la photosynthèse artificielle, dans laquelle l'énergie solaire est convertie en produits H_2 ,^[1,2] C1 ou C2^[3-5] en utilisant de l'eau et/ou du CO_2 comme réactifs. La PECL pourrait donc être adaptée pour la caractérisation de photoélectrodes et étendre son domaine d'application dans l'étude de la production d'énergies renouvelables.

Dans un premier temps, l'électrode est étudiée au niveau de l'absorption de la lumière d'excitation, de la conversion des photons en porteurs de charge, de la diffusion de ces porteurs photogénérées vers l'interface électrode/électrolyte ainsi que leur durée de vie. Pour cela, le SC n'est plus illuminé de manière homogène par une LED mais de manière localisée sur un diamètre de taille micrométrique par un faisceau laser de longueur d'onde IR, invisible à l'œil nu. Le système PECL le plus stable avec le SC de structure MIS $n-Si/SiO_x/Ir$ et le couple ECL $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$ est repris pour cette étude.^[6]

IV.1.2. Photo-adressage de la PECL

IV.1.2.1. Montage de la PECL avec un faisceau laser

La surface $n-Si/SiO_x/Ir$ est plongée dans l'électrolyte contenant le $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à 5 mM et la TPrA à 0,1 M dans du PBS à 0,1 M (pH 7,4). La cellule photoélectrochimique comporte un montage à trois électrodes et la surface MIS est polarisée à 0,85 V. Afin de localiser la conversion de la lumière IR sur l'électrode par PECL, un laser de longueur d'onde de $\lambda_{LASER} = 840$ nm éclaire localement un point d'environ 30 μm de diamètre sur la photoanode à travers un objectif. L'intensité et la taille du point du laser et du point PECL sont mesurées à l'aide d'un appareil confocal hyperspectral conçu à l'institut FOTON à Rennes (détails dans la section expérimentale correspondante).

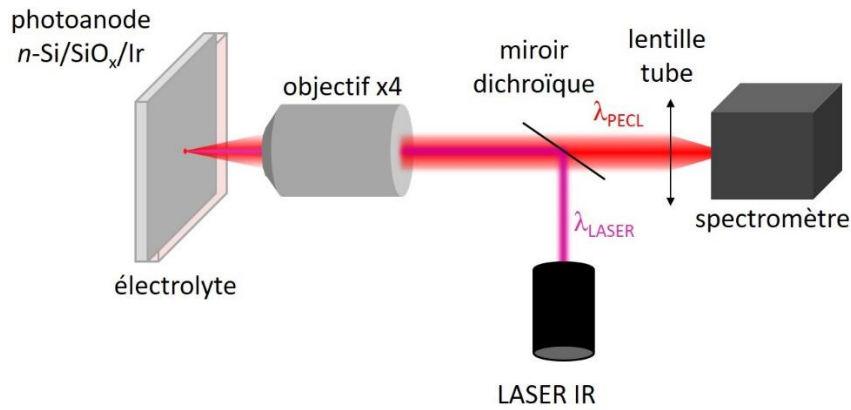


Figure 4.1 : Schéma du montage PECL localisé par un faisceau IR réalisé au laboratoire FOTON.

IV.1.2.2. Localisation du faisceau IR par la PECL

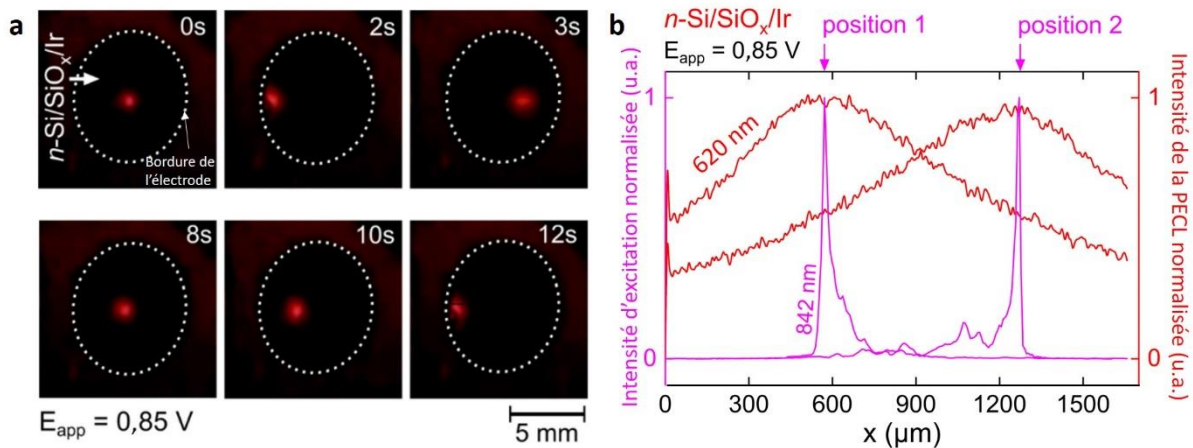


Figure 4.2 : a) Images capturées avec un téléphone portable du photo-adressage par PECL du déplacement du faisceau laser à 840 nm face à l'électrode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ sous un potentiel de 0,85 V. b) Comparaison du diamètre du faisceau laser (rose) par rapport au diamètre de la tache PECL (rouge) à deux positions différentes sur un profil d'intensité normalisée. Les mesures ont été réalisées en présence de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à une concentration de 5 mM avec la TPrA à une concentration de 0,1 M dans du PBS à 0,1 M (pH 7,4).^[6]

L'éclairage localisé de la surface avec le faisceau laser IR invisible à l'œil induit l'apparition d'un point lumineux brillant à la surface de l'électrode, facilement observé à l'œil nu et enregistré avec un appareil photographique numérique (**Figure 4.2.a**). Le point PECL suit instantanément le déplacement horizontal du faisceau laser sur la surface de la photoanode. À l'aide du dispositif hyperspectral, il est possible d'avoir une résolution spectrale tout en conservant une résolution spatiale à 1D ce qui permet de séparer les contributions provenant de la PECL du résidu de laser d'excitation, comme le montre la **Figure 4.2.b**. Si l'excitation par le laser et les maxima d'émission par PECL sont localisés au même endroit, le diamètre du point PECL apparaît beaucoup plus large (1,1 mm) que celui du faisceau laser (30 μm). Cet élargissement est une conséquence directe des paramètres physiques du Si cristallin : en raison de sa bande interdite indirecte et de ses capacités de transport de charges élevées, les h^+ photogénérés ont une durée de vie particulièrement longue et peuvent ainsi diffuser latéralement dans le SC.

IV.1.3. Déplacement des charges minoritaires dans la photoanode

IV.1.3.1. Calcul théorique de la largeur de la tache PECL

Pour mieux comprendre la différence entre le diamètre du faisceau laser IR et celui du point PECL observé, la longueur de diffusion théorique L_p des h^+ photogénérés est calculée pour une surface n -Si dopée au phosphore. Les calculs sont effectués par le Dr. Yoan Léger à l'institut FOTON.

La résistivité ρ donnée par le fournisseur des surfaces est comprise entre 0,3 et 0,7 Ω cm. Par simplification, la valeur approximative de ρ est 0,5 Ω cm. Cette résistivité correspond donc, pour une température à $T = 300$ K, à une concentration en dopant $N_D = 1 \times 10^{16}$ cm^{-3} , une diffusion de charge minoritaires (h^+) $D_p = 11,24$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, et une mobilité des charges minoritaires $\mu_p = 434,8$ $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ selon la ressource en ligne PV Lighthouse.^[7] Pour une concentration en dopant $N_D = 1 \times 10^{16}$ cm^{-3} , le temps de demi-vie τ_p des h^+ peut être estimé à 0,1 ms selon la littérature.^[8-10] De cette manière, la longueur de diffusion (L_p) des h^+ peut être calculée à partir de l'équation suivante :

$$L_p = \sqrt{D_p \times \tau_p} \quad (4.1)$$

Avec $D_p = 11,24$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ et $\tau_p = 1 \times 10^{-4}$ s, une valeur de longueur de diffusion de $L_p = 335$ μm est obtenue.

IV.1.3.2. Diffusion des h^+ dans le SC n -Si/SiO_x/Ir

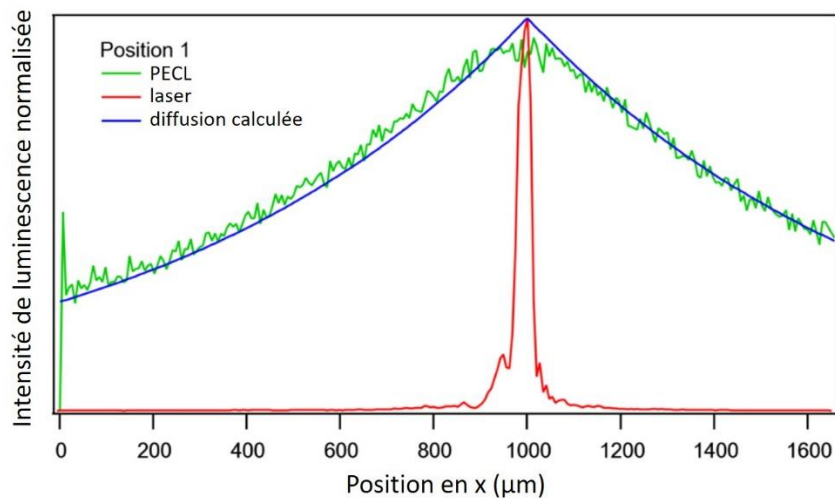


Figure 4.3 : Superposition de l'intensité de luminescence PECL théorique aux luminescences expérimentales PECL et IR de mesurées à la position 1 de la Figure 4.2b.^[6]

La variation du profil d'intensité du point PECL de part et d'autre du centre (vert), mesuré expérimentalement, correspond en fait à une décroissance exponentielle (bleu) comme présenté dans la **Figure 4.3** ci-dessus. Cette fonction suggère que la mobilité des charges dans le n -Si suit bien un régime de diffusion. Il est important de noter que la longueur de diffusion de 800 μm observée

expérimentalement dans la **Figure 4.3** est plus grande que celle obtenue théoriquement à 335 μm . Il faut en effet tenir compte de la zone de déplétion du n -Si dans laquelle la durée de vie des h^+ devrait être allongée de manière significative et donc pourrait accroître la longueur de leur diffusion. La diffusion de ces charges minoritaires dans la zone de déplétion serait donc responsable de la faible résolution de la tache PECL par rapport au point d'excitation sur la photoanode, comme a pu le souligner S. Ciampi *et al.* dans un autre rapport sur la PECL.^[11] S'ajoutent à cela d'autres facteurs qui peuvent contribuer à l'élargissement de la tache PECL. La couche métallique peut favoriser la diffusion des charges à l'interface en augmentant la conductivité latérale. De plus, la convection de l'électrolyte avec la pompe péristaltique pourrait délocaliser les espèces oxydées en solution.^[12] Cette hypothèse est cependant peu probable car le flux de l'électrolyte, dirigé latéralement, n'a pas déformé la tache PECL qui a gardé une forme circulaire.

IV.1.4. Conclusion

Comme dans les précédentes études, le système PECL permet de convertir une lumière d'excitation IR invisible à l'œil en un signal visible sur toute la surface de la photoanode MIS par une conversion de type anti-Stokes. Il a été prouvé qu'il était possible de localiser et de suivre spatialement l'émission PECL avec un faisceau laser IR. Ce photo-adressage a de plus mis en évidence que la taille de la tache PECL résulte principalement de la diffusion des porteurs de charges et qu'elle dépend donc du type de SC impliqué. Dans le cas présenté, la zone excitée par la lumière IR génère une tache PECL d'un diamètre 30 fois supérieur sur un SC en Si. Cet élargissement est attendu car les porteurs de charge ont une longue durée de vie et donc une diffusion longue. Pour une application de la PECL en imagerie par lumière IR, la résolution du point laser devrait être améliorée en changeant le type de SC avec une durée de vie des porteurs de charges plus faible ou par ingénierie des semi-conducteurs.

Cette étude a montré que la PECL peut être un moyen de caractérisation de l'absorption de la lumière sur une surface n -Si/SiO_x/Ir homogène. La PECL devrait également permettre l'étude de l'activité photoélectrochimique d'une électrode hétérogène en localisant l'émission ECL sur des motifs d'Ir.

IV.2. Localisation du transfert de charge du SC vers l'électrolyte

IV.2.1. Introduction

Dans le domaine de la photoélectrochimie, les SC sont souvent recouverts d'une protection et/ou d'un catalyseur.^[13–15] La caractérisation du matériau se fait ensuite principalement par enregistrement de la densité de courant j , c'est à dire du taux de transfert de charge faradique à la surface de la photoélectrode, en fonction d'autres paramètres tels que le potentiel E (par CV) ou le temps (par CA). Bien que ces méthodes électroanalytiques soient simples pour l'évaluation des performances, la valeur de j correspond uniquement au taux de transfert de charge global, moyenné sur toute l'électrode surface, et ne permet pas une détermination spatialement résolue de l'activité photoélectrochimique. Pourtant, les photoélectrodes peuvent combiner plusieurs matériaux,

généralement un SC absorbant, une couche de protection et un revêtement catalyseur^[5] (sous forme de films minces^[16,17] ou de particules^[14,18-21] dispersées à la surface). En raison de la complexité de ces interfaces, la réaction photoélectrochimique ne devrait pas se produire avec la même cinétique sur toute la surface. Visualiser l'activité photoélectrochimique locale reste un défi que plusieurs groupes ont tenté de relever^[22] en utilisant différentes méthodes telles que les techniques de balayage laser,^[23] de microscopie à balayage électrochimique,^[24-28] ou une combinaison des deux.^[29] Jusqu'ici, la microscopie PECL n'a été reportée que dans une étude et a permis de sonder la conversion ascendante de la PECL sur des nanoparticules d'or localisées sur du TiO₂.^[30] Dans ce rapport, la PECL avait été déclenché par l'oxydation du luminol *via* des h⁺ photogénérés.

L'étude présente ici la microscopie PECL d'une photoanode de MIS hétérogène en utilisant le système modèle [Ru(bpy)₃]²⁺/TPrA (**Figure 4.4**). Dans plusieurs rapports, les photoanodes MIS à base de Si et d'Ir avaient été mises en application pour l'électrolyse de l'eau.^[31-34] Pour une utilisation en PECL, les photoanodes n-Si/SiO_x/Ir sous leur forme homogène (c'est-à-dire sans motif), ont présenté une stabilité sans précédent.^[6] Cette fois-ci, les photoanodes n-Si/SiO_x/Ir sont préparées par pulvérisation de microbandes avec un motif défini. L'objectif est de pouvoir observer des motifs lumineux pour résoudre à l'échelle locale le transfert du h⁺ photo-électrogénéré à l'interface solide/liquide, le tout en conversion ascendante de la PECL.

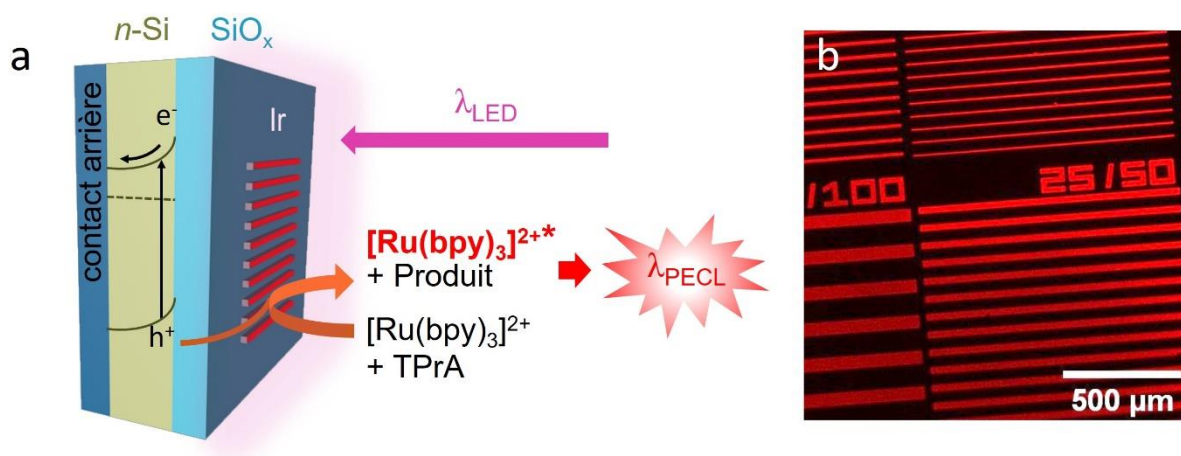


Figure 4.4 : a) Schéma des h⁺ photoinduits localisés sur le motif Ir impliquant la PECL du couple [Ru(bpy)₃]²⁺/TPrA. b) Image du motif d'Ir déposé sur une photoanode n-Si/SiO_x et visible par PECL.^[35]

IV.2.2. Observation de la PECL localisée sur le motif d'Ir

IV.2.2.1. Montage de la microscopie PECL

Pour réaliser les expériences de microscopie PECL, la photoanode est excitée par un éclairage latéral avec une LED dans le proche IR (λ_{LED} = 850 nm) pour photogénérer les h⁺, comme indiqué dans la **Figure 4.4**. Les émissions localisées de PECL sont capturées avec un microscope optique horizontal équipé d'un filtre IR.

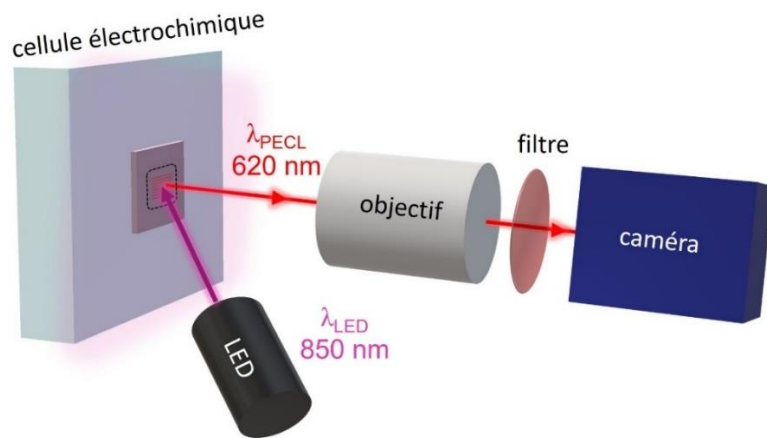


Figure 4.5 : Schéma de l'imagerie PECL par microscopie avec la lumière IR incidente émise par la LED (λ_{LED}) et l'émission PECL rouge (λ_{PECL}) enregistrée par la caméra.^[35]

IV.2.2.2. Fabrication des électrodes avec un motif d'Ir

Les photoanodes MIS sont fabriquées par oxydation chimique, photolithographie et pulvérisation cathodique à l'institut FOTON et à l'ISCR à Rennes. Pour la première étape, la surface photoactive de Si dopé *n* est modérément oxydée afin de générer la couche tunnel SiO_x avec une épaisseur de 1,5 nm, comme décrit précédemment.^[36,37] Ensuite, un motif d'Ir de 2 nm d'épaisseur est déposé à la surface du Si/ SiO_x à l'aide d'un processus de décollage, comme décrit sur la **Figure 4.6.a**. Pour cette étude, quatre types de motifs sont conçus et déposés avec différentes dimensions, présentés dans **Figure 4.6.b** : 50 μm /100 μm , 25 μm /50 μm , 10 μm /50 μm et 5 μm /50 μm (largeur/pas). Les jonctions Si/ SiO_x et Si/ SiO_x /Ir sont identiques à celles utilisées pour la PECL homogène dans le précédent chapitre et qui avaient été caractérisées par AFM et XPS.^[6]

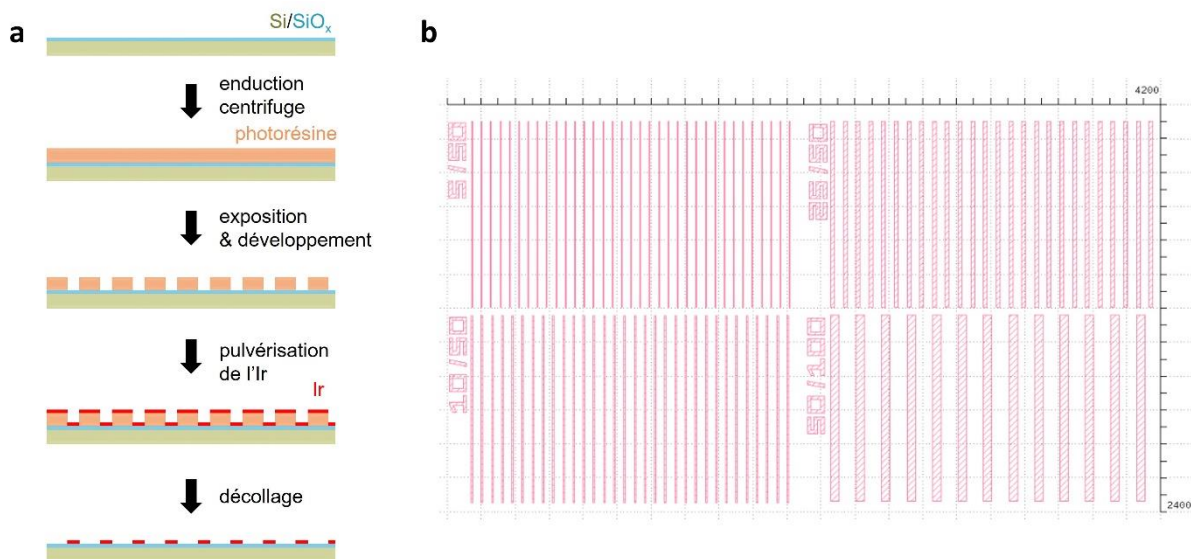


Figure 4.6 : a) Schéma de la fabrication du motif d'Ir. b) Dessin du masque utilisé pour la fabrication du motif d'Ir avec les quatre différentes dimensions : 5/50 μm , 10/50 μm , 25/50 μm et 50/100 μm (largeur/espacement).^[35]

IV.2.2.3. PECL localisé sur le motif d'Ir

Les images microscopiques de PECL sont focalisée à la surface de l'électrode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ sous un éclairage proche IR à 0,8 V (tous les potentiels sont ici référencés par rapport à Ag/AgCl) dans l'électrolyte contenant à la fois du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de la TPrA. Une concentration élevée de TPrA (soit 0,1 M) est choisie pour les expériences d'imagerie PECL car il génère un signal PECL fort et il confine la couche émettrice de PECL à la surface de l'électrode. En effet, dans les conditions expérimentales actuelles, la taille de la couche de réaction PECL est généralement de 200 nm, donc beaucoup plus petite que les dimensions des bandes.^[38]

Sur la **Figure 4.7.a**, la lumière rouge est émise par PECL de manière homogène sur tous les motifs des microbandes d'Ir. Les bandes constituées d'un film mince d'Ir sont visualisées par PECL car l'Ir agit comme un collecteur de charges et présente de bonnes propriétés de transfert de charge, conduisant à une oxydation efficace du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et de la TPrA. Ces réactions produisent une émission ECL locale.^[6] En revanche, la surface du Si est passivée dans la solution aqueuse aux potentiels anodiques requis pour la génération d'ECL. En d'autres termes, la PECL est émis préférentiellement au niveau des motifs d'Ir. Ce motif de 2 nm d'épaisseur n'est pas observable à l'œil nu ou sous un microscope à champ large, le MEB est donc nécessaire pour pouvoir les caractériser **Figure 4.7.b**.

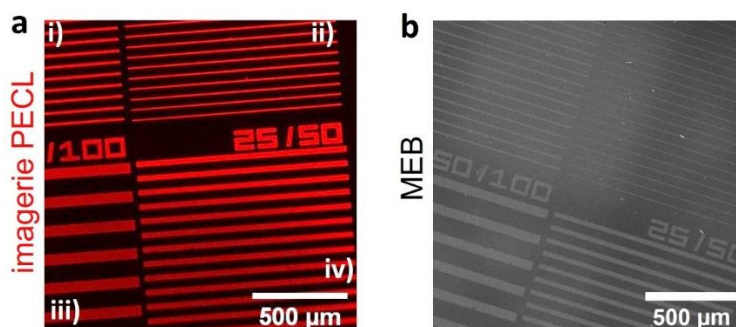


Figure 4.7 : a) Imagerie PECL d'une surface $n\text{-Si/SiO}_x$ recouverte de motifs d'Ir de différentes dimensions (i : 10/50 μm ; ii : 5/50 μm ; iii : 50/100 μm et iv : 25/50 μm – la première et la seconde valeur correspondent à la largeur et à l'espacement, respectivement). Un potentiel de 0,8 V a été imposé dans une solution de PBS à 0,1 M (pH 7,4) contenant du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 5 mM et de la TPrA à 0,1 M. Le temps d'exposition est de $t_{\text{expo}} = 1,5$ s. b) Image MEB de la même surface $n\text{-Si/SiO}_x$ avec le motif Ir.^[35]

Les mesures par SEM et par PECL sont ensuite comparées pour chaque motif : 10 μm / 50 μm , 50 μm / 100 μm , 25 μm / 50 μm et 5 μm / 50 μm . L'imagerie par MEB permet une mesure précise de la dimension des microbandes d'Ir et les images des motifs sont représentées dans la partie gauche de la **Figure 4.8** ci-dessous. Pour la microscopie PECL, les profils d'intensité PECL sont extraits d'images à plus fort grossissement, le long d'une ligne perpendiculaire à l'axe de la bande (au milieu de la **Figure 4.8**). Les largeurs à mi-hauteur (« Full Width at Half Maximum » ou FWHM) des bandes PECL sont déterminées sur les profils d'intensité (à droite de la **Figure 4.8**).

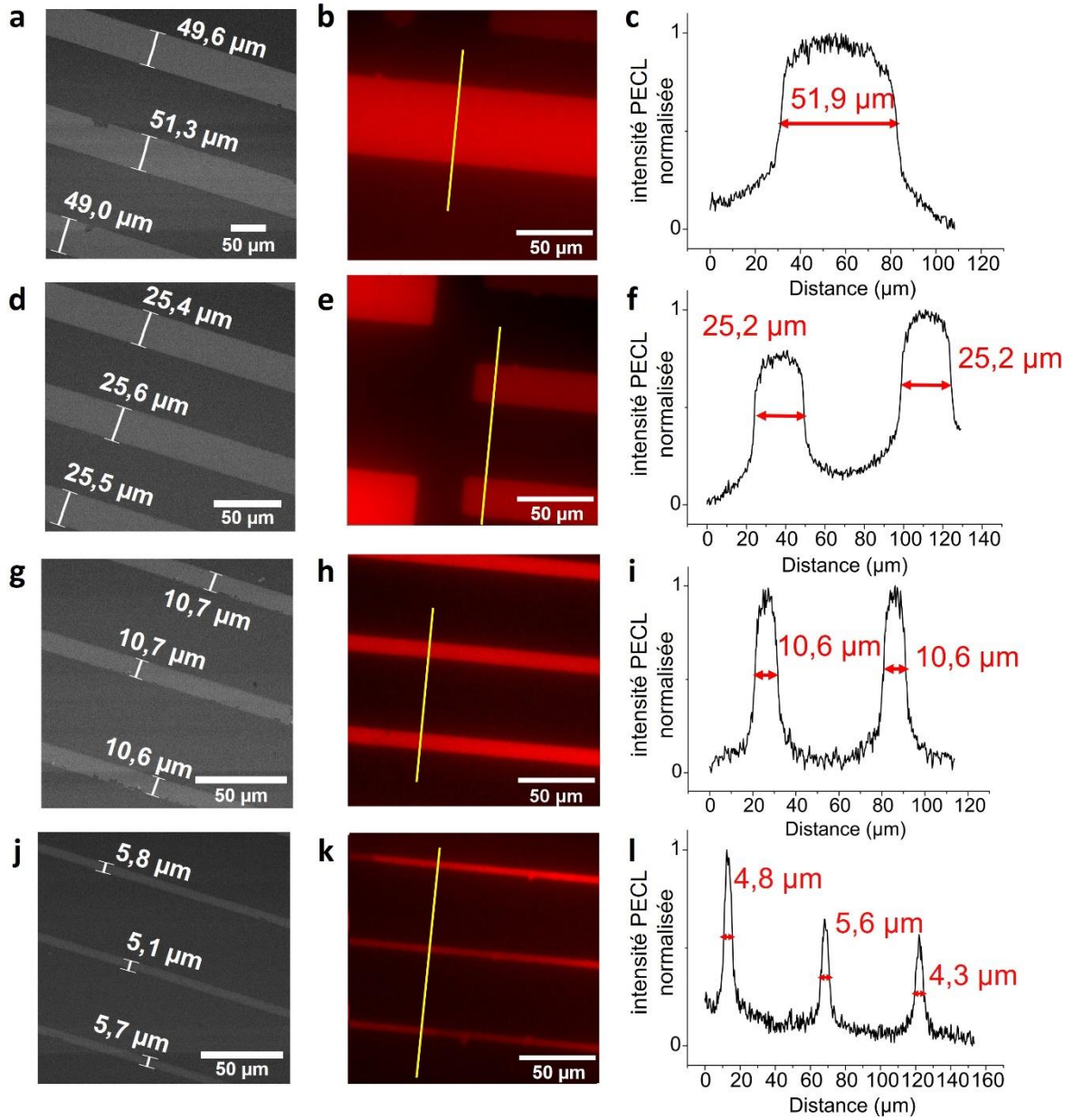


Figure 4.8 : Images des motifs 50/100 μm par a) MEB et par b) PECL avec le profil d'intensité normalisé correspondant en c) permettant la mesure de la largeur à mi-hauteur (FWHM) des bandes. Les images d), g), j) MEB et e), h), k) PECL avec les profils d'intensité PECL normalisés en f), i), l) correspondent aux motifs 25/50 μm , 10/50 μm et 5/50 μm respectivement.^[35]

IV.2.2.4. Comparaison entre l'imagerie par PECL et par MEB

Pour comparer les deux techniques de microscopie, les mesures de largeur des bandes visibles par PECL et au MEB sont ensuite tracées en fonction de la largeur théorique sur la **Figure 4.9**.

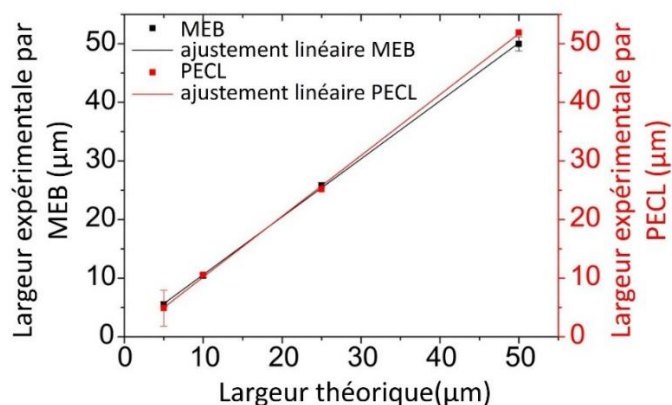


Figure 4.9 : Comparaison de la largeur des bandes d'Ir observées par PECL et au MEB (3 mesures à chaque point).^[35]

La bonne linéarité des mesures montre une pente proche de 1 avec un $R^2 = 0,9997$ et $R^2 = 0,9994$ pour l'imagerie MEB et la PECL, respectivement. Ceci révèle, d'une part, la précision de la fabrication du motif d'Ir avec le processus de décollage et, d'autre part, que l'émission PECL est limitée aux motifs conducteurs.

IV.2.2.5. Expériences de contrôle

Pour garantir que le motif observé ne soit pas dû à une réflexion de la lumière IR, des expériences de contrôle sont réalisées en OCP sous illumination, comme présentées dans la **Figure 4.10.b**. De plus, la **Figure 4.10.c** montre que la polarisation de l'électrode à 0,8 V dans l'obscurité ne conduit pas à une émission de PECL, confirmant la nécessité de photogénérer les porteurs de charge dans le processus PECL.

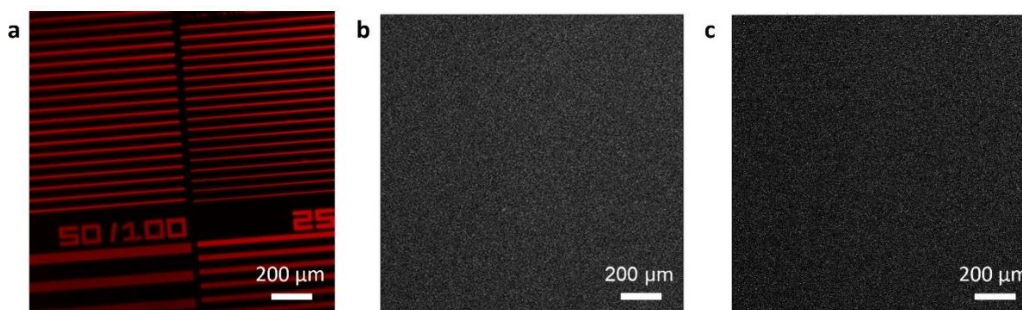


Figure 4.10 : Expériences de contrôle avec a) l'image PECL de la surface n-Si/SiO_x recouverte par le motif d'Ir avec un potentiel appliqué à 0,8 V dans une solution de PBS à 0,1 M (pH 7,4) contenant du [Ru(bpy)₃]²⁺ à 5 mM et de la TPrA à 0,1 M. Les images sont réalisées dans les mêmes conditions b) en OCP sous illumination IR et c) à 0,8 V dans le noir.^[35]

IV.2.3. Photoélectrochimie de l'électrode hétérogène

IV.2.3.1. Photovoltage

Pour aller plus loin dans l'étude de l'imagerie PECL, la photoélectrochimie de l'électrode n -Si/SiO_x/Ir est étudiée par CV. Le courant est enregistré dans le même électrolyte, avec 5 mM de [Ru(bpy)₃]²⁺, 0,1 M de TPrA et 0,1 M de PBS à pH = 7,4, sous un éclairage IR à $\lambda_{LED} = 850$ nm avec une P_{LED} de 6,6 mW cm⁻² (courbe rouge) ainsi que dans le noir (courbe noire, **Figure 4.11.a**). L'intensité PECL est extraite des images PECL capturées avec le microscope avec une vitesse de 2 images par seconde (« frame per second » ou fps). La **Figure 4.11.b** ci-dessous représente l'intensité moyenne PECL des microbandes de 10 μ m / 50 μ m selon le potentiel appliqué.

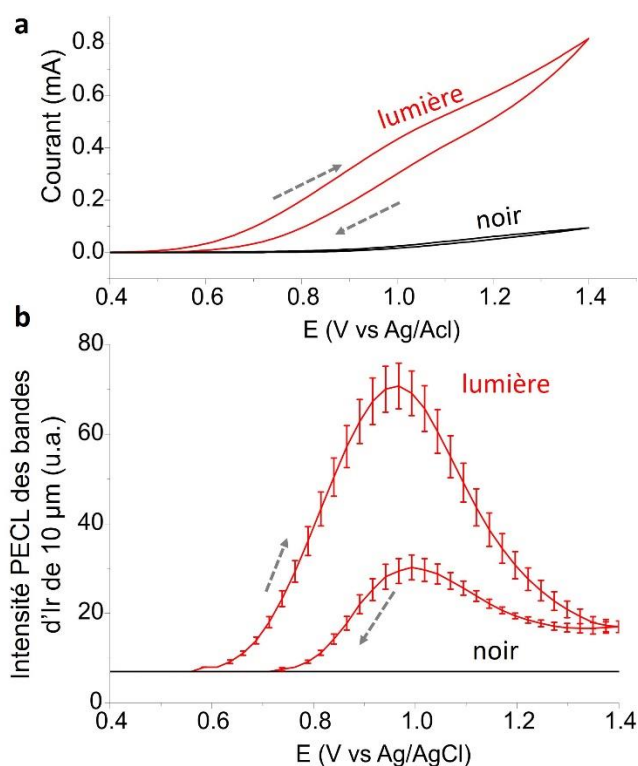


Figure 4.11 : a) CV d'une surface n -Si/SiO_x recouverte d'un motif de microbandes en Ir mesurée dans le noir (courbe noire) et sous illumination d'une LED (courbe rouge). Les flèches grises en pointillé indiquent la direction du balayage. b) Moyenne et écarts-types des intensités PECL correspondantes au niveau des microbandes d'Ir 10 μ m / 50 μ m sous illumination IR (courbe rouge) et dans le noir (courbe noire). Les mesures sont réalisées dans une solution de PBS à 0,1 M (pH 7,4) contenant du [Ru(bpy)₃]²⁺ à 5 mM et de la TPrA à 0,1 M. Vitesse de balayage : 50 mV s⁻¹.^[35]

Le CV de la **Figure 4.11.a** souligne que l'émission locale de la PECL n'est générée qu'à partir de 0,57 V avec une intensité relativement homogène entre chaque bande de 10 μ m de largeur. Les mesures de courant peuvent ensuite être comparées à celles d'une anode MIS p^{++} -Si/SiO_x/Ir analogue mais non photoactive préparée sur un Si hautement dopé p^{++} et étudiée dans le noir. En effet, la microscopie ECL sur ces anodes a révélé qu'ils induisent également une ECL localisé niveau de l'interface Ir/électrolyte mais à des potentiels plus élevés. Ce changement de potentiel d'apparition de l'ECL peut être clairement observé sur la **Figure 4.12** où le CV obtenu pour p^{++} -Si/SiO_x/Ir et n -Si/SiO_x/Ir dans

différentes conditions d'éclairage sont superposés. Le décalage du potentiel d'apparition, ici à 0,5 V, est caractéristique d'un comportement conventionnel des photoanodes et il résulte de la génération d'un photovoltage sous illumination, déjà observé sur les photoanodes $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ sans motif.^[6,39]

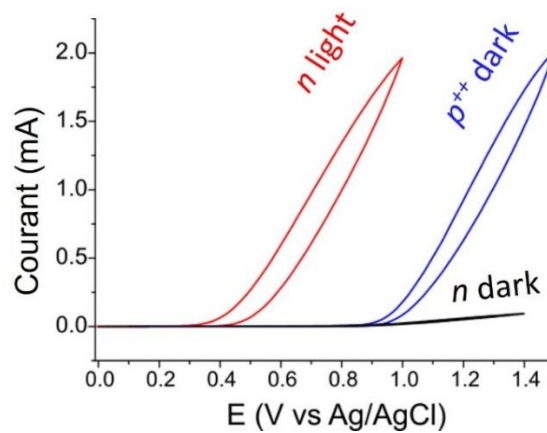


Figure 4.12 : CV mesuré sur une électrode dopée p^{++} recouverte du motif d'Ir dans le noir (bleu), sur une électrode dopée n avec le motif d'Ir sous illumination IR (rouge) et dans le noir (noir). Les mesures sont réalisées dans une solution de PBS à 0,1 M (pH 7,4) contenant du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ à 5 mM et de la TPrA à 0,1 M. Vitesse de balayage : 50 mV s^{-1} .^[35]

IV.2.3.2. Stabilité de la PECL

L'évolution de la PECL sur le $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ au cours du temps est ensuite analysée par capture d'images de microscopie avec une vitesse de 2 fps lors de la mesure de l'évolution du courant à un potentiel fixé à 0,8 V pendant 30 minutes. La moyenne de l'intensité PECL est mesurée sur les images pour chaque type de microbande : $50 \mu\text{m}/100 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}/50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}/50 \mu\text{m}$ et $5 \mu\text{m}/50 \mu\text{m}$. L'intensité PECL est également mesurée en dehors du motif.

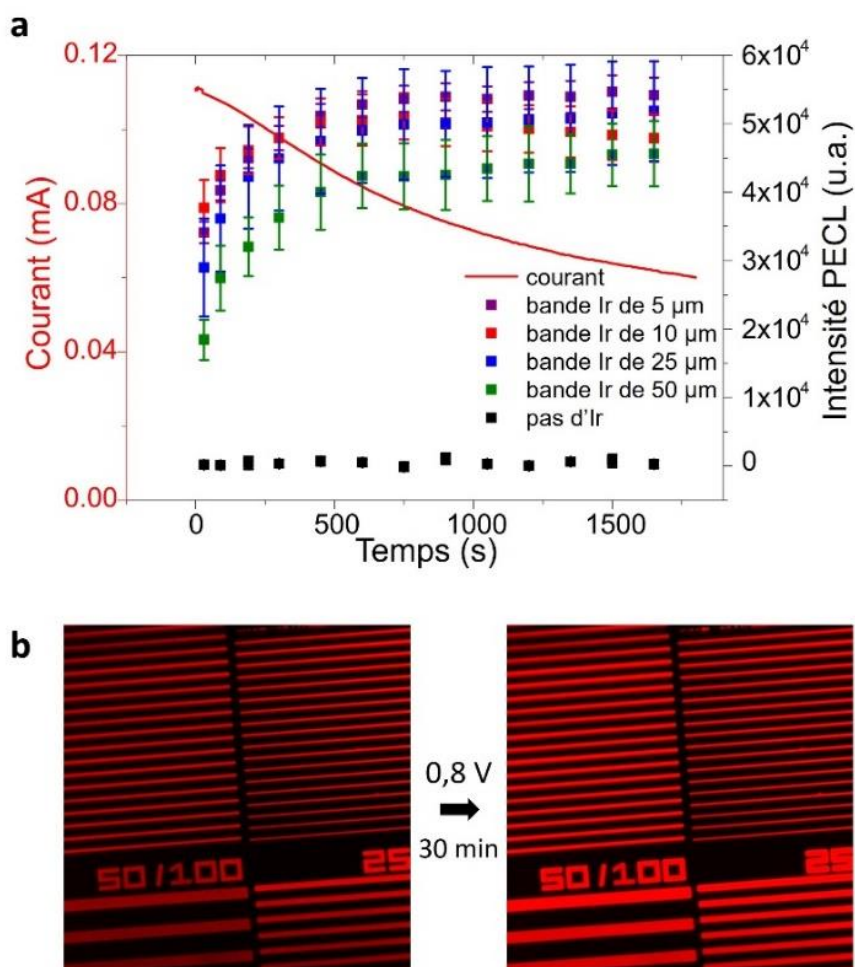


Figure 4.13 : a) Évolution du courant (ligne) et de l'intensité PECL au niveau de chacune des bandes d'Ir (carrés) au cours du temps avec un potentiel appliqué à 0,8 V et sous illumination d'une LED IR. b) Image PECL avant (gauche) et après (droite) la mesure potentiostatique. Les mesures sont réalisées dans une solution de PBS à 0,1 M (pH 7,4) contenant du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à 5 mM et de la TPrA à 0,1 M.^[35]

Sur la **Figure 4.13.a**, le photocourant (courbe rouge) diminue de 45 % après 30 minutes tandis que les intensité PECL sur chaque type de bande d'Ir augmentent et atteignent un plateau après environ 10 minutes. Les images au début et à la fin de la CA, enregistrées dans les mêmes conditions à l'aide d'une caméra CCD avec un $t_{\text{expo}} = 0,5$ s, complètent cette observation par un PECL qui apparaît plus intense à la fin de l'expérience (**Figure 4.13.b**). Ce comportement pourrait s'expliquer par la passivation anodique de la surface Si/SiO_x qui inhibe l'écoulement du courant résiduel sur la zone sans Ir et par l'oxydation de la surface d'Ir qui pourraient influencer le processus ECL. Cependant, le motif reste identique après 30 minutes, ne montrant aucun dommage évident. L'évolution de l'intensité ECL de l'électrode p^{++} -Si/SiO_x/Ir dans l'obscurité à 1,2 V présentée dans la **Figure 4.14** confirme ces observations.

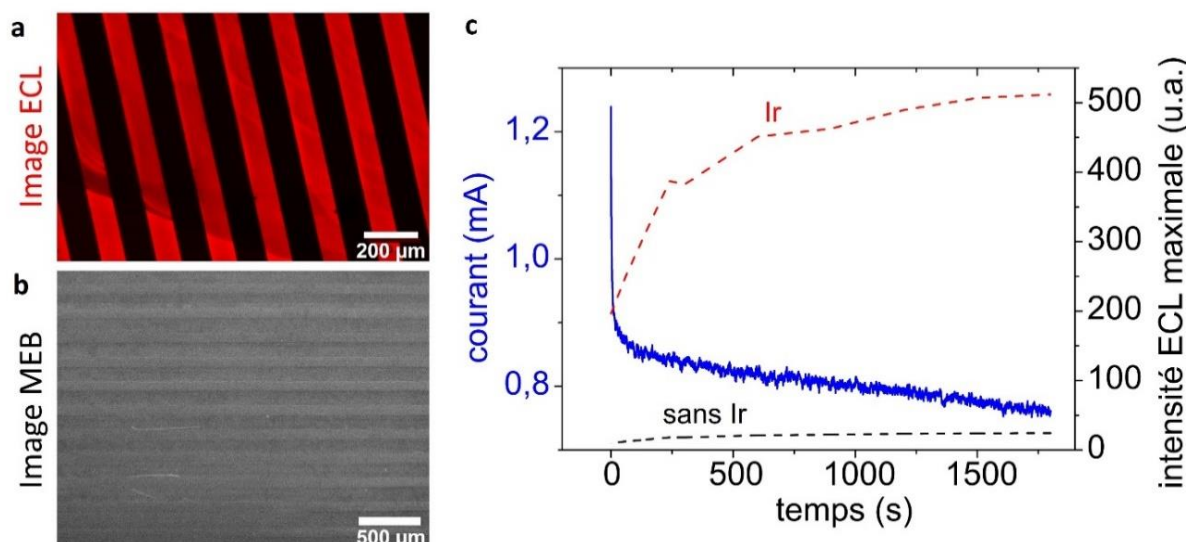


Figure 4.14 : a) Image au microscope d'un motif d'Ir de bandes de 50 μm de large espacées de 100 μm sur une anode p⁺-Si/SiO_x visible en ECL en utilisant le système [Ru(bpy)₃]²⁺/TPrA avec un potentiel appliqué à 1,2 V (vs. Ag/AgCl) et un t_{expo} = 1,5 s. b) Image MEB de la surface. c) Mesure CA de l'électrode dans le noir (ligne bleu continue) et intensité ECL localisé sur le motif d'Ir (ligne en pointillés rouge) et en dehors du motifs (ligne en pointillés noire).^[35]

IV.2.4. Conclusion

Précédemment, il a été démontré que la jonction MIS n-Si/SiO_x/Ir est jusqu'à présent l'interface la plus stable pour la fabrication de photoanodes^[6] et elle a également des implications dans le domaine de la conversion photoélectrochimique de l'énergie solaire.^[31-34] Dans cette étude, des surfaces photoactives inhomogènes comprenant des microbandes d'Ir de faibles épaisseur sont préparées sur des surfaces Si/SiO_x puis étudiées par microscopie optique PECL sous illumination IR émise par une LED. Les motifs d'émission PECL sont intenses, stables et présentent des caractéristiques géométriques identiques à celles des microbandes d'Ir. Ces résultats révèlent de manière instantanée le transfert de charge photoélectrochimique qui se produit aux niveau des microbandes Ir, qui est inhibé à la surface SiO_x. La microscopie PECL pourrait être utilisée comme une nouvelle approche pour comprendre la complexité des phénomènes inhomogènes à la jonction solide/liquide et pourrait contribuer au développement de la conversion photoélectrochimique de l'énergie solaire.

IV.3. Conclusion du chapitre

La stabilité de la structure MIS n -Si/SiO_x/Ir avec le couple ECL [Ru(bpy)₃]²⁺/TPrA et la conversion de type anti-Stokes ont permis d'appliquer la PECL pour la caractérisation des matériaux en photoélectrochimie. Cette analyse se base sur l'observation d'une lumière visible (ECL) photoinduite à la surface du SC par une lumière invisible (IR).

Dans un premier temps, l'absorption de la lumière d'excitation avec une lumière laser peut être localisée par PECL sur une surface homogène. De plus, la diffusion de charges dans le SC est visualisée en comparant le diamètre de la tache PECL à celle du laser.

Dans un second temps, la PECL met en évidence les transferts de charges du SC vers l'électrolyte localisés sur une surface hétérogène avec un motif d'Ir conducteur. La comparaison du motif observé au MEB et par microscopie PECL a montré que l'émission ECL est localisée de manière précise.

Sur la photoanode n -Si/SiO_x/Ir, l'image PECL a une meilleure résolution lorsqu'elle est localisée par un motif conducteur que par la lumière. Pour une application de la PECL en imagerie par IR, la résolution PECL peut être améliorée avec la mise en place d'un réseau de points conducteurs pour localiser la lumière ECL et réduire la tache PECL. Une étude est en cours de publication sur ce sujet. Une autre stratégie serait de remplacer le Si SC à bande interdite indirecte par un SC à bande interdite directe avec une durée de vie des porteurs de charges plus faibles pour diminuer la diffusion.

Cependant, la bonne localisation de la PECL sur le motif métallique ouvre la voie vers l'analyse et le développement des matériaux pour la photoélectrochimie. En effet, elle permet d'une part de détecter précisément où les transferts de charge ont lieu sur l'électrode, et d'autre part elle pourrait quantifier ce taux de transfert selon l'intensité de luminescence. L'intensité PECL pourrait être également un moyen de détecter une réaction secondaire ou la formation d'une couche passivante avec une diminution de la luminescence, ou bien une augmentation de celle-ci lorsque la réaction est catalysée. De cette manière, la PECL pourrait par exemple être utilisée pour l'étude des nanoparticules (NPs) de Ni^[19] ou de NPs plasmoniques en Au, Ag ou Cu pour la génération de H₂ ou la réduction du CO₂.^[40]

La localisation de la PECL sera utilisée dans le chapitre suivant avec le développement d'une électrode nanostructurée pour de la PECL générée sans le support d'un potentiostat et offre des perspectives intéressantes pour de la bio-imagerie PECL.

Références

- [1] M. G. Walter, E. L. Warren, J. R. McKone, S. W. Boettcher, Q. Mi, E. A. Santori, N. S. Lewis, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6446–6473.
- [2] D. G. Nocera, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 767–776.
- [3] T. Morikawa, S. Sato, K. Sekizawa, Tomiko. M. Suzuki, T. Arai, *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*, 933–943.
- [4] P. B. Pati, R. Wang, E. Boutin, S. Diring, S. Jobic, N. Barreau, F. Odobel, M. Robert, *Nat Commun* **2020**, *11*, 3499.
- [5] I. Roh, S. Yu, C.-K. Lin, S. Louisia, S. Cestellos-Blanco, P. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 8002–8006.
- [6] Y. Zhao, J. Descamps, S. Ababou-Girard, J.-F. Bergamini, L. Santinacci, Y. Léger, N. Sojic, G. Loget, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202201865.
- [7] K. McIntosh, M. Abbott, B. Sudbury, “PV Lighthouse,” can be found under <https://www.pvlighthouse.com.au/>, **n.d.**
- [8] M. E. Law, E. Solley, M. Liang, D. E. Burk, *IEEE Electron Device Lett.* **1991**, *12*, 401–403.
- [9] “IOFFE semiconductor database,” can be found under <http://www.ioffe.ru/SVA/NSM/Semicond/>, **n.d.**
- [10] J. A. Del Alamo, R. M. Swanson, *Solid-State Electronics* **1987**, *30*, 1127–1136.
- [11] Y. B. Vogel, N. Darwish, S. Ciampi, *Cell Rep. Phys. Sci.* **2020**, *1*, 100107.
- [12] L. L. Shultz, J. S. Stoyanoff, T. A. Nieman, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 349–354.
- [13] D. Bae, B. Seger, P. C. K. Vesborg, O. Hansen, I. Chorkendorff, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1933–1954.
- [14] B. Fabre, G. Loget, *Acc. Mater. Res.* **2023**, *4*, 133–142.
- [15] G. Loget, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2019**, *39*, 40–50.
- [16] L. Pan, J. H. Kim, M. T. Mayer, M.-K. Son, A. Ummadisingu, J. S. Lee, A. Hagfeldt, J. Luo, M. Grätzel, *Nat Catal* **2018**, *1*, 412–420.
- [17] I. A. Digdaya, G. W. P. Adhyaksa, B. J. Trzeźniewski, E. C. Garnett, W. A. Smith, *Nat Commun* **2017**, *8*, 15968.
- [18] F. A. L. Laskowski, S. Z. Oener, M. R. Nellist, A. M. Gordon, D. C. Bain, J. L. Fehrs, S. W. Boettcher, *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 69–76.
- [19] G. Loget, B. Fabre, S. Fryars, C. Mériadec, S. Ababou-Girard, *ACS Energy Lett.* **2017**, *2*, 569–573.
- [20] K. Oh, V. Dorcet, B. Fabre, G. Loget, *Adv. Energy Mater.* **2020**, *10*, 1902963.
- [21] S. Lee, L. Ji, A. C. De Palma, E. T. Yu, *Nat Commun* **2021**, *12*, 3982.
- [22] D. V. Esposito, J. B. Baxter, J. John, N. S. Lewis, T. P. Moffat, T. Ogitsu, G. D. O’Neil, T. A. Pham, A. A. Talin, J. M. Velazquez, B. C. Wood, *Energy Environ. Sci.* **2015**, *8*, 2863–2885.
- [23] G. Loget, S. So, R. Hahn, P. Schmuki, *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2*, 17740–17745.
- [24] J. Lee, H. Ye, S. Pan, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7445–7450.
- [25] V. Badets, G. Loget, P. Garrigue, N. Sojic, D. Zigah, *Electrochimica Acta* **2016**, *222*, 84–91.
- [26] F. Gelb, Y.-C. Chueh, N. Sojic, V. Keller, D. Zigah, Cottineau, *Sustainable Energy Fuels* **2020**, *4*, 1099–1104.
- [27] R. Gutkowski, C. Khare, F. Conzuelo, Y. U. Kayran, A. Ludwig, W. Schuhmann, *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 1213–1221.
- [28] X. Zhou, Z. T. Gossage, B. H. Simpson, J. Hui, Z. J. Barton, J. Rodríguez-López, *ACS Nano* **2016**, *10*, 9346–9352.
- [29] D. V. Esposito, I. Levin, T. P. Moffat, A. A. Talin, *Nature Mater* **2013**, *12*, 562–568.

- [30] J.-W. Xue, C.-H. Xu, W. Zhao, H.-Y. Chen, J.-J. Xu, *Nano Lett.* **2023**, *23*, 4572–4578.
- [31] A. G. Scheuermann, J. P. Lawrence, K. W. Kemp, T. Ito, A. Walsh, C. E. D. Chidsey, P. K. Hurley, P. C. McIntyre, *Nature Mater* **2016**, *15*, 99–105.
- [32] S. E. Jun, Y.-H. Kim, J. Kim, W. S. Cheon, S. Choi, J. Yang, H. Park, H. Lee, S. H. Park, K. C. Kwon, J. Moon, S.-H. Kim, H. W. Jang, *Nat Commun* **2023**, *14*, 609.
- [33] O. L. Hendricks, R. Tang-Kong, A. S. Babadi, P. C. McIntyre, C. E. D. Chidsey, *Chem. Mater.* **2019**, *31*, 90–100.
- [34] M. Ben-Naim, D. W. Palm, A. L. Strickler, A. C. Nielander, J. Sanchez, L. A. King, D. C. Higgins, T. F. Jaramillo, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 5901–5908.
- [35] J. Descamps, Y. Zhao, J. Le-Pouliquen, B. Goudeau, P. Garrigue, Y. Léger, G. Loget, N. Sojic, *Chem. Commun.* **2023**, *59*, 12262–12265.
- [36] G. Loget, C. Mériadec, V. Dorcet, B. Fabre, A. Vacher, S. Fryars, S. Ababou-Girard, *Nat Commun* **2019**, *10*, 3522.
- [37] J. Dabboussi, R. Abdallah, L. Santinacci, S. Zanna, A. Vacher, V. Dorcet, S. Fryars, D. Floner, G. Loget, *J. Mater. Chem. A* **2022**, *10*, 19769–19776.
- [38] A. Chovin, P. Garrigue, P. Vinatier, N. Sojic, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 357–364.
- [39] Y. Zhao, J. Descamps, B. Le Corre, Y. Léger, A. Kuhn, N. Sojic, G. Loget, *J. Phys. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 5538–5544.
- [40] S. Ezendam, M. Herran, L. Nan, C. Gruber, Y. Kang, F. Gröbmeyer, R. Lin, J. Gargiulo, A. Sousa-Castillo, E. Cortés, *ACS Energy Lett.* **2022**, *7*, 778–815.

Chapitre V : Développement et application de la PECL pour la bioanalyse et la bio-imagerie

V. Développement et application de la PECL pour la bioanalyse et la bio-imagerie

V.1. La PECL tout optique : l'AO-ECL

V.1.1. Introduction

Comme présenté dans les chapitres précédents, l'ECL est une technique analytique sensible^[1] appliquée en biodétection^[2-4] et en imagerie.^[5] Puisque l'ECL propose une lecture optique du signal, elle évolue progressivement d'une technique analytique à une méthode de microscopie puissante.^[6,7] Les progrès récents dans la PECL ont montré la possibilité de réduire le potentiel nécessaire pour atteindre l'ECL à une électrode semi-conductrice éclairée.^[8-10] Cependant, des sources d'alimentation externes sont jusqu'à présent encore nécessaires impliquant des connecteurs et des fils électriques. Cela limite considérablement l'applicabilité de l'ECL, en particulier pour les non-spécialistes ainsi que pour analyse sur place ou portable.

L'étude présentée ici décrit la génération de PECL sans assistance électrique avec uniquement une source de lumière d'excitation. L'approche est nommée ECL tout optique (« All Optical ECL » ou AO-ECL). Cette stratégie a été inspirée par la recherche sur les dispositifs photoélectrochimiques tout optique et sans potentiostat appliqués pour l'électrolyse de l'eau.^[11-20] L'AO-ECL présentée dans cette partie est basée sur une jonction photovoltaïque nano-structurée à base de Si de type pnn^{++} , modifiée avec des revêtements catalytiques en Au sur la face qui joue le rôle de WE (photoanode) et en Pt sur l'autre face qui agit comme une CE (cathode). Cette structure permet ainsi de générer l'ECL et la contre-réaction associée de part et d'autre de l'électrode monolithique sous excitation lumineuse. Le couple luminol/H₂O₂ a été choisi pour cette étude car l'émission ECL est générée à un potentiel relativement faible. Le photovoltage V_{oc} étant suffisant pour générer la réaction électrochimique, l'électrode ne nécessite ni alimentation électrique ni électrodes supplémentaires, mais uniquement un dispositif entièrement optique immergé dans une solution ECL standard constituant ainsi la configuration ECL la plus simple rapportée jusqu'à présent.

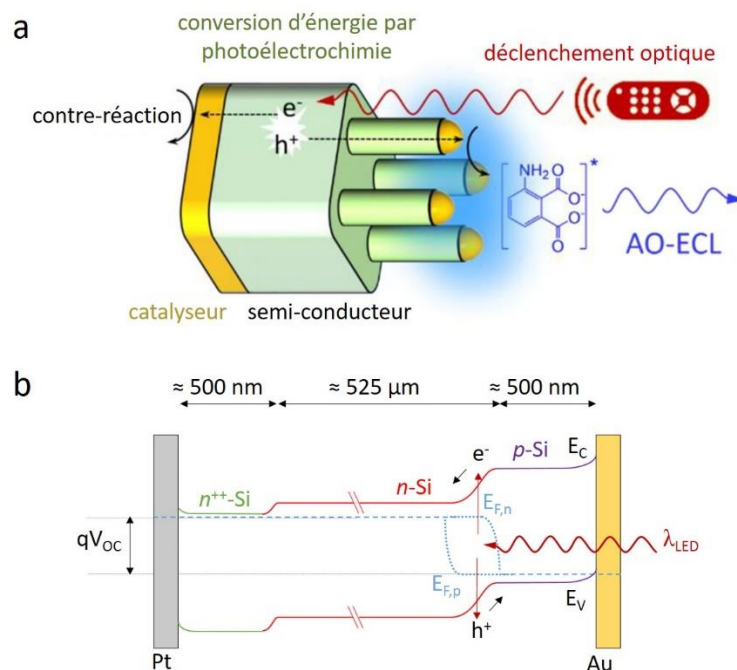


Figure 5.1 : a) Schéma du principe du AO-ECL déclenché à la surface d'une jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt par une stimulation lumineuse avec la réaction anodique de l'ECL sur les nanopiliers en or, et la contre-réaction au dos de l'électrode au niveau du catalyseur en Pt. b) Schéma du diagramme de bandes de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt sous illumination générant un V_{oc} supérieur à la surtension nécessaire pour déclencher la réaction d'ECL. [21]

V.1.2. Électrode monolithique

V.1.2.1. Conception de l'électrode

Pour pouvoir observer de l'ECL sans l'assistance d'un potentiostat, il faut que la lumière puisse générer un V_{oc} suffisant à la surface de l'électrode. Pour cela, l'AO-ECL est basée sur une électrode en Si type n , dopée p et n^{++} de chaque côté pour une meilleure séparation des charges. L'extrémité du côté n^{++} est protégée par un dépôt de Pt qui catalyse la contre-réaction de l'ECL avec la réduction de l'eau. L'autre extrémité p est recouverte par un dépôt d'au. L'approche d'AO-ECL est donc basée sur un dispositif photoélectrochimique de structure Au/pnn⁺⁺-Si/Pt. C'est dans la jonction pn que la lumière incidente est absorbée et convertie en paires d' e^-/h^+ nécessaires pour déclencher le processus ECL. Cependant, la couche d'au agit comme un miroir et reflète la majeure partie de la lumière d'excitation, qui ne pourrait donc pas atteindre la jonction pn . C'est pour cette raison que la surface est nanostructurée par des piliers de Si dopé p recouverts d'au aux sommets, comme le montre les images MEB de la **Figure 5.2.d,e**. De cette manière, la lumière incidente est absorbée efficacement dans la région pn active. Il est important de noter que seule la partie dopée p doit être en contact avec l'électrolyte. Si le Si dopé n était également en contact, alors un raccourci aurait été créé avec un transfert des h^+ directement de la partie n vers l'électrolyte, ce qui aurait considérablement réduit le V_{oc} et permis l'ECL tout optique. Les dispositifs Au/pnn⁺⁺-Si/Pt sont fabriqués sur des tranches de Si par une combinaison d'implantation de dopants, de lithographie de nanosphères et de gravure ionique

réactive par le groupe de Borja Sepulveda à l'Institut de Microelectronica de Barcelona (voir la partie concernant la fabrication de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt dans la section expérimentale).

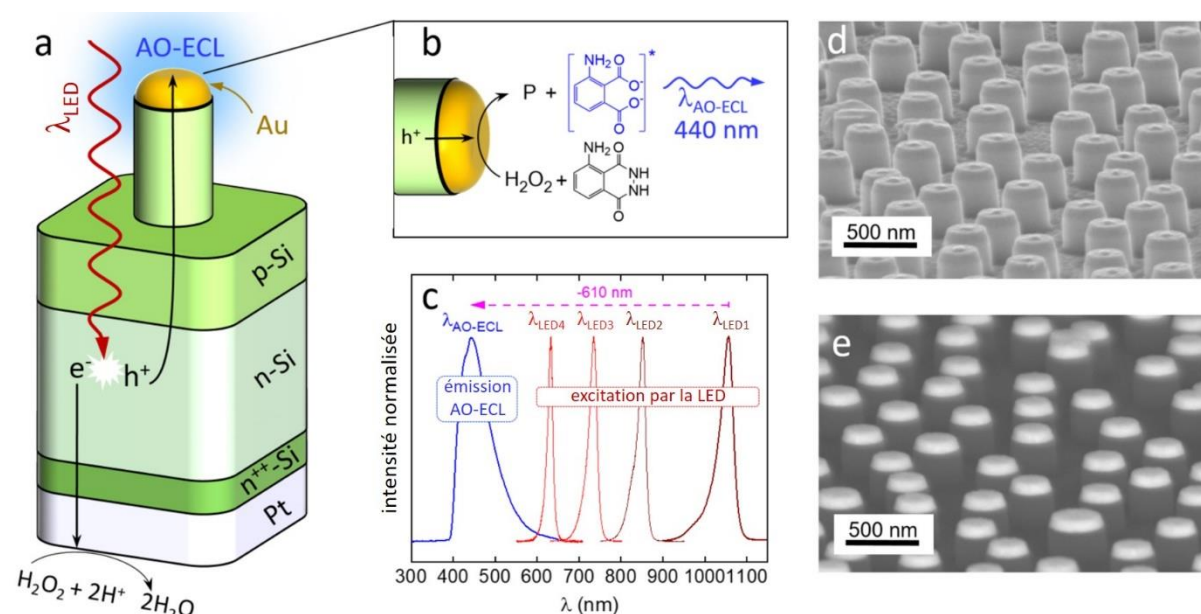


Figure 5.2 : Schéma de l'AO-ECL monolithique au niveau d'une jonction nano-structurée Au/pnn⁺⁺-Si/Pt sous illumination d'une LED. b) Mécanisme de transfert des h⁺ conduisant à la génération de photons à l'interface solide-liquide, P représente les produits de réaction. c) Spectres normalisés des excitations incidentes des différentes LED (courbes marron/rouge) et de l'émission AO-ECL résultante du luminol en présence de H₂O₂ à la surface de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt (courbe bleue) ; le plus grand déplacement anti-Stokes est indiqué par une flèche en pointillés rose. Images MEB d) d'e⁻ secondaires (d) et e) d'e⁻ rétrodiffusées de la face avant de l'électrode Au/pnn⁺⁺-Si/Pt.^[21]

Pour générer l'AO-ECL, le dispositif Au/pnn⁺⁺-Si/Pt est entièrement immergé dans l'électrolyte comprenant le système ECL luminol/H₂O₂. Pour rappel, ce système ECL modèle est appliqué dans différents domaines tels que la biodétection, la médecine légale et l'imagerie.^[1,22] L'électrolyte contient 10 mM de luminol et 33 mM de H₂O₂ dans 0,1 M de KOH (pH = 12,8) car l'ECL du luminol est optimal en milieu alcalin. Pour limiter la production de bulles de gaz (O₂) par la réaction qui générerait les mesures de courant, d'intensité ECL et l'imagerie AO-ECL, un tensioactif Triton X-100 est ajouté à 0,1 % à la solution.

Le mécanisme de génération d'AO-ECL sans fil se produisant à la surface du dispositif monolithique Au/pnn⁺⁺-Si/P éclairé est représenté sur la **Figure 5.2.a** et la réaction ECL localisée sur la partie en Au (photoanode) est schématisée dans la **Figure 5.2.b**. Lorsque la jonction est illuminée du côté de la photoanode par des photons ayant une énergie plus élevée que l'E_g du Si, les e⁻ photogénérés diffusent vers la surface de Pt où ils déclenchent la réduction de H₂O₂, et les h⁺ diffusent vers les contacts en Au permettant l'oxydation simultanée du H₂O₂ et du luminol.^[22,23]

Dans le cas présenté ici, l'éclairage à grande longueur d'onde conduit à un processus de type anti-Stokes où les photons de faible énergie (à partir de 1,18 eV) sont convertis en photons de haute énergie (2,82 eV) avec une lumière bleue à 425 nm issue du luminol. L'AO-ECL est possible avec des longueurs d'onde d'excitation allant du visible au proche IR. Au cours de cette étude, plusieurs LED monochromatiques à différentes longueurs d'ondes sont utilisées pour exciter le Si : 633, 733, 850 et

1050 nm (LED4, LED3, LED2 et LED1 respectivement). La conversion ascendante peut alors être supérieure à 600 nm avec la LED4 (**Figure 5.2.c**), permettant de séparer facilement l'éclairage de l'émission AO-ECL, ce qui est avantageux pour une application en imagerie.

Avant d'effectuer les expériences photoélectrochimiques avec la jonction Au/*pnn*⁺⁺-Si/Pt, les surfaces anodiques et cathodiques sont étudiées plus en détail.

V.1.2.2. Une face anodique en nanopiliers de Si/Au

Les images MEB de la face avant (côté Au) réalisées à l'ISCR révèlent la géométrie et le réseau de nanostructures. La surface est densément recouverte de nanopiliers distribués aléatoirement. Ceux-ci ont un diamètre d'environ 275 nm et une hauteur totale de 265 nm, dont 190 nm du nano-pilier de Si dopé *p* et 75 nm du disque nanométrique d'Or nano, comme le montre la **Figure 5.3.d**. La hauteur du nano-pilier aurait pu être un peu plus élevée pour augmenter l'absorption des photons, jusqu'à 400 nm de hauteur. Mais dans ce cas, la partie du Si dopée *n* entrerait en contact avec l'électrolyte, ce qui diminuerait le V_{OC} comme mentionné précédemment. Les nanopiliers sont alors petits car le contrôle de la hauteur du nano-pilier présente une certaine incertitude.

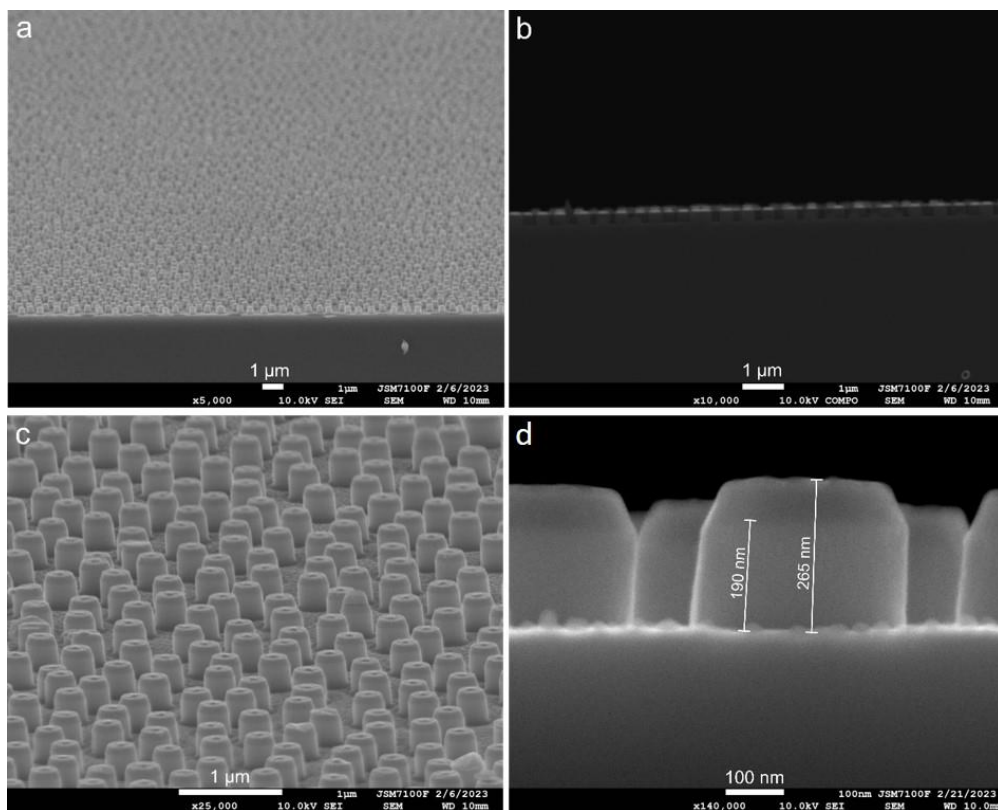


Figure 5.3 : Image MEB d'une coupe transversale de la jonction Au/*pnn*⁺⁺-Si/Pt au niveau des nano-structures Si/Au.^[21]

Pour comprendre l'influence des nanopiliers recouverts d'or lors de la photoconversion, le spectre d'absorption théorique de la surface nanostructurée a été calculé par la méthode de calcul de différences finies dans le domaine temporel (« Finite Difference Time Domain » ou FDTD) effectué

au laboratoire FOTON. Il est superposé au spectre d'absorption du Si plan. En comparant les deux spectres, les nanodisques d'or sur les nanopiliers en Si présentent une absorption améliorée à 850 nm en raison d'une résonance hybride plasmonique-diélectrique. L'AO-ECL devrait donc être favorisée avec cette longueur d'onde d'excitation (LED2). Les disques en Au nanostructurés laissent penser à une éventuelle résonance purement plasmonique. Or, la résonance plasmonique du nano-disque d'Or d'environ 275 nm de diamètre est située à 1,5 μm , c'est-à-dire beaucoup plus élevée que la bande interdite du silicium de 1,1 μm . Cette résonance n'intervient donc pas dans le processus de génération de PECL, contrairement à ce qui a été récemment observé par W. Zhao et al. avec des nanoparticules d'Or déposés sur du TiO_2 .^[24]

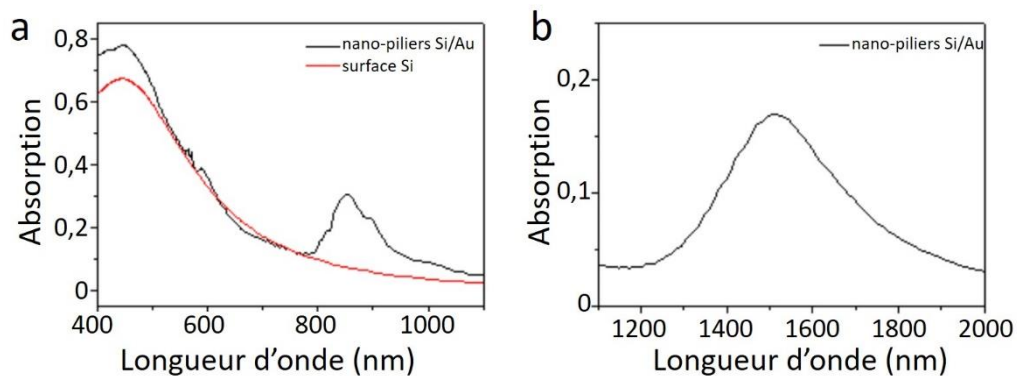


Figure 5.4. a) Spectres d'absorption théoriques de la surface nanostructurée Si/Au calculés par FDTD (courbe noire), en supposant que les nanopiliers de Si soient en réseau avec un pas de 600 nm, un diamètre de 275 nm et une hauteur 190 nm, coiffés d'un nano-disque d'Or du même diamètre et d'une hauteur de 75 nm, montrant la résonance hybride plasmonique-diélectrique située à une longueur d'onde de 850 nm, comparée à l'absorption d'une surface plane en Si seulement (courbe rouge). b) Spectre d'absorption similaire à la surface nanostructurée Si/Au montrant la résonance plasmonique standard située à une longueur d'onde de 1500 nm.^[21]

Enfin, la composition de la face anodique est analysée par XPS à l'ISCR sur la **Figure 5.5** et il présente bien les caractéristiques du Si et de l'Or attendues, avec des traces de C. Ces atomes sont visibles au niveau des pics de Si 2p et Si 2s à 99 et 149 eV, et d'Or 5p, 4f, 4d_{5/2}, 4j_{3/2}, et 16p_{3/2} à 56, 83, 334, 353 et 547 eV, respectivement. Le spectre présente également une contribution en O 1s à 533 eV, principalement attribuée au SiO_x, ainsi que de F 2s et F 1s qui culminent respectivement à 25 et 688 eV. La présence d'atomes F s'explique par le SF₆/C₄F₈ utilisé lors du processus de nanostructuration de la surface par gravure sèche par (« Reactive-Ion etching » ou RIE) réalisée à l'Institut de Microélectronique de Barcelone (IMB).

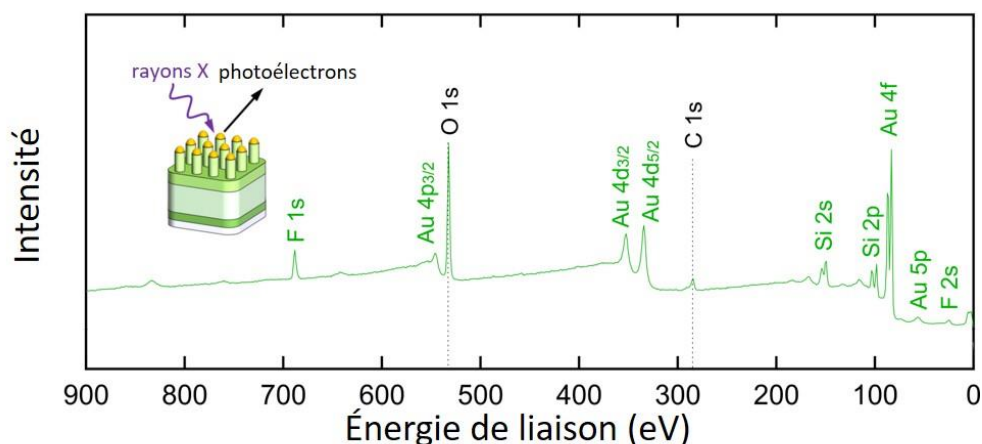


Figure 5.5. Spectre XPS enregistré en face avant de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt.^[21]

V.1.2.3. Une face cathodique en Pt

Le Pt est choisi pour protéger le Si du côté cathodique grâce à ses performances électrocatalytiques pour la réduction du H₂O₂.^[25] L'image MEB capturée à l'ISCR d'une coupe transversale de la jonction met en évidence un film mince de Pt d'une épaisseur d'environ 50 nm (**Figure 5.6**). La nano-structuration de la face arrière n'est pas utile car ce côté n'est pas éclairé lors de l'AO-ECL.

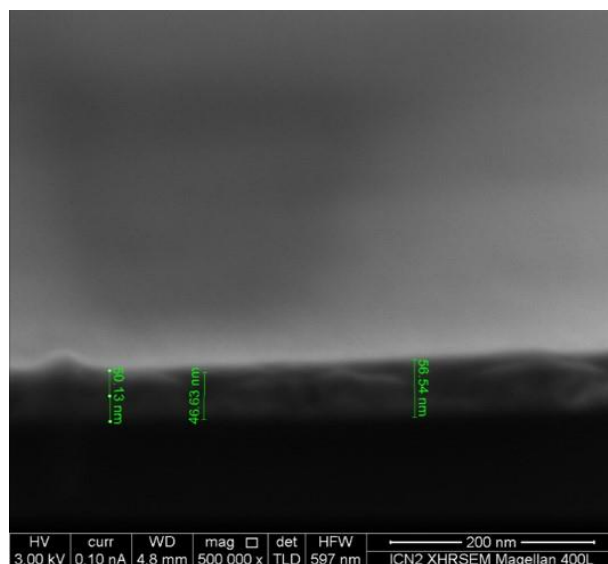


Figure 5.6 : Image MEB d'une coupe transversale de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt au niveau du dépôt de Pt.^[21]

Pour compléter la caractérisation, le spectre XPS de la **Figure 5.7** fournie par l'ISCR montre des caractéristiques d'un film mince dense de Pt avec Pt 5p, 4f, 4d_{5/2}, 4j_{3/2}, 16h_{3/2}, et 16p_{1/2} à 52, 71, 314, 331, 519 et 608 eV, respectivement. Il présente également une petite contribution d'O 1s à 531 eV, un pic de N 1s à 399 eV et un pic C 1s à 285 eV, attribués à des matières organiques résiduelles.

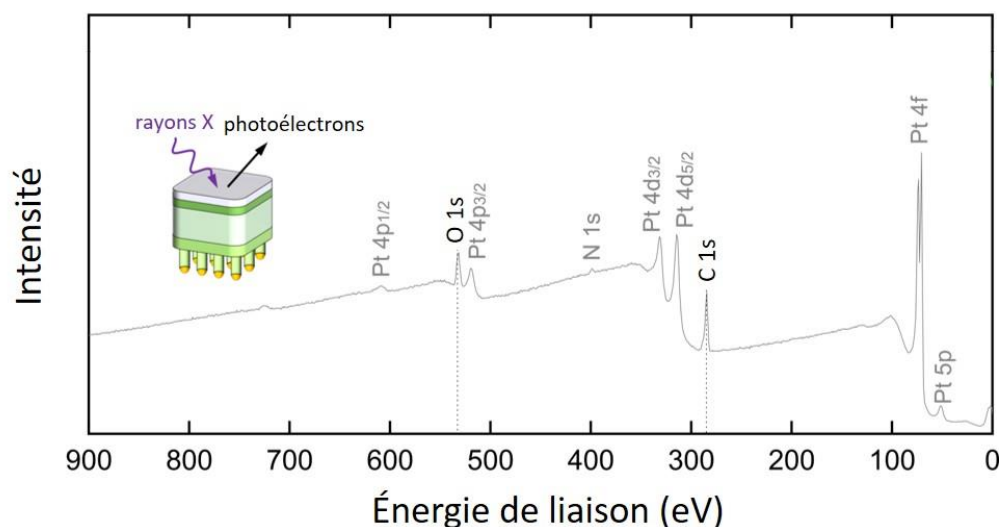


Figure 5.7 : Spectre XPS enregistré sur la face arrière de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt.^[21]

V.1.3. Études photoélectrochimiques de l'électrode

V.1.3.1. Configuration à trois électrodes

Pour comprendre les processus impliqués dans l'AO-ECL sans fil, les propriétés électrochimiques de la face avant (la photoanode Au/pnn⁺⁺-Si) et de la face arrière (la cathode Pt) sont d'abord étudiées indépendamment en présence de l'électrolyte ECL avec un montage conventionnel à trois électrodes.

Le comportement de la photoanode Au/pnn⁺⁺-Si est d'abord analysé par voltammétrie cyclique sous illumination IR par une LED à 850 nm et dans le noir dans la **Figure 5.8.a**. Le courant apparaît à -0,52 V et il est bien photogénéré car il devient négligeable dans l'obscurité. Le faible potentiel d'apparition du photocourant indique que les h⁺ photogénérés participent efficacement aux processus d'oxydation à l'interface solide-liquide. Le V_{oc} est déterminé en comparant le potentiel d'apparition du courant entre la photoanode Au/pnn⁺⁺-Si et une électrode en or et il est estimé à 0,46 V dans la **Figure 5.8.b**.

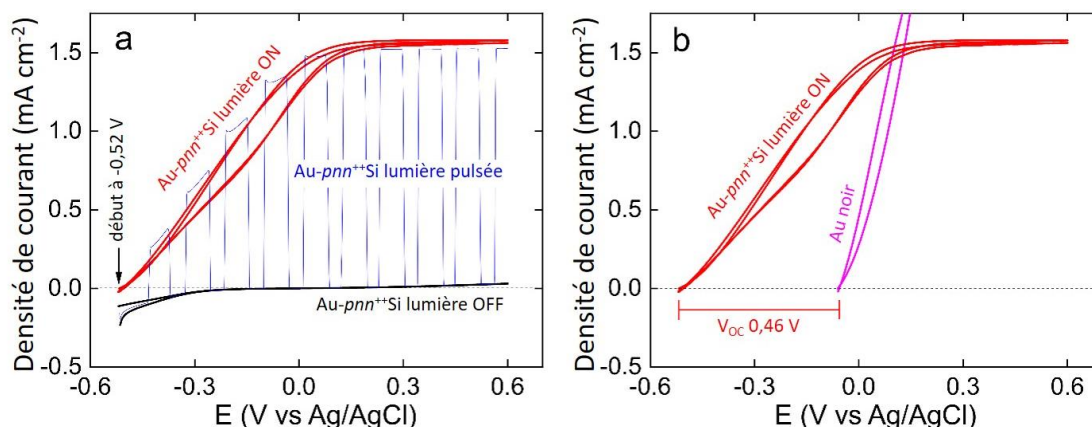


Figure 5.8 : a) CVs enregistrés en montage à trois électrodes au niveau d'une jonction Au/pnn⁺⁺-Si sous illumination IR (rouge) et dans le noir (noir). La voltammogramme sous illumination IR intermittente est représenté par la courbe bleue. b) CVs enregistrés en montage à trois électrodes avec une jonction Au/pnn⁺⁺-Si illuminée par IR (rouge) et avec une électrode en or dans le noir. Le V_{oc} est indiqué par la ligne rouge. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ (pH = 12,8) et 0,1 % de Triton X-100 dans 0,1 M de KOH. LED IR : $\lambda_{LED2} = 850 \text{ nm}$, $P_{LED} = 5 \text{ mW cm}^{-2}$. Vitesse de balayage = 50 mV s^{-1} .^[21]

La photoanode Au/pnn⁺⁺-Si est comparée avec une jonction *pn* plate et sans Au étudiée dans les mêmes conditions d'éclairage. Cette jonction simplifiée n'a produit qu'une densité de photocourant 30 fois inférieure ($50 \mu\text{A cm}^{-2}$) (**Figure 5.9.a**, courbe verte) en raison du mauvais transfert de h⁺ à l'interface SiO_x qui a passivé électriquement le Si.^[26–28] Les mesures d'OCP, effectuées sous un éclairage IR intermittent (**Figure 5.9.b**), ont permis de mesurer une valeur de V_{oc} de 0,47 V, ce qui est en bon accord avec la valeur à 0,46 V estimée par le décalage de potentiels entre les CVs (**Figure 5.8.b**).

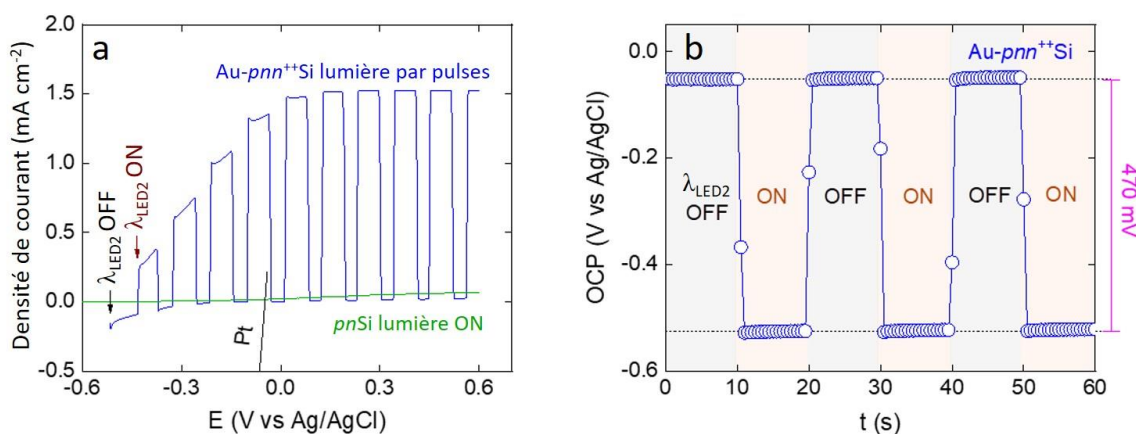


Figure 5.9. a) Voltammogramme à balayage linéaire enregistrée en montage à trois électrodes sur une jonction Au-pnn⁺⁺-Si sous illumination IR (courbe bleue), sur une électrode pnSi sous illumination continue (courbe verte), et dans le noir sur une électrode de Pt (courbe grise). Vitesse de balayage : 50 mV s^{-1} . b) Mesures OCP de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si dans un montage à trois électrodes sous lumière IR intermittente (même courbe que la Figure 5.8). Le V_{oc} est indiqué par une ligne rose. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ (pH = 12,8) et 0,1 % de Triton X-100 dans 0,1 M de KOH. LED IR : $\lambda_{LED2} = 850 \text{ nm}$, $P_{LED} = 5 \text{ mW cm}^{-2}$.^[21]

Le CV de la face arrière en Pt, c'est-à-dire l'arrière de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt, est enregistré dans l'obscurité (**Figure 5.9.a**) et affiche une activité cathodique à un potentiel de $-0,07 \text{ V}$, correspondant à la réduction de H₂O₂ (voir la **Figure 5.10** réalisée à l'ISCR).^[29] Le fait que le potentiel

de déclenchement de la cathode soit plus positif que celui de la photoanode éclairée indique que les deux électrodes en court-circuit (Au/*pnn*⁺⁺-Si/Pt) devraient générer spontanément un photocourant dans ce milieu.

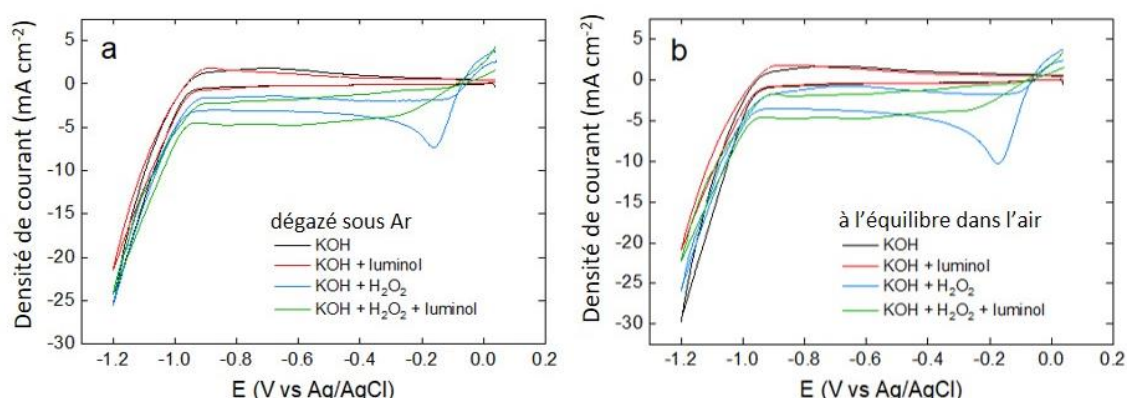


Figure 5.10 : CVs enregistrés en configuration à trois électrodes a) dans un électrolyte dégazé à l'Ar et b) dans un électrolyte à l'équilibre dans l'air. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ (pH = 12,8) et 0,1 % de Triton X-100 dans 0,1 M de KOH. LED IR : $\lambda_{LED2} = 850 \text{ nm}$, $P_{LED} = 5 \text{ mW cm}^{-2}$. Vitesse de balayage = 50 mV s^{-1} .^[21]

Enfin, les mesures d'IPCE (**Figure 5.11**, courbe bleue) effectuées à l'ISCR et enregistrées à 0,6 V au niveau de la photoanode Au/*pnn*⁺⁺-Si confirment la forte photoactivité de l'électrode dans la région visible à proche infrarouge avec une valeur maximale de 48 % à $\lambda_{LED2} = 850 \text{ nm}$. Ce pourcentage correspond à une efficacité de photoconversion de $0,33 \text{ mA mW}^{-1}$, ce qui est en bon accord avec la valeur de 1,5 mA mesurée par voltamétrie à 0,6 V pour une même densité de puissance d'éclairage. Il est important que noter que l'inactivité dans les UV est causée par l'absorption de l'électrolyte (**Figure 5.10**, courbe noire).

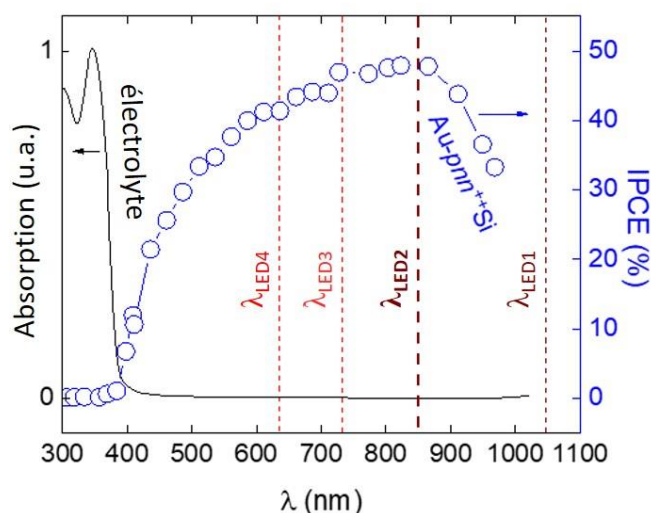


Figure 5.11 : Spectre IPCE enregistré sur une électrode avec un montage à trois électrodes Au/*pnn*⁺⁺-Si (courbe bleue) sous un potentiel de 0,6 V vs. Ag/AgCl superposé avec le spectre d'absorption de l'électrolyte (courbe noire). Les longueurs d'ondes des LED utilisées pour exciter la jonction Au/*pnn*⁺⁺-Si sont représentées par les lignes en pointillés. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ (pH = 12,8), 0,1 % de Triton X-100 dans 0,1 M de KOH.^[21]

V.1.3.2. Configuration à deux électrodes

Le comportement photoélectrochimique est ensuite testé en montage à deux électrodes afin de surveiller le flux de courant entre les deux surfaces Au/*pnn*⁺⁺-Si et Pt en fonction du biais imposé. Alors qu'un courant négligeable est mesuré dans l'obscurité (**Figure 5.12.a**, courbe noire), un photocourant considérable est produit sous l'éclairage de la photoanode Au/*pnn*⁺⁺-Si avec $\lambda_{LED2} = 850$ nm (**Figure 5.12.a**, courbe bleue), avec une densité de courant de 1 mA cm^{-2} en court-circuit, c'est-à-dire un à un biais de 0 V. Cela prouve que le système permet de promouvoir spontanément les réactions redox sur les deux faces. La génération d'AO-ECL est également évaluée en mesurant l'émission à la photoanode avec un spectromètre. La **Figure 5.12.b** représente le signal d'intensité ECL enregistré pendant le balayage de la polarisation et montre que l'émission ECL commence avec une polarisation négative, ce qui démontre bien la possibilité de génération d'ECL dans des conditions de court-circuit.

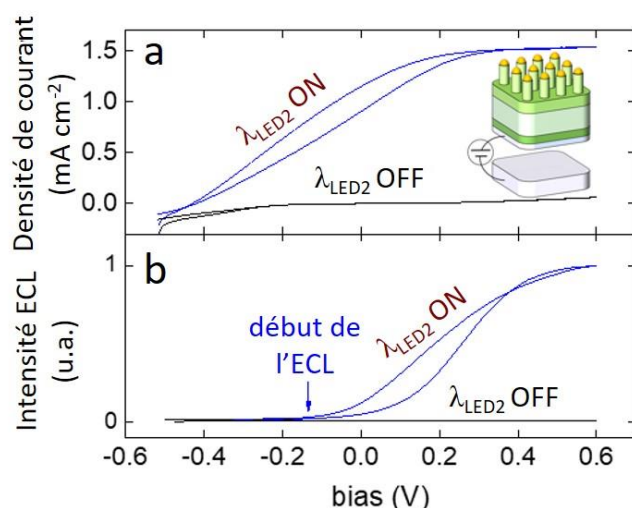


Figure 5.12 : a) CV et b) intensité ECL correspondante enregistrée à la surface d'une anode sous illumination IR (bleu) et dans l'obscurité (noir) en montage à deux électrode avec une cathode en Pt. Encadré : Schéma du montage à deux électrodes. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ (pH = 12,8) et 0,1 % de Triton X-100 dans 0,1 M de KOH. LED IR : $\lambda_{LED2} = 850$ nm, $P_{LED} = 5 \text{ mW cm}^{-2}$. Vitesse de balayage : 50 mV s^{-1} .^[21]

Cette observation est confirmée en mesurant l'émission ECL et la densité de courant produites en court-circuit en fonction du temps (**Figure 5.13.a**) et de la P_{LED} (**Figure 5.14.b**). Les mesures ont été réalisées au laboratoire ISCR. La densité de courant et l'intensité ECL émis par excitation de la LED sont stables pendant au moins 30 minutes. Le système est alors assez robuste pour pouvoir être appliqué en analyse ou imagerie. De plus, l'intensité lumineuse et la densité de courant augmentent proportionnellement à la P_{LED} . Cette dépendance permet un contrôle du signal par la puissance lumineuse, ce qui est adapté pour de l'imagerie IR par exemple.

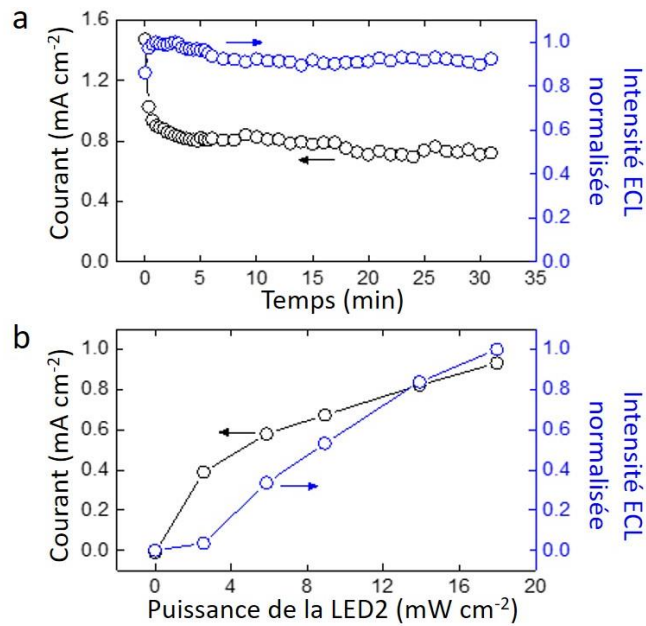


Figure 5.13 : a) Graphique montrant la densité de photocourant et l'intensité d'émission AO-ECL en fonction du temps sous éclairage IR. b) Graphique montrant la densité de photocourant et l'intensité AO-ECL en fonction de la P_{LED} à 850 nm. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H_2O_2 (pH = 12,8) et 0,1 % de Triton X-100 dans 0,1 M de KOH.^[21]

V.1.3.3. Expérience contrôle en configuration à deux électrodes

Pour confirmer que l'ECL observé est bien strictement photoinduite, l'image de la jonction Au/ pnn^{++} Si est capturée à l'aide de la caméra d'un téléphone portable sous illumination ou dans l'obscurité, en circuit fermé (c'est-à-dire connecté à la CE en Pt) ou en circuit ouvert (c'est-à-dire déconnectée), le tout en configuration à deux électrodes. En effet, la lumière AO-ECL émise est suffisamment brillante pour être facilement visualisée à l'œil nu. Les images sous illuminations IR sont capturées à travers un filtre de suppression IR au laboratoire ISCR.

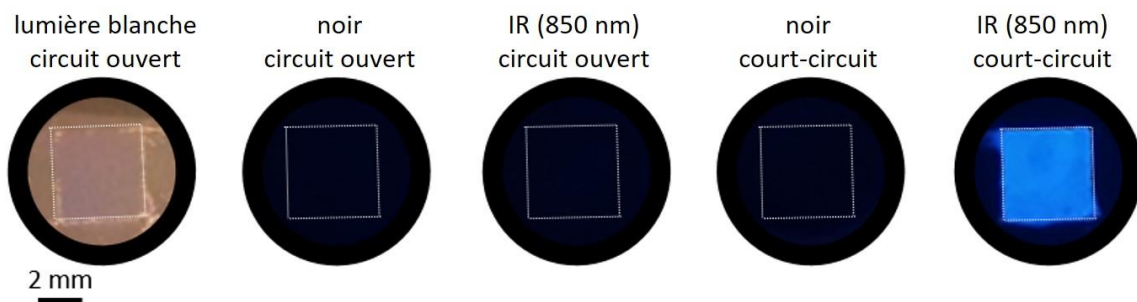


Figure 5.14 : Photographies montrant la photoanode Au/ pnn^{++} -Si dont la surface active est délimitée par un carré pointillé blanc) dans différentes conditions de connexion électrique avec la cathode Pt et d'éclairage (la lumière blanche est la lumière ambiante du laboratoire).^[21]

La **Figure 5.14** montre que dans l'obscurité et dans des conditions de circuit ouvert, aucune lumière n'est générée au niveau de l'Au/ pnn^{++} Si. Lorsque la jonction est illuminée par la LED IR à 850 nm, l'image est identique, montrant que l'IR n'active pas les pixels de la caméra. Lorsque le circuit est fermé,

l'image est similaire et aucune lumière n'est émise. À l'inverse, en court-circuit et sous éclairage IR, une lumière bleue est émise à la surface de la jonction Au/ pnn^{++} Si. L'ECL est donc bien tout optique.

V.1.4. Observation de l'AO-ECL monolithique

V.1.4.1. Capture d'images avec un téléphone portable

L'imagerie AO-ECL est ensuite étudiée avec la jonction complète Au/ pnn^{++} -Si/Pt. Pour cela, le dispositif doit être entièrement immergé dans l'électrolyte ECL pour que les réactions électrochimiques puissent avoir lieu sur les deux faces. De la même manière que les images de la **Figure 5.14**, l'émission de lumière bleue est capturée avec une caméra de téléphone portable. Toutes les images ont été prises au laboratoire ISCR.

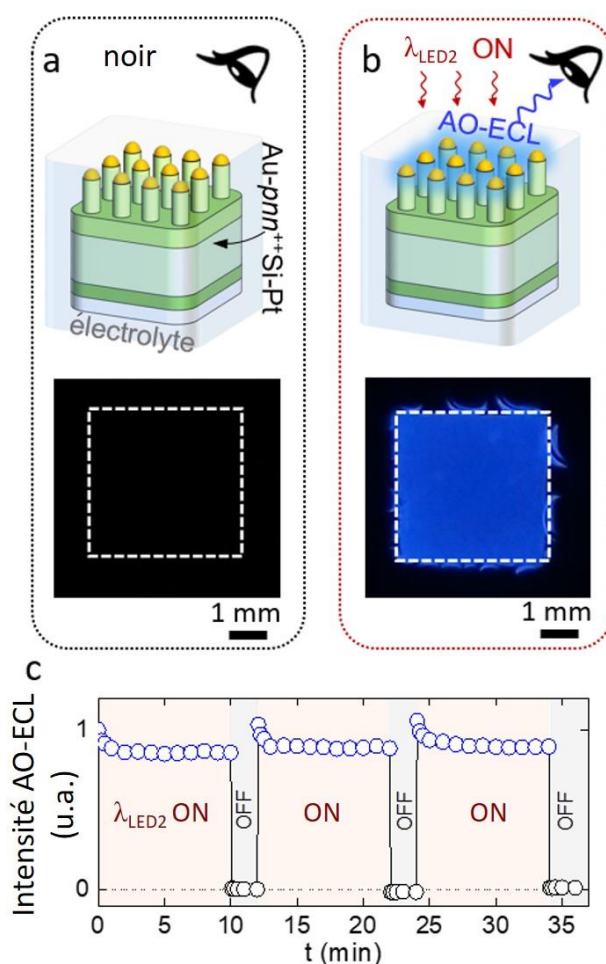


Figure 5.15 : Schémas (en haut) et photographies prise par un téléphone portable (en bas) montrant la jonction Au/ pnn^{++} -Si/Pt immergé dans l'électrolyte a) dans l'obscurité et b) sous un éclairage IR. c) Intensité AO-ECL émise à la face avant du dispositif Au/ pnn^{++} -Si/Pt en fonction du temps sous un éclairage IR intermittent ($\lambda_{LED2} = 850$ nm, $P_{LED} = 18$ mW cm^{-2}).^[21]

Comme schématisé sur les **Figure 5.15.a** et **Figure 5.15.b** et démontré par les photographies correspondantes, la lumière de couleur bleue n'est observable que lorsque la face anodique du

dispositif est excitée par la lumière incidente $\lambda_{LED2} = 850$ nm. De la même manière qu'en configuration à deux électrodes, le signal d'émission répond instantanément au stimulus IR et son intensité dépend de la puissance d'irradiation appliquée (**Figure 5.16** ci-dessous), bien que l'intensité semble moins linéaire par rapport à la P_{LED} ici. L'émission AO-ECL peut être visualisée pendant au moins 30 minutes sans diminution d'intensité, comme le montre la **Figure 5.15.c**.

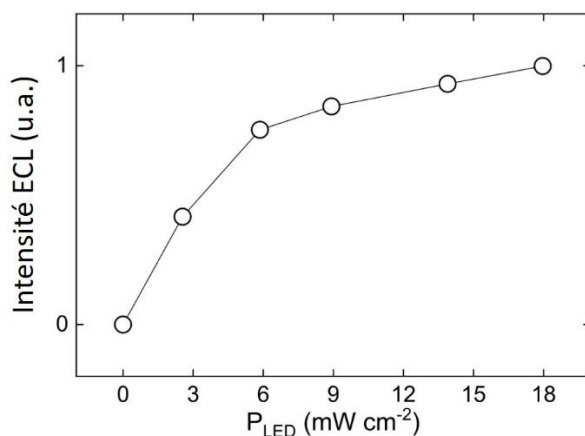


Figure 5.16 : Évolution de l'intensité de l'émission monolithique AO-ECL de la jonction Au/pnn⁺⁺-Si/Pt selon la puissance d'irradiation par la LED IR ($\lambda_{LED2} = 850$ nm).^[21]

Pour aller plus loin, un comportement similaire est observé avec cette fois-ci une excitation dans le visible avec $\lambda_{LED3} = 733$ et $\lambda_{LED4} = 633$ nm présenté dans la **Figure 5.17**. En d'autres termes, des longueurs d'onde d'éclairage allant du visible à l'IR peuvent générer une émission AO-ECL brillante. Les limites spectrales sont imposées par rapport à E_g de Si pour les grandes longueurs d'ondes et par rapport l'émission du système ECL sélectionné pour les plus faibles longueurs d'ondes afin de pouvoir distinguer λ_{LED} de λ_{AO-ECL} .

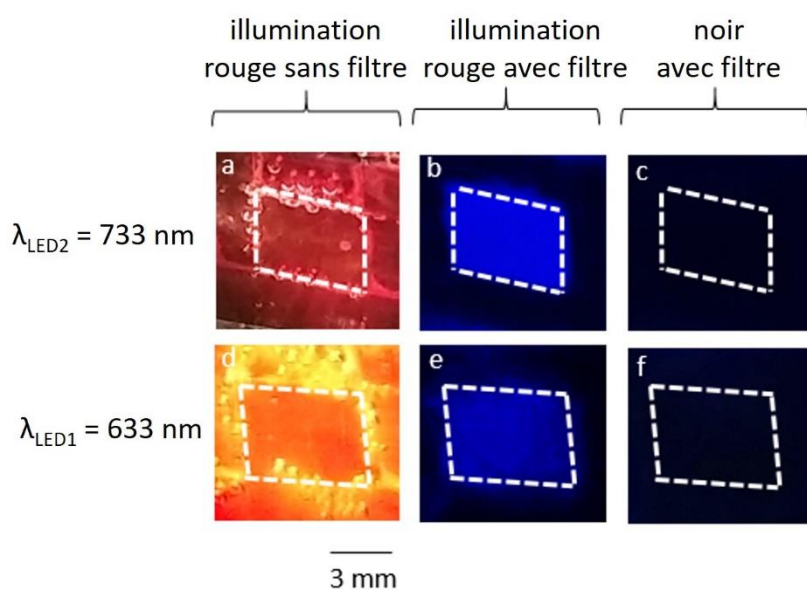


Figure 5.17 : Photographies de la surface active de la photoanode Au/pnn⁺⁺-Si/Pt immergée dans l'électrolyte ECL sous illumination visible a,b) à 733 nm et d,e) à 633 nm, ainsi que c,f) dans le noir. Les photographies a,d) sont prises sans filtre et les images b,c,e,f) sont capturées à travers un filtre passe-bande à 450 ± 10 nm.^[21]

V.1.4.2. Microscopie AO-ECL

Enfin, le phénomène est étudié au microscope afin de s'assurer que l'AO-ECL est bien localisé au niveau des nanodisques d'Au. Pour bien les distinguer spatialement, une jonction monolithique Au/ pnn^{++} -Si/Pt est réalisée avec une plus faible densité en nanopiliers, représentée par les captures en microscopie optique et au MEB dans la **Figure 5.18**. Ces images ont également été capturées à l'ISCR. Les nanopiliers sont visibles en microscopie à fond noir grâce à l'effet miroir de l'or qui reflète la lumière et permet de localiser chaque nanostructure par un point lumineux. Les nanodisques en Au sont mis en évidence sur le pilier en p -Si dans l'image MEB de la **Figure 5.18**.

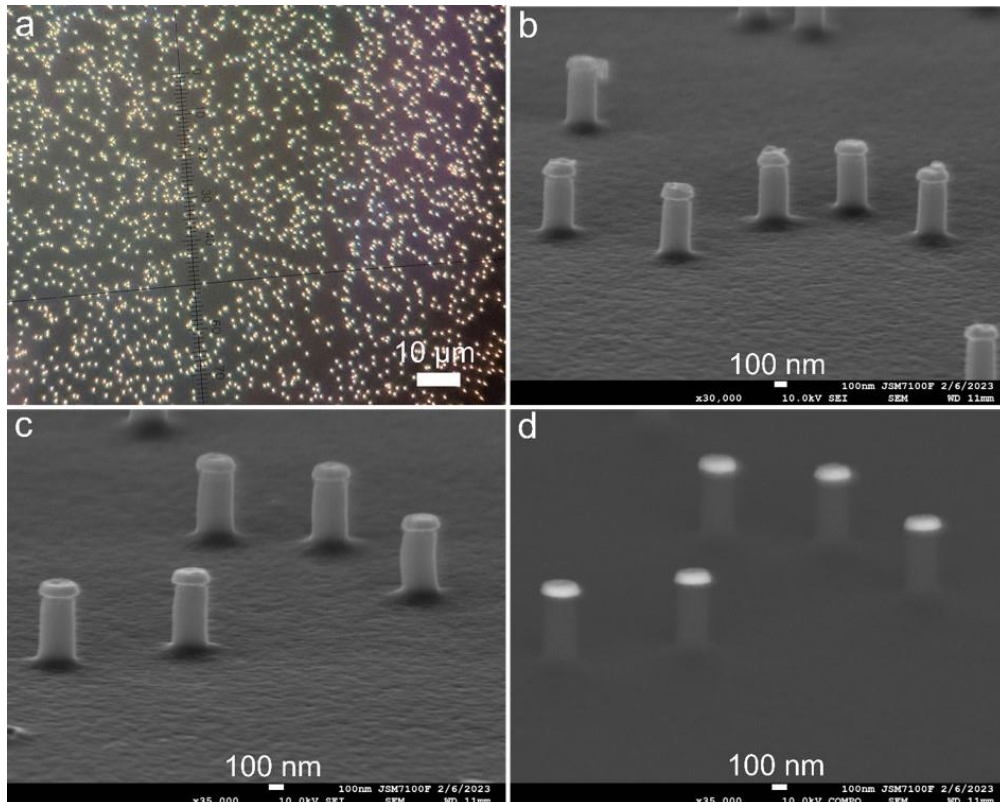


Figure 5.18 : a) Image en microscopie à fond noir de la face avant de la jonction Au/ pnn^{++} -Si/Pt. b, c) Images inclinées de la jonction Au/ pnn^{++} -Si/Pt par MEB d' e^{-} secondaires à faibles densités. d) Images inclinée de la jonction Au/ pnn^{++} -Si/Pt par MEB par e^{-} rétrodiffusés à faibles densités.^[21]

L'expérience de microscopie AO-ECL est ensuite réalisée sur un microscope à épi-fluorescence inversé au laboratoire ISM. Le dispositif monolithique est immergé dans l'électrolyte ECL et la face nanostructurée est orientée vers l'objectif. Cette face est illuminée de côté avec une inclinaison d'environ 45° par une LED IR à $\lambda_{LED1} = 1050$ nm. La présence d'un filtre passe-bas à > 750 nm (pour n'observer que la lumière dans le visible) étant insuffisante pour entièrement supprimer la lumière IR, il a fallu choisir une longueur d'onde IR plus élevée pour être moins détectée par la caméra du microscope tout en restant dans le spectre d'absorption du Si ($E_g = 1,12$ eV, la longueur d'onde maximale d'absorption est donc $\lambda_{abs} = 1107$ nm).^[30] En effet, le reflet de la lumière IR par les disques d'Au peut être facilement confondu avec l'émission AO-ECL, l'image à la caméra étant en noir et blanc.

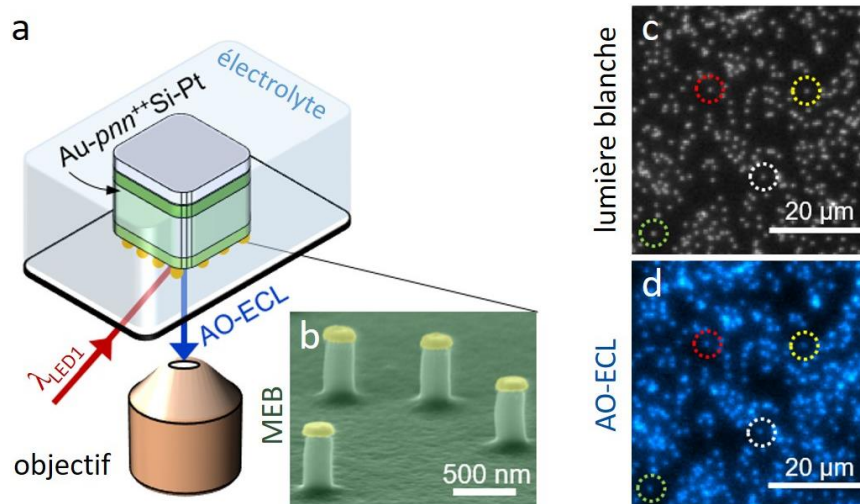


Figure 5.19 : a) Schéma du montage de l'imagerie AO-ECL au microscope. b) Image MEB colorée montrant la face avant de la jonction Au/pnn⁺-Si/Pt, structurée avec une faible densité de nanopiliers et observée par microscopie AO-ECL. (c et d) Images de microscopie optique de la face avant Au/pnn⁺-Si/Pt (faible densité de nano-piliers) capturée sous une lumière blanche (c) et IR ($\lambda_{LED1} = 1050 \text{ nm}$, $P_{LED} = 7 \text{ mW cm}^{-2}$) (d). Pour plus de clarté, quatre nano-disques individuels sont localisés par des cercles pointillés colorés. Composition de l'électrolyte : 10 mM de luminol, 33 mM de H₂O₂ (pH = 12,8) et 0,1 % Triton X-100 dans 0,1 M de KOH.^[21]

Les nanopiliers sont d'abord localisés sous un éclairage à la lumière blanche par réflexion de la lumière (**Figure 5.19.c**). Sous illumination IR (**Figure 5.19.d**), les points individuels émetteurs d'AO-ECL apparaissent et leurs positions corrélient avec l'image en lumière blanche. Pour s'assurer que le motif en lumière IR est identique à celui en lumière blanche, quatre nanopiliers p-Si/Au individuels choisis au hasard sont identifiés par des points circulaires sur la **Figure 5.19.c,d**. Le contraste entre les deux images sont similaires et mis en évidence par les profils d'intensité tracés le long de la ligne jaune dans la figure ci-dessous en lumière blanche (**Figure 5.20.a**) et en AO-ECL (**Figure 5.20.b**)

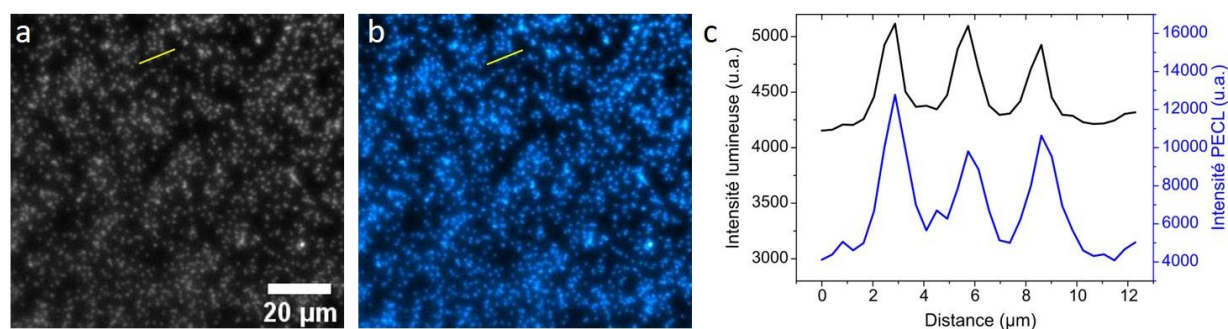


Figure 5.20 : a, b) Images de microscopie optique de la face avant de la jonction Au/pnn⁺-Si/Pt (faible densité de nanopiliers) capturée sous lumière blanche (a) et sous éclairage IR à $\lambda_{LED1} = 1050 \text{ nm}$ (b). La dimension de chaque image est de $104 \times 98 \mu\text{m}^2$. c) Comparaison des profil d'intensité entre la lumière blanche et les images AO-ECL, l'emplacement du profil est indiqué par une ligne jaune sur les images.^[21]

Cette expérience permet donc de visualiser directement le processus d'émission de lumière au niveau d'un seul nanopilier. De plus, cette approche d'imagerie démontre que le transfert de charge solide-liquide photogénéré se produit spécifiquement à la surface des nano-disques d'Au, permettant ainsi une visualisation directe de l'activité photoélectrochimique de la même manière que les motifs

d'Ir avec le système ECL $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$,^[8] ce qui est essentiel pour pouvoir optimiser les photoélectrodes catalytiques.^[31]

V.1.4.3. Expériences de contrôle de la microscopie monolithique AO-ECL

Des expériences de contrôle sont réalisées en microscopie pour d'assurer que la lumière détectée en AO-ECL ne soit pas simplement le reflet de la lumière IR. Pour cela, le dispositif $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}/\text{Pt}$ est immergé dans de l'eau pure au lieu de l'électrolyte ECL et les images de contrôle sont prises sous éclairage IR avec les mêmes paramètres de la caméra que pour les conditions en AO-ECL (**Figure 5.21**). Les images montrent une légère lumière de fond sous illumination IR dans l'eau (intensité moyenne = 1728 u.a.), mais reste négligeable par rapport aux images AO-ECL dans l'électrolyte ECL (5324 u.a.). Cette lumière de fond est proche de la limite de détection de la caméra dans le noir (1419 u.a.).

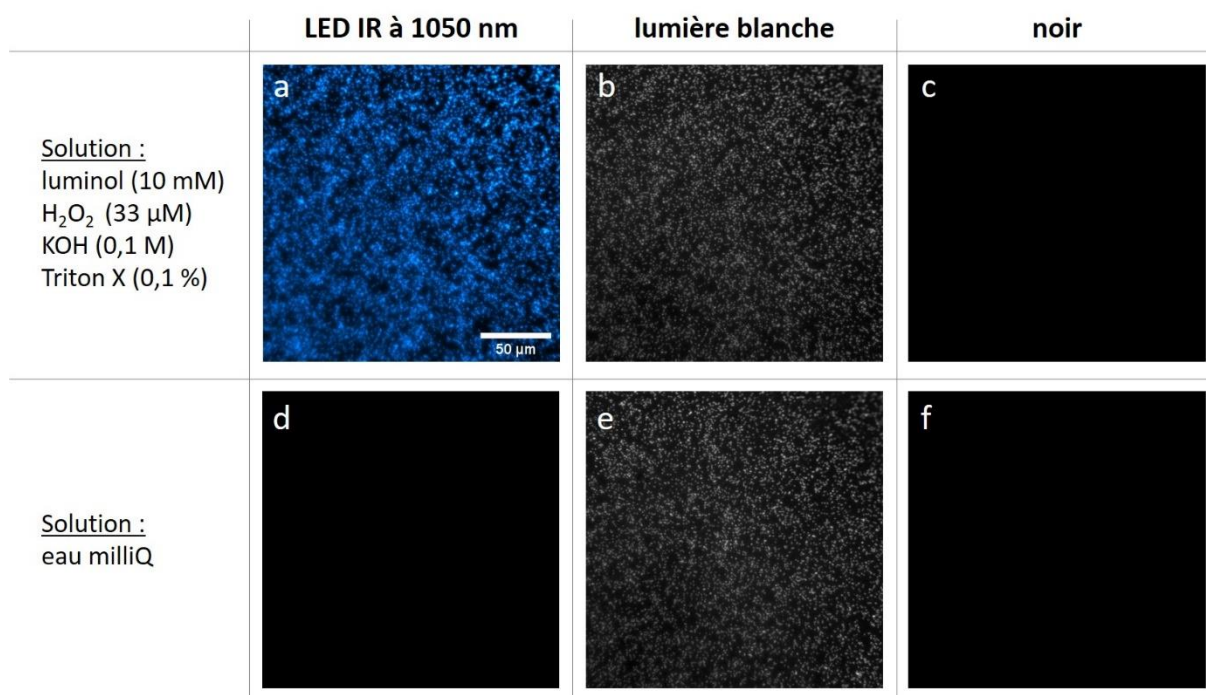


Figure 5.21 : Images en microscopie optique de la face avant de la jonction $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}/\text{Pt}$ (faible densité de nanopiliers) capturées sous lumière IR (a,d), sous éclairage IR (b,e) et dans le noir (c,f). Les images a,b,c sont prises en présence de l'électrolyte ECL et les images d,e,f sont capturées avec de l'eau. Les images c,d et f apparaissent en noir par absence de signal.^[21]

V.1.5. Conclusion sur l'AO-ECL

Les résultats obtenus mettent en évidence une nouvelle stratégie tout optique pour la génération d'émissions ECL sans aucune assistance électrique. Le dispositif monolithique permet de s'affranchir des contraintes retrouvées en électrochimie, notamment avec l'ajout d'électrodes supplémentaires dans l'électrolyte qui doivent être connectées par des fils. La capacité de produire de

l'ECL électriquement autonome et stable est devenue possible grâce à la structure Au/*pnn*⁺⁺-Si/Pt entièrement intégrée, comprenant une jonction photovoltaïque nanostructurée *pnn*⁺⁺-Si protégée par des revêtements conducteurs électroactifs en Au et en Pt aux deux interfaces. L'AO-ECL est initiée par l'absorption de la lumière (λ_{LED}) par la jonction semiconductrice *pn*-Si. Celle-ci déclenche alors une activité électrochimique, qui, à son tour, induit la génération de l'ECL du luminol ($\lambda_{AO-ECL} = 425 \text{ nm}$). Cette lumière bleue peut être produite avec des longueurs d'onde d'excitation allant du visible (633 nm) au proche IR (1050 nm). Enfin, les expériences de microscopie ont permis de corréliser les points d'émission avec l'architecture du dispositif, démontrant que le transfert de charge a spécifiquement lieu à l'interface entre les nanodisques d'au et le liquide.

Ce processus est remarquable à plusieurs égards. D'abord, il convertit directement la lumière d'excitation en une lumière d'émission par une conversion de type anti-Stokes sans précédent avec un décalage ultime de -625 nm. Ce processus rappelle les rares exemples de mécanismes de conversion anti-Stokes tels que l'absorption à deux photons ou l'annihilation de triplet-triplet de molécule, dont la stabilité et l'efficacité de conversion restent à améliorer.^[32]

D'un point de vue analytique, de la même manière que sur les jonctions Au/*pnn*⁺⁺-Si/Pt spécifiquement adaptées, cette stratégie basée sur l'ECL du luminol qui requiert un V_{OC} minimum d'environ 0,45 V pour une lumière intense, devrait également être efficace avec d'autres dispositifs photoélectrochimiques. Par exemple, elle peut jouer un rôle important dans l'élucidation des mécanismes de conversion d'énergie à l'échelle nanométrique de photoélectrodes nanostructurées,^[33-35] de photocatalyseurs à semi-conducteurs^[36,37] ou de feuilles artificielles.^[38,39] Enfin, en raison de sa nature tout optique, la simplicité et la polyvalence de l'approche pourrait être étendue au-delà de la photoélectrochimie. Compte tenu de l'importance des technologies ECL pour la biodétection et le diagnostic médical,^[1-3] ce phénomène présente un fort potentiel pour le développement d'une nouvelle génération de dispositifs portables pour la biodétection pour d'autres stratégies d'imagerie.

V.2. La PECL appliquée à la bio-imagerie

V.2.1. Introduction

L'étude décrite ici porte sur la combinaison de la microscopie PECL et de la bio-imagerie ECL. Comme il a été décrit dans le deuxième chapitre, l'imagerie ECL peut être catégorisée en deux approches complémentaires.^[6,40] L'ECL positive (ECL+) est la méthode la plus répandue en imagerie ECL avec l'observation d'un objet actif en CL, c'est-à-dire qui génère directement de l'ECL ou *via* un luminophore ECL, sur fond sombre. Ensuite, l'ECL négatif (ECL-) est une technique basée sur un objet non émissif empêchant la diffusion des réactifs ECL et créant ainsi une ombre dans l'arrière-plan lumineux.

Dans cette partie, il s'agit de visualiser par microscopie PECL les cellules CHO-K1 à l'aide du système ECL modèle $[Ru(bpy)_3]^{2+}/TPrA$. Alors que les cellules étaient cultivées sur des électrodes non photoactives en GC dans le chapitre 2, les électrodes impliquées ici sont les SC MIS à base d'Ir (*n*-Si/SiO_x/Ir). Il a été prouvé que cette structure fournissait la plus longue stabilité PECL reportée jusqu'à

aujourd'hui, avec une émission ECL brillante.^[8,41] De plus, la surface en Ir permet une croissance cellulaire comparable à celle d'un substrat en GC ou en verre. De la même manière que pour la microscopie en AO-ECL, la lumière d'excitation est sélectionnée à 1050 nm pour limiter le bruit de fond. Cette longueur d'onde élevée a l'avantage de pénétrer plus profondément dans le Si ($\alpha^{-1} \approx 0,6$ mm)^[42] et permet alors une conversion efficace de la lumière sur la face avant de la photoanode par illumination au dos de celle-ci, ce qui limite d'avantage la détection de l'IR par la caméra. Enfin, ce choix facilite la séparation entre la longueur d'onde d'excitation IR et celle d'émission ECL pour l'imagerie cellulaire avec un décalage de type anti-Stokes de -430 nm. Cet écart est crucial pour une application en bio-imagerie car la lumière d'excitation ne doit pas affecter le signal optique de sortie. En effet, dans dernière étude, la microscopie PECL est démontrée dans les modes d'imagerie positive (PECL+) et par ombre chinoise (PECL-) dans les **Figure 5.22.c** et **Figure 5.22.d** respectivement. La combinaison de la PECL avec la bio-imagerie ouvre de nouvelles voies pour la microscopie photoinduite et localisée d'entités biologiques uniques.

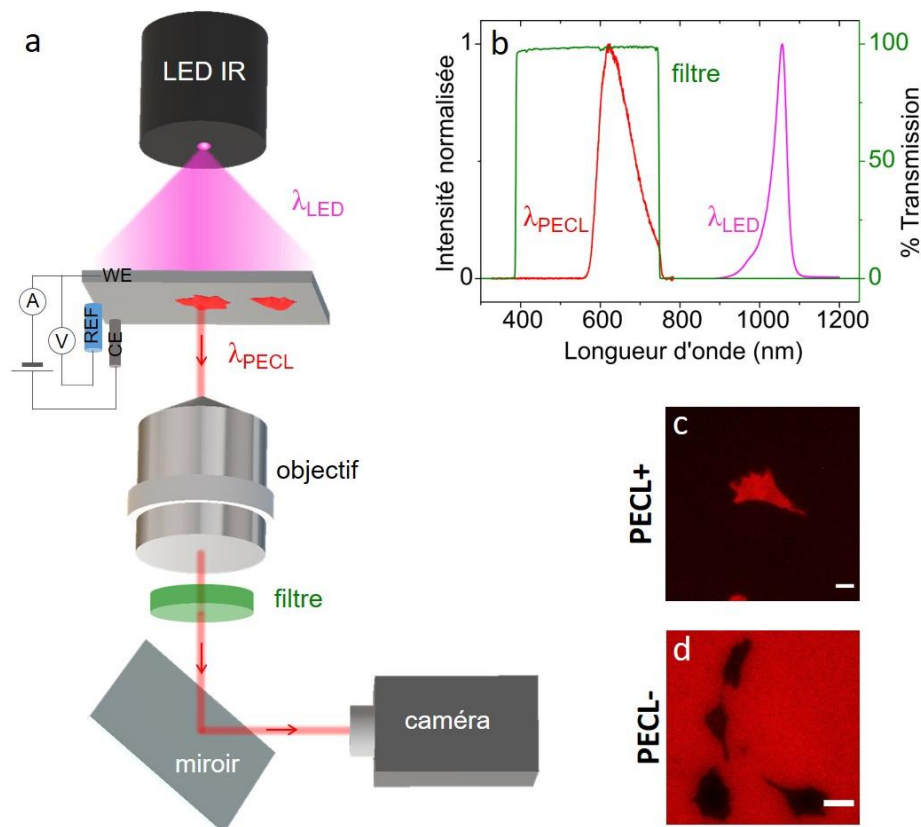


Figure 5.22 : a) Schéma du montage de la PECL sur un microscope à épi-fluorescence inversé utilisant une LED IR en illumination arrière. b) Spectres de la LED IR à 1050 nm (courbe violette), de l'émission PECL (courbe rouge) et de la transmission du filtre (courbe verte). c, d) Image en microscopie c) PECL+ et d) PECL-. Barre d'échelle : 20 μm .^[43]

V.2.2. Compatibilité de la PECL avec la microscopie de cellules uniques

V.2.2.1. Étude de la photoélectrochimie

Pour commencer, une étude sur les propriétés électrochimiques et ECL est réalisée sur la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ afin de vérifier que la lumière qui sera détectée en microscopie sera bien due à un transfert de h^+ photogénérés. Les comportements électrochimiques et ECL de l'électrode sont étudiés par CV. Ces mesures sont comparées à celles réalisées sur une anode $p^+\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ non photoactive, donc active dans l'obscurité comme pour l'ECL classique (**Figure 5.23**). Les expériences sont réalisées dans une solution de PBS (0,65 M, pH 7,4) contenant $30\ \mu\text{M}$ de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et $0,1\ \text{M}$ de TPrA.

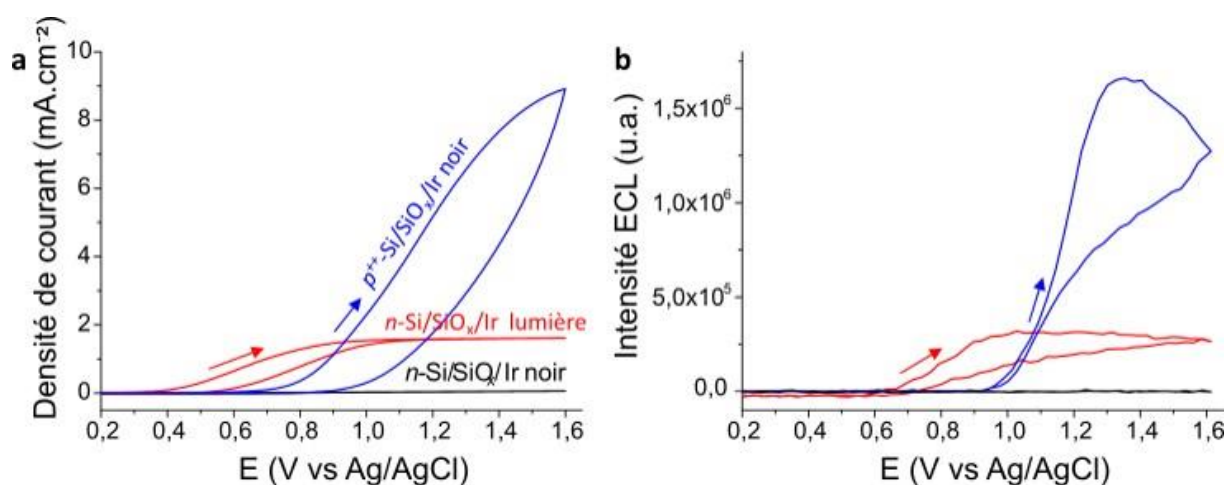


Figure 5.23 : a) CVs et b) signaux ECL correspondants d'une photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ dans l'obscurité (courbe noire) ou sous un éclairage IR à $1050\ \text{nm}$ (courbe rouge) par rapport à une anode $p^+\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ dans l'obscurité (courbe bleue) dans une solution PBS (pH 7,4) contenant $30\ \mu\text{M}$ de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et $0,1\ \text{M}$ de TPrA. Vitesse de balayage : $50\ \text{mV s}^{-1}$.^[43]

Comme attendu, aucun courant ni signal ECL n'ont été détectés pour le $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ dans l'obscurité. En revanche, sous un éclairage à $1050\ \text{nm}$, l'électrode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ produit un photocourant, ce qui signifie que les réactions électrochimiques sont exclusivement induites par des charges photogénérées. Il est intéressant de noter que les réactions d'oxydation sur $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ démarrent à $0,4\ \text{V}$ alors que l'ECL n'est émise qu'à un potentiel supérieur à $0,65\ \text{V}$. La TPrA est d'abord oxydée à $0,4\ \text{V}$ mais l'émission d'ECL ne se produit qu'avec l'oxydation concomitante du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, comme le montre la précédente étude de la PECL avec ces électrodes.^[8] Un comportement similaire est observé en ECL avec l'électrode $p^+\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ à des potentiels plus élevés. Dans ce cas, la densité de courant et l'intensité ECL sont plus élevées que dans la configuration PECL car, dans cette configuration, elles dépendent de la densité du photon incident et de l'efficacité de photoconversion du Si à la longueur d'onde $\lambda_{\text{LED}} = 1050\ \text{nm}$. Les plateaux observés à la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ indiquent que, dans ces conditions, la réaction est limitée par la densité de photons absorbés. À l'inverse, l'électrode $p^+\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ ne présente pas de plateau comme on le voit sur la courbe $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ car les réactions ne sont pas limitées par la lumière incidente mais par la diffusion des réactifs. En effet, lorsque les maximums en densité de courant et en intensité ECL sont atteints, ceux-ci diminuent en suivant l'équation de Cottrell. La photoactivité de l'électrode dopée n est confirmée par le potentiel d'apparition de la génération d'ECL qui est décalé de $-296\ \text{mV}$ par rapport à l'électrode dopée p^+ . Cela

montre que des potentiels supérieurs à 0,7 V sont suffisants pour générer une émission PECL. De ce fait, les cellules sont imagées en microscopie PECL à un potentiel sélectionné à 0,8V.

V.2.2.2. Préparation de l'électrode et montage PECL

Les photoanodes $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ sont ensuite testées pour observer au microscope des cellules CHO-K1 en utilisant les modes PECL+ et PECL-. Les images obtenues en PECL sont comparées aux images de PL et d'ECL enregistrées avec leurs anodes $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ correspondantes mais non photoactives. Pour cela, les cellules CHO-K1 sont d'abord cultivées sur des photoanodes $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ et $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$. La croissance cellulaire sur le film mince d'Ir pulvérisé est comparable à celle d'une électrode de carbone vitreux ou d'un substrat de verre, en bon accord avec les résultats précédemment rapportés.^[44]

D'après les mesures en photoélectrochimie de la **Figure 5.23**, un stimulus d'excitation à $\lambda_{\text{LED}} = 1050 \text{ nm}$ déclenche l'émission PECL du système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ ($\lambda_{\text{PECL}} = 620 \text{ nm}$) sur la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ lorsqu'une surtension est appliquée. Le décalage de type anti-Stokes entre ces deux longueurs d'onde étant de -430 nm , il est suffisamment grand pour discriminer le signal PECL de la lumière incidente IR, qui ne sera pas transmise par le filtre (**Figure 5.22.b**). Par conséquent, cet écart permet de réaliser de l'imagerie de cellules en microscopie à partir de l'émission PECL du système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$. De plus, il a été démontré que les électrodes de structure $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ étaient adaptées pour des applications en imagerie PECL avec le couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ car elles permettent la génération d'une émission PECL brillante et stable pendant au moins 35 heures à un pH physiologique.^[8]

V.2.3. Bio-imagerie en PECL+

V.2.3.1. Préparation des cellules

Pour la première série d'expériences d'imagerie, le mode PECL+ schématisé dans la **Figure 5.24** est testé avec des cellules marquées par le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ modifié avec à la streptavidine (SA@Ru).^[45] La streptavidine est une protéine purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii* et qui est très utilisée en biologie moléculaire et en bionanotechnologie. Elle est caractérisée par une affinité élevée pour la biotine en créant une liaison non covalente très forte. Pour pouvoir marquer les cellules à la SA@Ru , les cellules cultivées sur l'électrodes sont d'abord incubées avec de la biotine X qui réagit avec les groupes aminés primaires des protéines.^[46] Ensuite, les membranes cellulaires sont marquées avec l'émetteur ECL après incubation avec la SA@Ru . En plus du marquage, les cellules sont fixées à la surface de l'électrode puis perméabilisées avec du Triton X-100. Cette étape permettra à la TPrA de diffuser à travers les membranes et d'initier les étapes électrochimiques, non pas seulement en périphérie cellulaire, mais sur l'ensemble de la cellule. Avec cette procédure, la cellule entière deviendra visible par ECL.^[47]

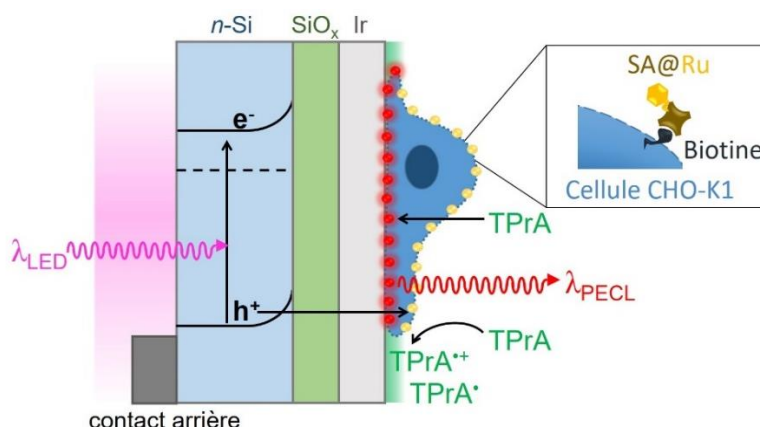


Figure 5.24 : Imagerie directe par PECL+ de la membrane cellulaire marquée avec le luminophore $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ modifié à la streptavidine (SA@Ru) dans une solution de TPrA dans du PBS.^[43]

V.2.3.2. Microscopie PECL+

La microscopie PECL+ est réalisée dans une solution tampon ProCell commerciale et qui contient 0,18 M de TPrA pour permettre la génération de l'ECL au niveau des marqueurs SA@Ru sur la cellule (**Figure 5.24**). Les images en microscopie (colorées en vert, **Figures 5.25.a,d**) correspondent à la PL du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ et mettent ainsi en évidence la localisation du marqueur SA@Ru. Bien que la même longueur d'onde (soit 620 nm) soit émise par le SA@Ru en modes PL, ECL ou PECL, les intensités d'émission des images en PL sont codées en vert pour les différencier des images obtenues par ECL qui sont colorées en rouge.

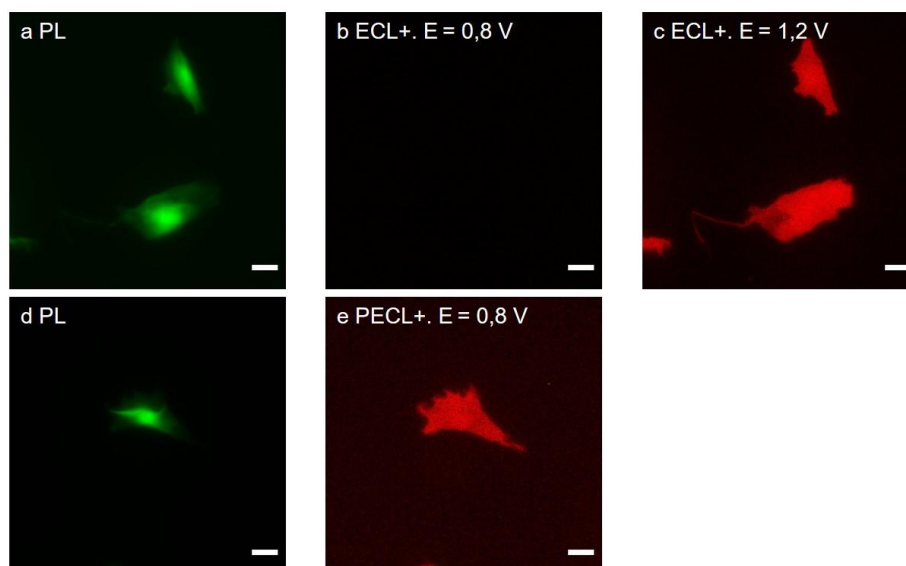


Figure 5.25 : a, d) Microscopie de la PL (couleur verte) de cellules CHO-K1 marquées avec SA@Ru. b,c) Images ECL+ et e) PECL+ (couleur rouge) des cellules marquées correspondantes enregistrées dans une solution ProCell sous illumination IR ($\lambda_{LED} = 1050 \text{ nm}$) à un potentiel appliqué à b) 0,8 V et c) 1,2 V sur une anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ et à e) 0,8 V sur une photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$. Les cellules ont été cultivées sur les surfaces Ir, fixées, perméabilisées avec du Triton X-100 puis marquées avec de la SA@Ru. Le vert et le rouge sont des fausses couleurs codant l'intensité de la luminescence. Barre d'échelle : 20 μm .^[43]

La cellule entière est visible par PL, ce qui indique que le marqueur est bien fixé à la membrane sur tout le volume de la cellule. Les images au milieu (**Figure 5.25.b,e**) sont les images ECL+ et PECL+ enregistrées à 0,8 V. À ce potentiel, les cellules ne sont pas visibles par ECL+ classique car la TPrA et la SA@Ru ne sont pas oxydés sur l'électrode p^{++} -Si/SiO_x/Ir comme observé en photoélectrochimie à la **Figure 5.23**. Les cellules marquées n'apparaissent par ECL+ qu'à des potentiels plus anodiques, généralement autour de 1,2 V (**Figure 5.25.c**).

En mode PECL+, la cellule est entièrement visible sur l'électrode n -Si/SiO_x/Ir à 0,8 V illuminée au dos par de l'IR (**Figure 5.25.e**). D'une part, cela met en évidence un avantage important de l'approche PECL+ car elle montre que des potentiels plus faibles sont nécessaires par rapport aux expériences ECL classiques. Il est en revanche nécessaire d'éclairer les échantillons biologiques. Cela ne pose pas de problème dans les conditions rapportées puisque les cellules ont été fixées, mais les effets potentiels de phototoxicité devraient être pris en compte dans les futurs travaux sur l'imagerie PECL, même si la longueur d'onde d'éclairage se situe dans le proche IR.

Pour examiner les contrastes des images en PL, ECL+ et PECL+, les profils d'intensité sont extraits le long des axes jaunes représentés dans **Figure 5.26**. Les profils d'intensité de luminescence tracés en vert pour PL (**Figure 5.26.c**) et PECL+ (**Figure 5.26.f**) confirment que le contraste est marqué entre les modes ECL et PECL+ pour ces conditions. Comme observé précédemment sur des électrodes de carbone vitreux en mode ECL classique, la **Figure 5.26.f** montre que l'extension spatiale de la membrane cellulaire est significativement plus grande par PECL+ par rapport à la PL. Il confirme les caractéristiques de surface confinée de la microscopie PECL+, qui dépendent des concentrations des deux réactifs ECL et de leur réactivité respective.^[48-50] Cette fine couche émettrice de quelques micromètres améliore le contraste par rapport aux images en PL. Enfin, cet ensemble d'expériences de microscopie prouve également la possibilité de capturer des images en PECL+ de cellule par illumination au dos d'une structure MIS.

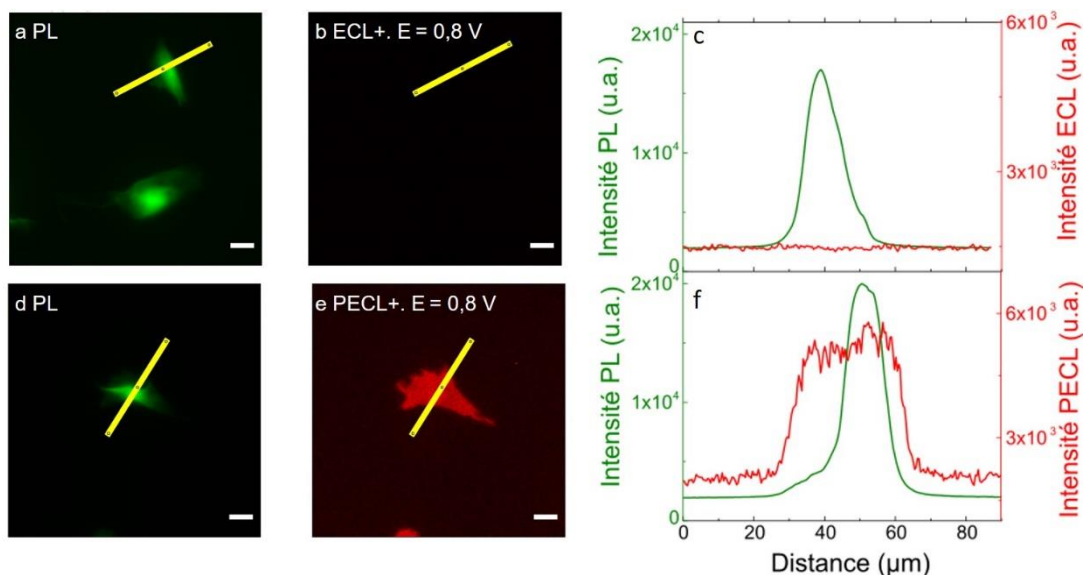


Figure 5.26 : Images a, b) PL, c) ECL+ et d) PECL+ de cellules CHO-K1 marquées avec la SA@Ru sous un potentiel appliqué à 0,8 V dans une solution ProCell. Les profils d'intensité de luminescence ont été extraits le long de la ligne jaune. Les ROI sont identiques à la Figure 5.25. Barre d'échelle : 20 μm. c,f) Comparaison des profils d'intensité de luminescence des cellules en PL, c) ECL+ et en f) PECL+.^[43]

V.2.3.3. Expériences de contrôle

Les expériences de contrôle de l'électrode de type *n* de la **Figure 5.27** ci-dessous, enregistrées dans le noir à 0,8 V et sous illumination IR en OCP, n'ont montré aucune image PECL+. Les cellules restent invisibles dans ces conditions expérimentales. Cela démontre que les images PECL+ correspondent à des h^+ photogénérés qui oxydent la TPrA. Ce co-réactif réagit par la suite avec le marqueur SA@Ru, générant son état excité puis l'émission ECL par retour à son état fondamental. Ces expériences montrent qu'il n'y a pas d'émission PECL sans l'effet synergique d'un éclairage incident IR et sans l'imposition d'un potentiel de 0,8 V, ce qui signifie que les deux stimuli sont nécessaires pour produire des images PECL+.

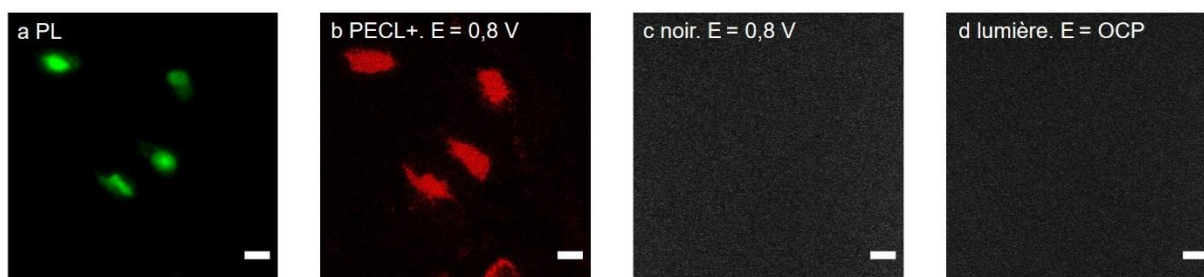


Figure 5.27 : Images de microscopie de cellules CHO-K1 marquées avec SA@Ru en a) PL et b) en PECL+ à 0,8 V dans une solution ProCell sur une électrode *n*-Si/SiO_x/Ir illuminée par une LED IR. Expériences de contrôle montrant les images enregistrées c) dans l'obscurité à 0,8 V et d) sous lumière IR en OCP. Barre d'échelle = 20 μ m.^[43]

V.2.4. Bio-imagerie en PECL-

V.2.4.1. Préparation des cellules

Dans un second temps, pour compléter cette étude PECL, le deuxième mode d'imagerie ECL est testé en PECL, c'est-à-dire l'imagerie « shadow PECL » (PECL-) des cellules sur la photoanode *n*-Si/SiO_x/Ir (**Figure 5.28**). Comme expliqué dans le deuxième chapitre, le mode SECL ou ECL- est une méthode d'imagerie sans marquage dans laquelle les réactifs ECL, c'est-à-dire le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et la TPrA, ne sont pas liés de manière covalente à la cellule et sont dissous dans une solution. Cette technique permet d'imager la morphologie des objets étudiés et les propriétés de transport des réactifs ECL à travers.^[47,51-53] Pour rappel, l'objet gêne localement la diffusion du luminophore et/ou du co-réactif et inhibe ainsi partiellement ou totalement l'étape électrochimique initiale et, donc, la génération éventuelle d'ECL. Par conséquent, l'objet est visible par un contraste optique négatif : il apparaît sombre sur un fond luminescent clair car une intensité ECL plus forte est produite au niveau de l'électrode nue. Ici, les cellules sont marquées avec le colorant calcéine-AM pour simplifier le processus d'imagerie puisqu'elle permet de les voir d'abord par PL. Cette étape est également un moyen de pouvoir comparer ensuite les images PL et PECL-. De plus, la calcéine ($\lambda_{\text{abs}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$) n'interfère pas avec les réactions électrochimiques impliquées dans l'ECL ni avec l'excitation IR et les longueurs d'onde de l'ECL. Les cellules fixées et marquées à la calcéine ont été immergées dans la solution PBS contenant du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et du TPrA diffusant librement (**Figure 5.28**).

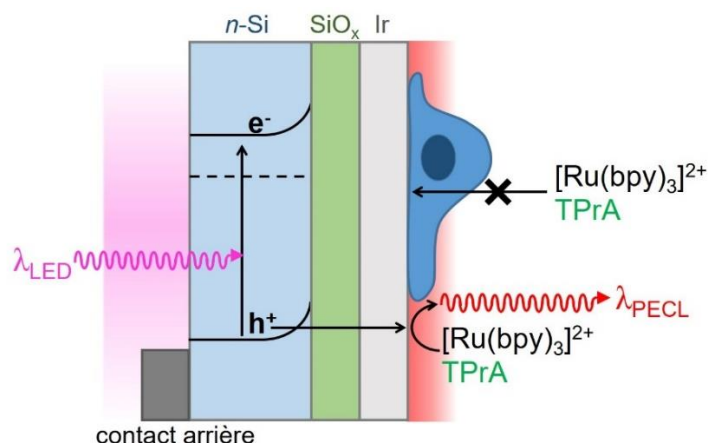


Figure 5.28 : Imagerie sans marquage de cellules par PECL- avec des cellules immergées dans une solution de PBS contenant à la fois le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et la TPrA.^[43]

V.2.4.2. Microscopie PECL-

Les formes des cellules à imager sont d'abord définies par la PL du marqueur calcéine dans la **Figure 5.29.a,d**. Les images représentées sur les **Figure 5.29.b** et **Figure 5.29.e** correspondent respectivement aux signaux ECL et PECL. Là encore, aucune lumière ECL n'a été émise à 0,8 V, ce qui indique que le potentiel était trop faible pour permettre la génération d'ECL au niveau de l'anode de type p^{++} . En revanche, la PECL se produit à 0,8 V sur une électrode $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ illuminée à l'arrière et révèle les cellules dans un contraste négatif (ou ombre). La morphologie des cellules devient visible à 1,2 V dans le cas de l'ECL classique (**Figure 5.29.c**). Cette expérience met une fois de plus en évidence l'intérêt de l'approche PECL qui nécessite un potentiel plus faible.

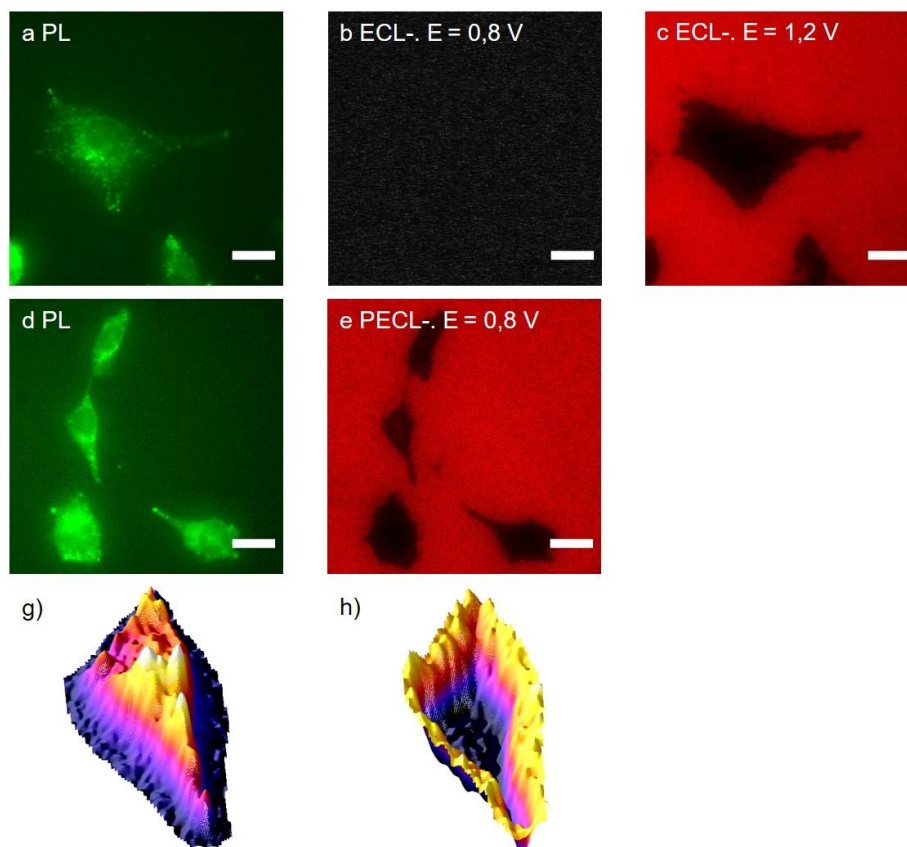


Figure 5.29 : a, d) Microscopie de la PL (couleur verte) de cellules CHO-K1 marquées à la calcéine-AM. b,c) Images ECL- et e) PECL- (couleur rouge) des cellules marquées correspondantes enregistrées dans du PBS avec $30 \mu\text{M}$ de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et $0,1 \text{ M}$ de TPrA sous illumination IR ($\lambda_{\text{LED}} = 1050 \text{ nm}$) à un potentiel appliqué à b) $0,8 \text{ V}$ et c) $1,2 \text{ V}$ sur une anode $p^+-\text{Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ et à e) $0,8 \text{ V}$ sur une photoanode $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$. g,h) Images 3D de la même cellule en modes g) PL et h) PECL-. Les cellules ont été cultivées sur les surfaces Ir, marquées à la calcéine-AM puis fixées. Le vert et le rouge sont des fausses couleurs codant l'intensité de la luminescence. Barre d'échelle : $20 \mu\text{m}$.^[43]

Les profils d'intensité des cellules ont été extraits des images PL, ECL- (**Figure 5.30.c**) et PECL- (**Figure 5.30**). Il n'y a aucun signal en ECL alors qu'une diminution locale d'intensité est observée en configuration PECL. La superposition des profils en PL et PECL- marque une corrélation entre les informations PL positives et PECL négatives. Elle est d'autant plus soulignée sur les images 3D de la **Figure 5.29** qui démontrent que l'image 3D d'une cellule unique obtenue en PL a la même forme que l'image de la même cellule en PECL-, mais inversée.

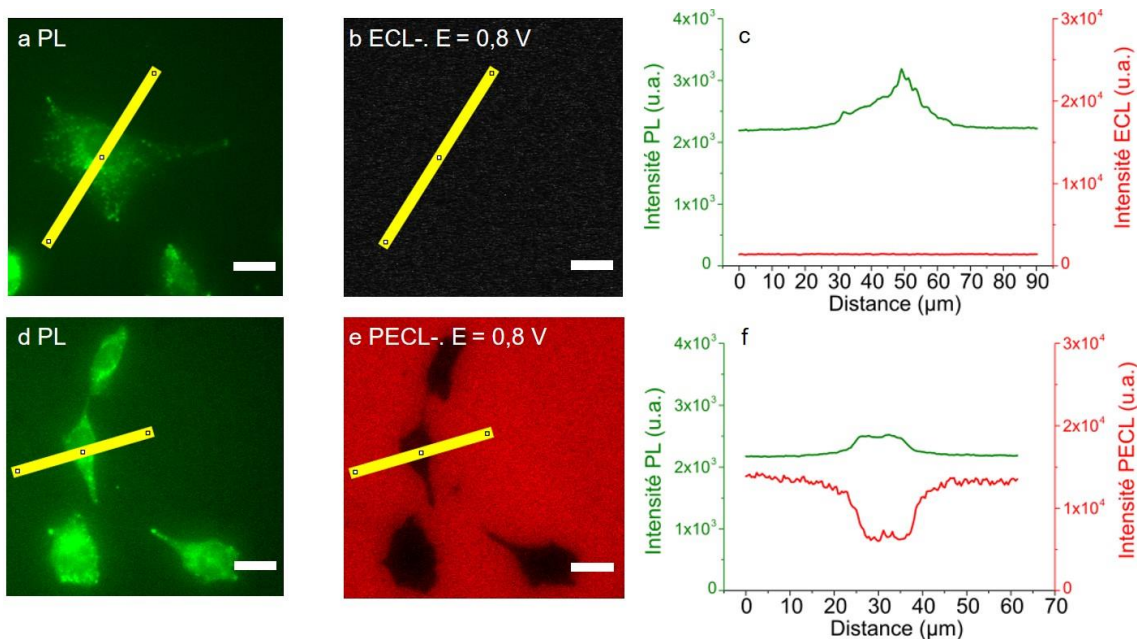


Figure 5.30 : Images a, b) PL, c) ECL- et d) PECL- de cellules CHO-K1 marquées avec la calcéine-AM sous un potentiel appliqué à 0,8 V dans du PBS contenant 30 μM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPrA. Les profils d'intensité de luminescence ont été extraits le long de la ligne jaune. Les ROI sont identiques à la Figure 5.29. Barre d'échelle : 20 μm . c, f) Comparaison des profils d'intensité de luminescence des cellules en PL, c) ECL- et en f) PECL-.^[43]

V.2.4.3. Expériences de contrôle

Comme dans le mode PECL-, les expériences de contrôle de l'électrode de type *n* sans illumination IR à 0,8 V et avec illumination IR en OCP n'ont montré aucun signal PECL dans ces conditions (**Figure 5.31**). Il n'y a pas non plus de signal généré par une éventuelle réflexion de l'IR sur le substrat, l'IR n'interfère donc pas avec le signal PECL observé.

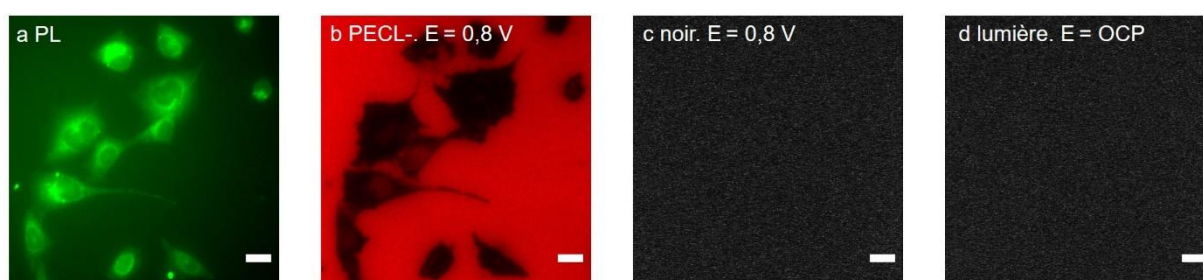


Figure 5.31 : Images de microscopie de cellules CHO-K1 marquées à la calcéine-AM en a) PL et b) en PECL+ à 0,8 V dans du PBS contenant 30 μM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPrA sur une électrode *n*-Si/SiO₂/Ir illuminée par une LED IR. Expériences de contrôle montrant les images enregistrées c) dans l'obscurité à 0,8 V et d) sous lumière IR en OCP. Barre d'échelle = 20 μm .^[43]

V.2.5. Comparaison avec la microscopie ECL

Les images obtenues par PECL sont ensuite comparées à celles visibles par ECL. Les électrodes étant différentes dans les deux cas, les cellules observées ne peuvent donc pas être les mêmes. L'approche se base alors sur la superposition des profils d'intensité en imagerie positive de la **Figure 5.32.c** et de l'imagerie négative à la **Figure 5.32.f**.

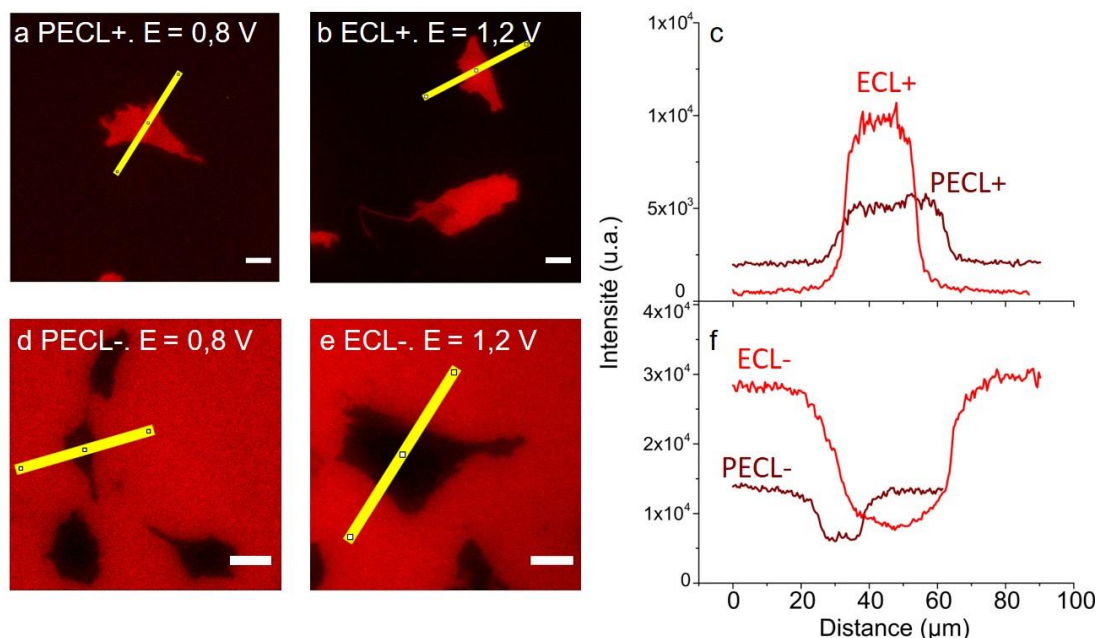


Figure 5.32 : Images a) PECL+ et b) ECL+ de cellules CHO-K1 marquées avec la SA@Ru dans un solution Procell et c) profils d'intensité correspondant extraits le long de la ligne jaune. Images d) PECL- et e) ECL- de cellules CHO-K1 marquées à la calcéine-AM dans du PBS contenant 30 μM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPrA et f) profils d'intensité correspondant extraits le long de la ligne jaune. Les ROI sont identiques à la Figure 5.25 pour le mode positif et à la Figure 5.29 pour le mode négatif. Barre d'échelle : 20 μm .

Dans les deux configurations, l'émission de lumière est plus faible en PECL à 0,8 V qu'en ECL à 1,2 V, avec les mêmes aux écarts de densité de courant et d'intensité lumineuse observés en photoélectrochimie à la **Figure 5.23**. Les mesures indiquaient une différence de -76 % de j et de -86 % en intensité lumineuse dans le cas de la PECL à 0,8 V par rapport à l'ECL à 1,2 V. Comme discuté précédemment, cette différence d'intensité s'explique par une limitation de la densité de photons absorbés car le courant PECL atteignait un plateau mais pas le courant ECL. En microscopie PECL, l'intensité lumineuse en PECL a une plus faible diminution par rapport à l'imagerie ECL avec -38 % en mode positif et -54 % en mode négatif. La lumière IR pourrait être responsable de l'augmentation du bruit de fond (+84 %) en imagerie PECL+ mais elle n'est pas détectée en imagerie PECL-. Cela pourrait être expliqué par un blocage de la lumière IR par les cellules. Ces constatations et hypothèses sont à confirmer avec un échantillonnage plus grand d'images ECL et PECL, complété par une analyse des spectres des signaux détectés au niveau de la cellule et sur l'électrode.

Malgré cette baisse d'intensité lumineuse, l'image PECL en mode négatif et positif garde un contraste élevé et présente des pistes d'amélioration pour augmenter le photocourant, telles que le montage PECL (puissance de la LED, distance entre la LED et l'électrode) ou le rendement de la photoconversion. De plus, étant donné que l'intensité de l'ECL diminue lors de l'enregistrement

successif d'images ECL de cellules ou d'autres entités dans une solution TPrA, en raison d'un courant d'oxydation TPrA progressivement inférieur,^[54] la possibilité d'un photo-adressage local de différentes régions de l'électrode par PECL peut constituer une approche efficace et très bénéfique pour éviter cet inconvénient général en microscopie ECL.

V.2.6. Conclusion sur la bio-imagerie PECL

Les études présentées dans ce chapitre décrivent l'application de la PECL à la microscopie de cellules uniques avec le système ECL anodique $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$, qui génère une émission visible à 620 nm sous une lumière incidente invisible à 1050 nm en illuminant le dos de l'électrode. Cela correspond à un décalage de type anti-Stokes de -430 nm qui permet une séparation facile des deux longueurs d'onde et rend ainsi l'approche adaptée aux applications de microscopie.

La stratégie est basée sur les électrodes MIS, $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$, qui offrent une stabilité élevée et une émission PECL brillante. Les cellules CHO-K1 ont été cultivées sur la surface Ir de la photoanode et ont été imagées par PECL en exploitant les charges photogénérées. La microscopie PECL a été démontrée à un potentiel remarquablement faible de 0,8 V, où les cellules ne peuvent pas être visualisées dans l'ECL classique avec une anode de type p^{++} non photoactive. Une PECL positive (PECL+) des cellules a pu être réalisée en premier en marquant la membrane plasmique avec le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Ensuite, la morphologie cellulaire a pu être imagée par une autre PECL sans marquage (PECL-) en immergeant l'électrode $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ dans l'électrolyte contenant le luminophore en diffusion libre et le co-réactif.

Le contrôle local de l'imagerie avec la lumière incidente IR présente un fort potentiel dans le domaine de la microscopie compte tenu de la grande profondeur de pénétration de ces longueurs d'onde dans les échantillons biologiques. Enfin, la microscopie PECL ajoute une nouvelle dimension à l'imagerie biologique ECL en apportant une possibilité de photo-adressage local de l'électrode et d'un contrôle de l'ECL par la lumière.

V.3. Conclusion du chapitre

Ce chapitre a permis de mettre en évidence que la PECL sur photoanode à base de Si est adaptée à la bio-imagerie ECL. Les PECL observés avec les systèmes ECL modèles $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ et luminol/ H_2O_2 ont des longueurs d'ondes éloignées de la lumière IR à 1050 nm avec un décalage allant respectivement de -430 nm à -625 nm. Cet important écart permet une bonne séparation spectrale entre l'émission IR et le signal PECL. L'illumination à des longueurs d'ondes éloignées du visible et peu détectées par la caméra est permise par le faible E_g du Si. La conversion de type anti-Stokes présentée ici implique une illumination de l'électrode par des longueurs d'ondes de faibles énergies potentiellement moins délétères que les longueurs à hautes énergies appliquées pour la PL. Il est d'ailleurs possible de générer la PECL en illuminant le dos de l'électrode, protégeant d'avantage le substrat de l'excitation lumineuse.

L'étude rapportée dans ce chapitre a également prouvé que la PECL apporte de nombreux avantages dans le domaine de la microscopie. Le signal ECL qui est dépendant d'une stimulation lumineuse peut laisser imaginer tout type de contrôle avec la lumière, qu'il soit temporel en variant la fréquence de l'onde lumineuse ou bien spatial avec le photo-adressage local de l'électrode. De plus, le V_{oc} généré par l'illumination du SC abaisse la surtension nécessaire pour déclencher la réaction ECL. L'ingénierie de la structure de l'électrode permet même d'atteindre l'autonomie électrique de l'électrode avec l'AO-ECL. Cet ECL généré sans fil rend possible l'analyse et l'imagerie ECL portable et est accessible aux non spécialistes par sa simplicité de mise en œuvre. L'AO-ECL ouvre également la voie à la miniaturisation des photoélectrodes et à la capacité de réaliser localement l'analyse ECL sur une entité biologique par exemple.

Références

- [1] Z. Liu, W. Qi, G. Xu, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3117–3142.
- [2] H. Yang, J. K. Leland, D. Yost, R. J. Massey, *Nat. Biotechnol.* **1994**, *12*, 193–194.
- [3] A. Zanut, A. Fiorani, S. Canola, T. Saito, N. Ziebart, S. Rapino, S. Rebecconi, A. Barbon, T. Irie, H.-P. Josel, F. Negri, M. Marcaccio, M. Windfuhr, K. Imai, G. Valenti, F. Paolucci, *Nat Commun* **2020**, *11*, 2668.
- [4] X. Ma, W. Gao, F. Du, F. Yuan, J. Yu, Y. Guan, N. Sojic, G. Xu, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 2936–2945.
- [5] J. Dong, Y. Lu, Y. Xu, F. Chen, J. Yang, Y. Chen, J. Feng, *Nature* **2021**, *596*, 244–249.
- [6] J. Zhang, S. Arbault, N. Sojic, D. Jiang, *Annual Rev. Anal. Chem.* **2019**, *12*, 275–295.
- [7] S. Rebecconi, A. Zanut, C. I. Santo, G. Valenti, F. Paolucci, *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 336–348.
- [8] Y. Zhao, J. Descamps, S. Ababou-Girard, J.-F. Bergamini, L. Santinacci, Y. Léger, N. Sojic, G. Loget, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202201865.
- [9] Y. Zhao, J. Yu, G. Xu, N. Sojic, G. Loget, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13013–13016.
- [10] Y. B. Vogel, N. Darwish, S. Ciampi, *Cell Rep. Phys. Sci.* **2020**, *1*, 100107.
- [11] A. Fujishima, K. Honda, *Nature* **1972**, *238*, 37–38.
- [12] M. S. Prévot, K. Sivula, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 17879–17893.
- [13] O. Khaselev, J. A. Turner, *Science* **1998**, *280*, 425–427.
- [14] K. Sun, R. Liu, Y. Chen, E. Verlage, N. S. Lewis, C. Xiang, *Advanced Energy Materials* **2016**, *6*, 1600379.
- [15] K. Sivula, R. van de Krol, *Nature Reviews Materials* **2016**, *1*, 15010.
- [16] Y. Wang, J. Schwartz, J. Gim, R. Hovden, Z. Mi, *ACS Energy Lett.* **2019**, *4*, 1541–1548.
- [17] H.-C. Fu, P. Varadhan, C.-H. Lin, J.-H. He, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3930.
- [18] P. Zhou, I. A. Navid, Y. Ma, Y. Xiao, P. Wang, Z. Ye, B. Zhou, K. Sun, Z. Mi, *Nature* **2023**, *613*, 66–70.
- [19] J. W. Ager, M. R. Shaner, K. A. Walczak, I. D. Sharp, S. Ardo, *Energy Environ. Sci.* **2015**, *8*, 2811–2824.
- [20] N. S. Lewis, D. G. Nocera, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 15729–15735.
- [21] Y. Zhao, J. Descamps, N. Al Hoda Al Bast, M. Duque, J. Esteve, B. Sepulveda, G. Loget, N. Sojic, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, jacs.3c05856.
- [22] Y. Liu, W. Shen, Q. Li, J. Shu, L. Gao, M. Ma, W. Wang, H. Cui, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1003.
- [23] L. R. Faulkner, H. Tachikawa, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 691–699.
- [24] J.-W. Xue, C.-H. Xu, W. Zhao, H.-Y. Chen, J.-J. Xu, *Nano Lett.* **2023**, *23*, 4572–4578.
- [25] I. Katsounaros, K. J. J. Mayrhofer, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6660.
- [26] G. Loget, C. Mériadec, V. Dorcet, B. Fabre, A. Vacher, S. Fryars, S. Ababou-Girard, *Nat Commun* **2019**, *10*, 3522.
- [27] J. C. Hill, A. T. Landers, J. A. Switzer, *Nature Mater* **2015**, *14*, 1150–1155.
- [28] M. J. Kenney, M. Gong, Y. Li, J. Z. Wu, J. Feng, M. Lanza, H. Dai, *Science* **2013**, *342*, 836–840.
- [29] L. Bouffier, D. Zigah, C. Adam, M. Sentic, Z. Fattah, D. Manojlovic, A. Kuhn, N. Sojic, *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 95–98.
- [30] K. Sun, S. Shen, Y. Liang, P. E. Burrows, S. S. Mao, D. Wang, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8662–8719.
- [31] J. B. Sambur, T.-Y. Chen, E. Choudhary, G. Chen, E. J. Nissen, E. M. Thomas, N. Zou, P. Chen, *Nature* **2016**, *530*, 77–80.
- [32] X. Zhu, Q. Su, W. Feng, F. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1025–1039.

- [33] B. Fabre, G. Loget, *Acc. Mater. Res.* **2023**, *4*, 133–142.
- [34] F. A. L. Laskowski, S. Z. Oener, M. R. Nellist, A. M. Gordon, D. C. Bain, J. L. Fehrs, S. W. Boettcher, *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 69–76.
- [35] C. Liu, J. Tang, H. M. Chen, B. Liu, P. Yang, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2989–2992.
- [36] T. Takata, J. Jiang, Y. Sakata, M. Nakabayashi, N. Shibata, V. Nandal, K. Seki, T. Hisatomi, K. Domen, *Nature* **2020**, *581*, 411–414.
- [37] T. S. Teitworth, D. J. Hill, S. R. Litvin, E. T. Ritchie, J.-S. Park, J. P. Custer, A. D. Taggart, S. R. Bottum, S. E. Morley, S. Kim, J. R. McBride, J. M. Atkin, J. F. Cahoon, *Nature* **2023**, *614*, 270–274.
- [38] D. G. Nocera, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 767–776.
- [39] S. Y. Reece, J. A. Hamel, K. Sung, T. D. Jarvi, A. J. Esswein, J. J. H. Pijpers, D. G. Nocera, *Science* **2011**, *334*, 645–648.
- [40] A. Zanut, A. Fiorani, S. Rebecani, S. Kesarkar, G. Valenti, *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411*, 4375–4382.
- [41] J. Descamps, Y. Zhao, J. Le-Pouliquen, B. Goudeau, P. Garrigue, Y. Léger, G. Loget, N. Sojic, *Chem. Commun.* **2023**, *59*, 12262–12265.
- [42] M. Saritaş, H. D. McKell, *Journal of Applied Physics* **1987**, *61*, 4923–4925.
- [43] J. Descamps, Y. Zhao, B. Goudeau, D. Manojlovic, G. Loget, N. Sojic, *Chem. Sci.* **2023**, DOI 0.1039/D3SC05983A.
- [44] K. Göbbels, T. Kuenzel, A. Van Ooyen, W. Baumgartner, U. Schnakenberg, P. Bräunig, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1055–1067.
- [45] G. Valenti, S. Scarabino, B. Goudeau, A. Lesch, M. Jović, E. Villani, M. Sentic, S. Rapino, S. Arbault, F. Paolucci, N. Sojic, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16830–16837.
- [46] M. Howarth, A. Y. Ting, *Nature Protocols* **2008**, *3*, 534–545.
- [47] S. Voci, B. Goudeau, G. Valenti, A. Lesch, M. Jović, S. Rapino, F. Paolucci, S. Arbault, N. Sojic, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14753–14760.
- [48] W. Miao, J.-P. Choi, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14478–14485.
- [49] W. Guo, P. Zhou, L. Sun, H. Ding, B. Su, *Angew Chem Int Ed* **2021**, *60*, 2089–2093.
- [50] Y. Wang, W. Guo, Q. Yang, B. Su, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1222–1226.
- [51] E. Kerr, S. Knezevic, P. S. Francis, C. F. Hogan, G. Valenti, F. Paolucci, F. Kanoufi, N. Sojic, *ACS Sens.* **2023**, acssensors.2c02697.
- [52] C. Ma, S. Wu, Y. Zhou, H. Wei, J. Zhang, Z. Chen, J. Zhu, Y. Lin, W. Zhu, *Angew Chem Int Ed* **2021**, *60*, 4907–4914.
- [53] X. Hu, S. Yu, C. Wang, X. Zhang, J. Pan, H. Ju, *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 4496–4502.
- [54] D. Han, B. Goudeau, D. Jiang, D. Fang, N. Sojic, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 1652–1657.

Section expérimentale

Section expérimentale

1. Chapitre II : ECL appliquée à l'imagerie biologique

1.1. Réactifs

La TPrA, le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, l'acide sulfurique, le phosphate de sodium dibasique heptahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), le H_2O_2 (30 %), l'acide sulfurique (H_2SO_4), le phosphate de sodium monobasique monohydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), le paraformaldéhyde (PFA) et le marqueur calcéine-AM sont commercialisés par Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le marqueur MitoTracker Deep Red est fourni par ThermoFischer Scientific. Le PBS à 0,65 M est obtenu en mélangeant 0,55 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 0,1 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau ultra pure (Milli-Q). Après ajout de la TPrA, le pH de la solution PBS est abaissé à 7,4 en complétant par de l'acide sulfurique concentré. Le PBS 1× et la trypsine sont fournis par Gibco. Les cellules CHO-K1 proviennent du Public Health England (HPA) Culture Collections et sont commercialisées par Sigma (85051005). Le milieu de culture est un milieu de Dulbecco modifié par Iscove (« Iscove's modified Dulbecco's medium » ou IMDM) complété avec 10% de sérum bovin foetal et 100 U/mL pénicilline/ streptomycine et il est utilisé pour la culture cellulaire qui a lieu dans un incubateur (37°C, 5 % CO_2).

1.2. Appareillage

La chambre ECL a été développée au sein de notre laboratoire ISM et est conçue pour un montage à 3 électrodes sur le microscope (**Figure 6.1**). La WE est en GC, la CE est un fil de platine, et la REF est une électrode Ag/AgCl/KCl 3M. Les expériences ECL sont réalisées à l'aide d'un potentiostat PalmSens4. Les images en PL et ECL sont capturées à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence inversé (Leica DMI8) et d'une caméra EMCCD (9100-13) de chez Hamamatsu. Les images ECL et PL sont observées à travers un objectif à grossissement 63× (Leica HCX PL APO, immersion à eau).

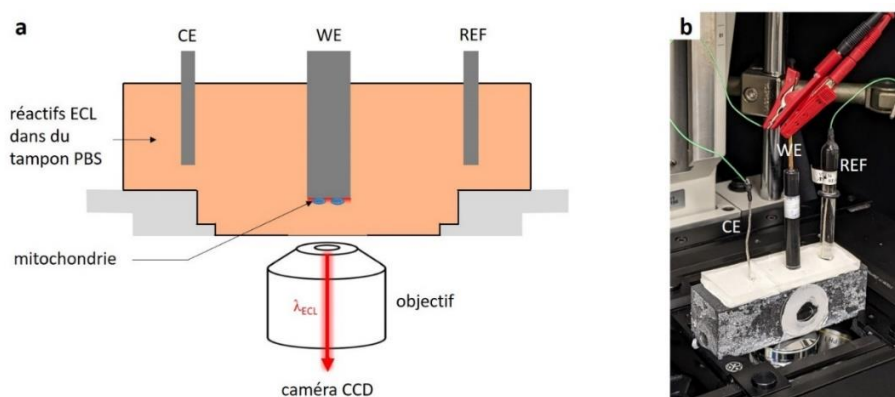


Figure 6.1 : a) Schéma du montage utilisé pour la microscopie ECL avec une cellule conçue pour 3 électrodes. b) Photographie de la cellule électrochimique placée sur le microscope inversé à épi-fluorescence avec les 3 électrodes connectées au potentiostat.

1.3. Application de l'ECL- pour l'observation des mitochondries

1.3.1. Préparation des mitochondries et test de leur activité respiratoire

Les mitochondries sont extraites des levures *Saccharomyces cerevisiae* et préparées au laboratoire CBMN. La procédure est la suivante : les levures sont mises en culture en aérobie à 28 °C dans un milieu à pH 5,5 contenant 0,175 % de base azotée pour levures (Difco), 0,2 % d'hydrolysat de caséine (Merck), 0,5 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % de KH_2PO_4 , 2 % de lactate (w/v) (Prolabo) en tant que source de carbone, 20 mg/L de L-tryptophane, 40 mg/L d'hydrochlorure d'adénine et 20 mg/mL d'uracile. Les cellules sont prélevées en phase de croissance exponentielle, puis les mitochondries sont isolées des protoplastes suivant la procédure proposée par B. Guérin, P. Labbe et M. Somlo en 1979.^[1] La concentration en protéine mitochondriale est mesurée par la méthode de Biuret en utilisant du sérum bovin l'albumine comme référence. En parallèle des travaux de microscopie, un test de respiration est réalisé dans une chambre d'oxygraphie : les mitochondries sont directement injectées dans la chambre à 28 °C remplie avec un tampon (0,63 M de mannitol déionisé, 0,36 mM d'EGTA, 10 mM de tris-maléate et 5 mM de tris-phosphate, à pH 6,8), suivi d'une injection d'éthanol (concentration finale à 1 % v/v) et d'adénosine phosphate (5 mM de solution dans le tampon).

1.3.2. Déposition des mitochondries à la surface de l'électrode en GC

Les mesures en PL et en ECL sont effectuées dans du PBS contenant 30 μM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPrA. Les mitochondries sont d'abord incubées pendant 15 minutes dans une solution de PBS avec 400 nM de marqueur MitoTracker Deep Red et 0,1 M de TPrA. Les électrodes en GC sont nettoyées à l'aide d'un traitement par plasma d'oxygène (Harrick Plasma) pendant 10 minutes avant utilisation. Une goutte de 20 μL de la solution contenant les mitochondries dans le PBS avec 0,1 M de TPrA est déposée à la surface de l'électrode en GC. L'électrode est ensuite laissée de côté pendant 15 minutes pour laisser les mitochondries s'y déposer. Après rinçage, l'électrode est enfin introduite dans la cellule électrochimique contenant la solution tampon avec les réactifs ECL. Les expériences sont conduites à une température de 25 °C directement sur la platine du microscope.

1.3.3. Imagerie des mitochondries par microscopie

1.3.3.1. PL

Les images par fluorescence sont toutes capturées avec la caméra en mode CCD avec un $t_{\text{expo}} = 5$ s. Pour imager la fluorescence du marqueur Mitotracker Deep Red, le cube dichroïque est composé d'un filtre d'excitation à $\lambda_{\text{abs}} = 620 \pm 30$ nm, un filtre barrière à $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 35$ nm et d'un miroir dichroïque à $\lambda_{\text{DM}} = 660$ nm. Pour l'autofluorescence du NADH, le cube est composé d'un filtre d'excitation à $\lambda_{\text{abs}} = 350 \pm 25$ nm, un filtre barrière à $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 25$ nm et d'un miroir dichroïque à $\lambda_{\text{DM}} = 400$ nm.

Les images sont traitées et analysées par le logiciel ImageJ-Fiji qui est libre d'accès. Elles sont ajustées en contraste et luminosité pour mieux visualiser les points (mitochondries), et l'effet de flou lié à l'éclairage du microscope est réduit. Pour cela, un filtre de type gaussien est appliqué (Process/Filters/Gaussian Blur ; factor = 20) et l'image modifiée est soustraite de l'image originale (Image/Process/Image Calculator/Subtract). Ensuite, un filtre médian est ajouté pour enlever le bruit résultant de cette soustraction (Image/Process/Filters/Median ; factor = 1,0) et augmenter le SNR. Cette procédure ne modifie pas la taille des objets car elle consiste à appliquer dans un premier temps un seuillage à chaque image afin de détecter les particules (noir en ECL-, et lumière en PL) en éliminant les faux positifs, et à utiliser dans un deuxième temps la fonction d'analyse de particules d'ImageJ-Fiji (Analyze/Analyse particles). Pour mieux distinguer les images, elles sont colorées par différents filtres : en vert pour la PL du Mitotracker Deep Red (Lookup table/Green color) et en bleu pour la PL du NADH (Lookup table/ Blue color).

1.3.3.2. ECL

Les images ECL sont capturées avec la caméra en mode CCD avec un $t_{\text{expo}} = 0,2$ s dans les cas où la concentration en luminophore est supérieure ou égale à $1 \mu\text{M}$. Lorsque cette concentration est inférieure à $1 \mu\text{M}$, la caméra est utilisée en mode EMCCD (gain = 1 ; sensibilité du gain = 220) avec un $t_{\text{expo}} = 20$ s. Les images ECL sont prises sans filtre et avec l'application d'un potentiel de 1,45 V à l'électrode de GC.

Comme en PL, les images sont traitées et analysées par le logiciel ImageJ-Fiji. Elles sont également ajustées en contraste et luminosité.

1.4. Microscopie sensible par ECL- de cellules CHO-K1

1.4.1. Préparation des cellules sur l'électrode en GC

Les électrodes en GC sont polies puis traitées par une solution Piranha (solution concentrée aux volumes 3/1 v/v en $\text{H}_2\text{SO}_4/30\% \text{H}_2\text{O}_2$) pendant 1 minute. *Attention : la solution concentrée en $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ aqueux (Piranha) est très dangereuse et doit être manipulée avec précautions.* Les cellules CHO-K1 sont ensuite déposées sur les électrodes et incubées pendant 48 h (37°C , 5 % CO_2) dans le milieu de culture pour permettre la croissance cellulaire. Par la suite, les cellules sont marquées à la calcéine-AM (à $1 \mu\text{M}$ dans le milieu de culture) pendant 15 minutes dans l'incubateur, puis elles sont fixées à la surface de l'électrode dans du PBS 1× contenant 4 % de PFA pendant 10 minutes. L'électrode est enfin introduite dans la chambre ECL contenant la solution PBS avec les réactifs ECL. Les expériences de microscopie sont réalisées à température ambiante (environ 22°C).

1.4.2. Imagerie des cellules CHO-K1 par microscopie

1.4.2.1. PL

Les images par fluorescence sont capturées avec la caméra en mode CCD avec un temps d'exposition de 5 s. Pour imager la fluorescence de la calcéine-AM, le cube dichroïque est composé d'un filtre d'excitation à $\lambda_{\text{abs}} = 480 \pm 20$ nm, un filtre barrière à $\lambda_{\text{em}} = 527 \pm 15$ nm et d'un miroir dichroïque à $\lambda_{\text{DM}} = 505$ nm. Les images sont par la suite ajustées en contraste et luminosité (Adjust/Brightness/Contrast) et colorées par un filtre vert (Lookup table/Green color).

1.4.2.2. ECL

Les images ECL sont capturées avec la caméra en mode EMCCD (gain = 1 ; sensibilité du gain = 220) avec un t_{expo} variable : il est de 20 s pour des concentrations en luminophore inférieures à 1 μM et il est 2 s pour des concentrations supérieures ou égales à 1 mM. Les images ECL sont prises sans filtre et avec l'application d'un potentiel de 1,45 V sur l'électrode en GC.

1.4.2.3. Calculs SSIM

L'indice et la carte SSIM sont calculés à partir du logiciel ImageJ-Fiji. La procédure est la suivante : un filtre moyen (2 pixels) est appliqué aux images ECL et PL (Filter/Mean) pour obtenir le seuillage le plus juste par rapport à la forme de la cellule. Une fois que le seuillage en PL et ECL sont ajustés aux contours de la cellule (Adjust/Threshold), les images sont comparées deux à deux par SSIM en utilisant le module d'extension « SSIM Index » créé par G. P. Renieblas en 2008.^[2]

2. Chapitre III : Développement de systèmes PECL anodiques et cathodiques stables

2.1. Réactifs

L'acétone (Erbatron de chez Carlo Erba) et l'éthanol anhydre (RSE electronic grade, Erbatron de chez Carlo Erba) ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le H_2SO_4 a été fournis par BASF. Le H_2O_2 (30 %), le luminol, le $[Ru(bpy)_3]PF_6$, le $[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$, la TPrA, le $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, le $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, le BPO, le TBAFP₆ et l'ACN (99,8 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le PBS à 0,1 M est obtenu en mélangeant 0,085 M de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ et 0,015 M de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ dans de l'eau ultra pure (Milli-Q). Pour l'électrolyte contenant de la TPrA dans du PBS, le pH est abaissé à 7,4 en ajoutant de l'acide sulfurique concentré.

2.2. Préparation des surfaces

Les surfaces sont préparées au laboratoire ISCR. Toutes les pinces et les échantillons utilisés pour nettoyer le silicium furent préalablement décontaminés dans une solution Piranha pendant 30 minutes à 105 °C. *Attention : la solution concentrée en H_2SO_4/H_2O_2 aqueux (Piranha) est très dangereuse, en particulier avec les matériaux organiques, et doit être manipulée avec précautions.* La plaquette de silicium de type p^{++} (résistance de 0,001-0,005 Ω cm, Si dopé au bore, polie sur une seule face, 490-510 μ m d'épaisseur) (100), de type p (résistance de 1-5 Ω cm, Si dopé au bore, polie sur les deux faces, 225-275 μ m d'épaisseur) (100), de type n (résistance de 0,3-0,7 Ω cm, Si dopé au phosphore, polie sur une seule face, 475-525 μ m d'épaisseur) (100) et de type n^+ (résistance de 0,01-0,05 Ω cm, Si dopé au phosphore, polie sur une seule face, 240-260 μ m d'épaisseur) (100) sont commercialisées par University Wafers. Les plaquettes de Si sont découpées en plusieurs surfaces ($1,2 \times 1,2$ cm²) pour fabriquer les électrodes. Les surfaces sont ensuite dégraissées par ultrason dans de l'acétone, de l'éthanol et de l'eau ultra pure pendant 10 minutes respectivement. Les surfaces en Si sont ensuite décontaminées et oxydées dans une solution Piranha à 105 °C pendant 30 minutes pour former chimiquement une couche de SiO_x de 1,5 nm d'épaisseur, suivi d'un rinçage abondant par de l'eau ultrapure et d'un séchage sous flux d'Ar.

2.3. Fabrication des électrodes

Les électrodes sont fabriquées au laboratoire ISCR.

2.3.1. Photocathode p -Si et cathode n^+ -Si

Le contact ohmique est créé au dos de l'électrode en grattant la surface avec un couteau à diamant. La zone grattée est ensuite recouverte par une goutte de InGa eutectique (Sigma Aldrich, 99,99 %) puis mise en contact avec un morceau de ruban adhésif en Cu (Advanced Tapes AT526). Le contact eutectique et une partie de la bande de Cu sont recouverts par une fine couche de pâte d'Ag (Electron Microscopy Sciences). Après séchage de la pâte d'Ag, le contact Ohmique est protégé par du scotch Kapton. La zone d'activité de la surface dans la cellule électrochimique est de 0,5 cm² et est

définie par la taille du joint torique (voir **Figure 6.3**). Enfin, les électrodes sont hydrogénées avant l'expérience électrochimique en les plongeant dans une solution à 10 % de HF pendant 1 minute.

2.3.2. Photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{M}$ et anode $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{M}$ ($\text{M} = \text{Pt, Ir et Ru}$)

Une fine couche métallique M (quelques nm) est déposée sur les surfaces propres $n\text{-Si/SiO}_x$ ou $p^{++}\text{-Si/SiO}_x$ par pulvérisation avec l'appareil Leica EM ACE600 coating system (pureté cible du Pt : 99,99%, Leica ; pureté cible de l'Ir : 99,95 %, Neyco ; pureté cible du Ru : 99,9 %, Neyco). L'épaisseur du film déposé est contrôlée *in-situ* par une QCM et mesurée *ex-situ* par un microscope à AFM. Les surfaces sont imagées par MEB et leurs compositions analysées par XPS.

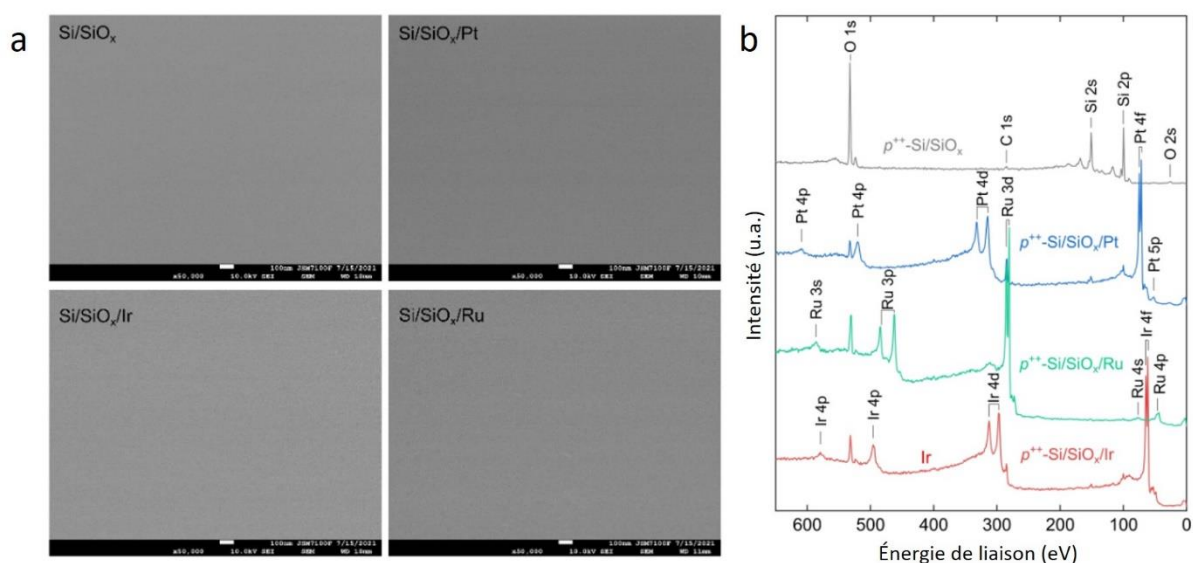


Figure 6.2 : a) Images MEB des surfaces (face en contact avec l'électrolyte) $p^{++}\text{-Si/SiO}_x$, $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Pt}$, $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ et $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ru}$. Barre d'échelle : 100 nm. b) Spectres XPS de la surface $p^{++}\text{-Si/SiO}_x$ avant déposition (gris) et des surfaces $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{M}$ avec $\text{M} = \text{Pt}$ (bleu), $\text{M} = \text{Ru}$ (vert) et $\text{M} = \text{Ir}$ (rouge).

Les images MEB ci-dessus sont capturées sur un JSM 7100F (JEOL). Les analyses XPS sont réalisées avec une source de rayon X Mg Kalpha ($h\nu = 1254,6 \text{ eV}$) à l'aide d'un spectromètre à photoélectron VSW HA100 et d'un analyseur à photoélectron hémisphérique, à une énergie de 20 eV. La résolution expérimentale est de 1,0 eV. C 1s est fixé à 284,8 eV et utilisé en tant qu'énergie de référence pour toutes les mesures. Les images AFM sont capturées sur un microscope NT-MDT Ntegra en mode semi-contact avec une pointe FM (APPNANO, SPM Probe Model : FORTA-50, fréquence de résonance : 43-81 kHz). Les images sont ensuite traitées et analysées avec le logiciel Gwyddion qui est libre d'accès.

Le contact ohmique est ensuite créé au dos de l'électrode en grattant la surface avec un couteau à diamant. La zone grattée est ensuite recouverte par une goutte de InGa eutectique (Sigma Aldrich, 99,99 %) puis mise en contact avec un morceau de ruban adhésif en Cu (Advanced Tapes AT526). Le contact eutectique et une partie de la bande de Cu sont recouverts par une fine couche de pâte d'Ag (Electron Microscopy Sciences). Après séchage de la pâte d'Ag, le contact Ohmique est protégé par du scotch Kapton. La zone d'activité de la surface dans la cellule électrochimique est de

0,5 cm² et elle est définie par la taille du joint torique (voir **Figure 6.3**). Les électrodes non modifiées sont hydrogénées quelques minutes avant l'expérience électrochimique en les plongeant dans une solution à 10 % de HF pendant 1 minute.

2.3.3. Photoanode *n*-Si/SiO_x/Ni et anode *p*⁺⁺-Si/SiO_x/Ni

Une fine couche de Ni (environ 2 nm) est déposée sur les surfaces propres *n*-Si/SiO_x ou *p*⁺⁺-Si/SiO_x par pulvérisation avec l'appareil Leica EM ACE600 coating system (pureté cible du Ni : 99,99 %, Leica). L'épaisseur de la couche de Ni est contrôlée in situ à l'aide d'un QCM et mesurée ex-situ par un AFM. Les images AFM sont capturées sur un microscope NT-MDT Ntegra en mode semi-contact avec une pointe FM (APPNANO, SPM Probe Model : FORTA-50, fréquence de résonance : 43-81 kHz). Les images AFM sont traitées et analysées avec le logiciel Gwyddion. La composition chimique de la couche supérieure de la surface est déterminée par XPS avec un spectromètre VG ESCALAB 250 Xi (ThermoFisher Scientific). Les spectres sont collectés avec un angle de départ de 90 ° et une énergie de 100, en utilisant une source de rayons X Al K α .

Le contact ohmique est créé au dos de l'électrode en grattant la surface avec un couteau à diamant. La zone grattée est ensuite recouverte par une goutte de InGa eutectique (Alfa Aesar, 99,99 %) puis mise en contact avec un morceau de ruban adhésif en Cu (Advanced Tapes AT526). Le contact eutectique et une partie de la bande de Cu sont recouverts par une fine couche de pâte d'Ag (Electron Microscopy Sciences). Après séchage de la pâte d'Ag, le contact Ohmique est protégé par du scotch Kapton. La zone d'activité de la surface dans la cellule électrochimique est de 0,5 cm² qui est définie par la taille du joint torique (voir **Figure 6.3**). Enfin, les électrodes sont hydrogénées avant l'expérience électrochimique en les plongeant dans une solution à 10 % de HF pendant 1 minute.

2.4. Expériences électrochimiques

2.4.1. Cellule électrochimique

La cellule électrochimique a été conçue et fabriquée à ISCR pour un montage à trois électrodes adapté à l'installation PECL (**Figure 6.3**). La cellule a été dessinée à l'aide de l'application Tinkercad (<https://www.tinkercad.com/>) et a été réalisée en Téflon (en polytétrafluoroéthylène) par une imprimante 3D ZMorph VX. Une fenêtre optique en verre est placée en face du SC, *i.e.* la WE, pour permettre la visualisation de la PECL.

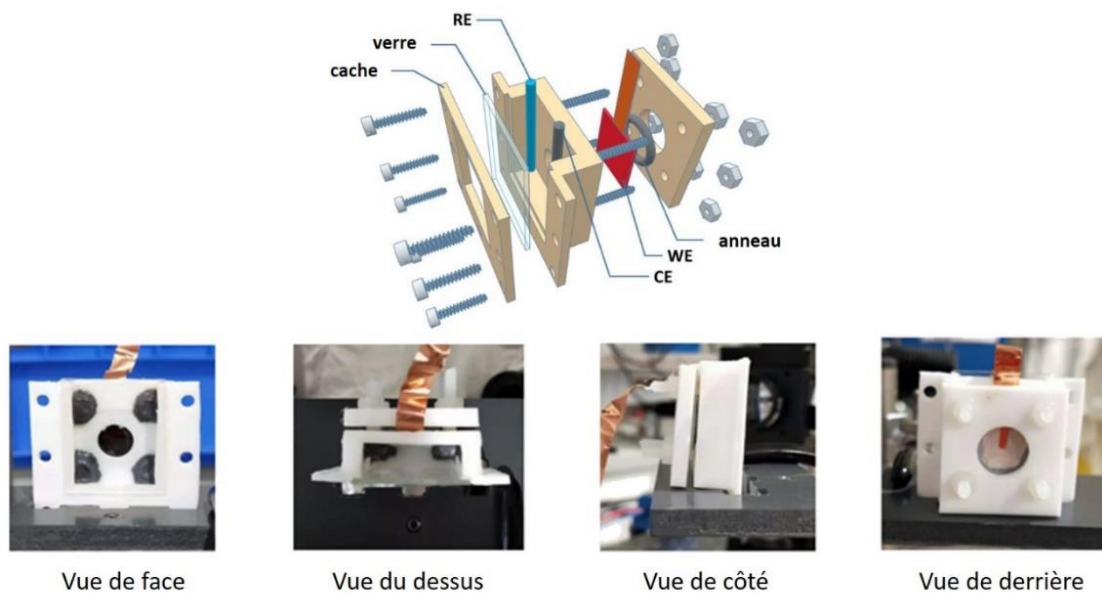


Figure 6.3 : Schéma (au-dessus) et photos (en-dessous) présentant la cellule électrochimique conçue pour la PECL.^[3]

2.4.2. Montage PECL

Le montage optique est réalisé à l'identique aux laboratoires ISCR et ISM. Il est composé d'un miroir dichroïque à 805 nm (Thorlabs DMSP805R) qui permet de réfléchir la lumière à 850 nm (nettoyée par un filtre passant à 850 ± 10 nm) générée par la LED IR (Thorlabs M850L3) et d'illuminer la WE. Un verre diffuseur dépoli est ajouté en face de la LED pour assurer l'illumination homogène de la WE. La lumière générée par PECL est transmise à travers le miroir dichroïque qui bloque la lumière IR avec un filtre passe-bas à 750 nm. Le signal PECL est mesuré par un spectromètre Spectra pro 2300i (Princeton Instrument) couplé à une fibre optique. Les enregistrements électrochimiques (CVs, CAs et CPs) sont réalisés par un potentiostat Autolab Type II. La cellule électrochimique est connectée à une pompe péristaltique (Grothen G728–1) pour induire un flux constant d'électrolyte à $0,7 \text{ mL s}^{-1}$ pendant les mesures de CPs. Toutes les expériences sont conduites à l'air libre.

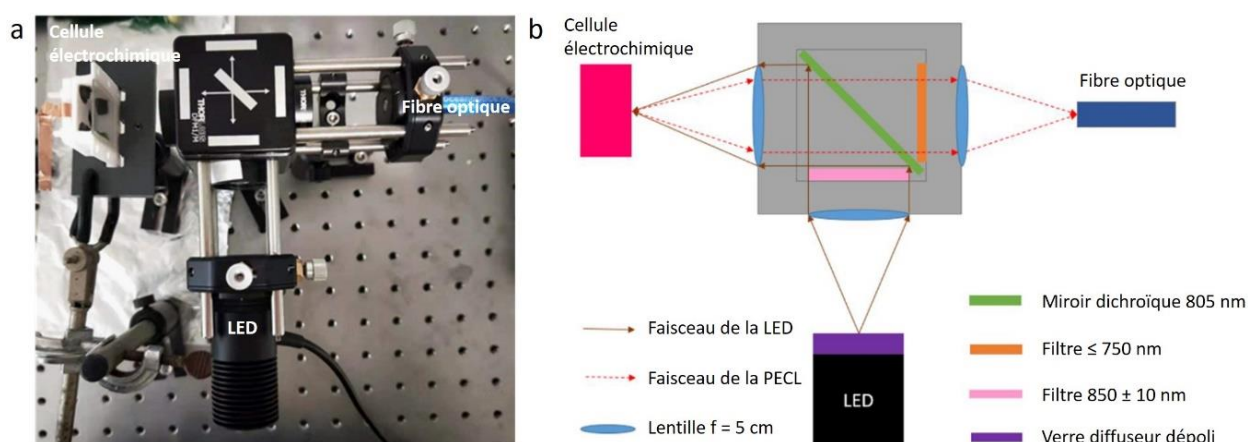


Figure 6.4 : a) Photographie et b) schéma du montage PECL.^[3]

2.4.3. Photocathode p -Si et cathode n^+ -Si avec le système ECL $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{BPO}$

Le montage de la cellule comprend un fil d'Ag qui joue le rôle d'une électrode de pseudo-référence, un fil de Pt en tant que CE et le Si hydrogéné en tant que WE. Les trois électrodes sont immergées dans une solution de 1 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, 10 mM de BPO et 0,2 M de TBAPF₆ dans de l'ACN au préalable dégazé avec du N₂ pendant 10 minutes.

2.4.4. Photoanode n -Si/SiO_x/M et anode p^{++} -Si/SiO_x/M (M = Pt, Ir et Ru) avec le système ECL $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$

Le système est constitué d'une REF Ag/AgCl/KCl 3M, d'une CE en fil de Pt, et d'une WE qui est l'anode en Si. L'électrolyte contient 5 mM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et 0,1 M de TPrA dans du PBS à 0,1 M dont le pH est ajusté à 7,4.

2.4.5. Photoanode n -Si/SiO_x/Ni et anode p^{++} -Si/SiO_x/Ni avec le système ECL luminol/H₂O₂

Le montage à trois électrodes contient l'électrode en Si qui joue le rôle de la WE, une REF Ag/AgCl (3 M KCl) et un fil de Pt en CE. L'électrolyte est composé de 10 mM de luminol mélangé à 33 mM de H₂O₂ dans 0,1 M de KOH ou de NaOH, le pH est d'environ égal à 13 dans les deux cas.

3. Chapitre IV : Application de la PECL pour la caractérisation de photoélectrodes

3.1. Réactifs

L'acétone (Erbatron de chez Carlo Erba) et l'éthanol anhydre (RSE electronic grade, Erbatron de chez Carlo Erba) ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le H_2SO_4 est fourni par BASF. Le $[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$, la TPrA, le $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ et le $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, proviennent de chez Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le PBS à 0,1 M est obtenu en mélangeant 0,085 M de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ et 0,015 M de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ dans de l'eau ultra pure (Milli-Q). Pour l'électrolyte contenant de la TPrA dans du PBS, le pH est abaissé à une valeur de 7,4 en ajoutant de l'acide sulfurique concentré. La photorésine AR-P 5350 et la solution de développement AR 300-35 ont été achetées auprès d'AllResist.

3.2. Préparation des surfaces

Les surfaces sont préparées à l'ISCR. Toutes les pinces et les échantillons utilisés pour nettoyer le silicium furent préalablement décontaminés dans une solution Piranha pendant 30 minutes à 105 °C. *Attention : la solution concentrée en H_2SO_4/H_2O_2 aqueux (Piranha) est très dangereuse, en particulier avec les matériaux organiques, et doit être manipulée avec précautions.* La plaquette de silicium dopée p^{++} (résistance de 0,001-0,005 Ω cm, Si dopé au bore, polie sur une seule face, 490-510 μ m d'épaisseur) (100) et dopée n (résistance de 0,3-0,7 Ω cm, Si dopé au phosphore, polie sur une seule face, 475-525 μ m d'épaisseur) (100) sont commercialisées par University Wafers. Les plaquettes de Si sont découpées en plusieurs surfaces ($1,3 \times 1,3$ cm²) pour fabriquer les électrodes. Les surfaces sont ensuite dégraissées par ultrason dans de l'acétone, de l'éthanol et de l'eau ultra pure pendant 10 minutes respectivement. Les surfaces en Si sont ensuite décontaminées et oxydées dans une solution Piranha à 105 °C pendant 30 minutes pour former chimiquement une couche de SiO_x de 1,5 nm d'épaisseur, suivi d'un rinçage abondant par de l'eau ultrapure et d'un séchage sous flux d'Ar.

3.3. Photolithographie du motif d'Ir

Les surfaces de Si sont recouvertes de la photorésine AR-P 5350 par centrifugation ou « spin coating » en anglais (LabSpin, SUSS MicroTec) (30 s, accélération : 3000 tr/min/s, vitesse : 4000 tr/min) au laboratoire FOTON. Ensuite, les surfaces en Si sont recuites sur une plaque chauffante à 105 °C pendant 4 minutes. Les surfaces de Si sont ensuite disposées sur le Libro Smart Print (microlight3D) et illuminées sous un masque UV suivant le motif choisi avec un objectif 5 \times pendant 0,75 s. Ensuite, les surfaces de Si insolées sont développées dans la solution composée d'eau ultra pure/AR 300-35 2/1 v/v pendant 45 s, suivi par un rinçage à l'eau ultra pure et d'un séchage sous flux de N_2 .

Les films minces d'Ir sont déposés au laboratoire ISCR sur les surfaces par pulvérisation cathodique avec un système de revêtement Leica EM ACE600 (pureté cible Ir : 99,95 %). L'épaisseur du film d'environ 2 nm est contrôlée *in situ* à l'aide d'une QCM. Les surfaces recouvertes d'Ir sont immergées dans de l'acétone à 50 °C pendant 5 minutes afin de dissoudre le reste de la résine

photosensible, enlevant le film Ir sur cette résine. Enfin, les surfaces en Si à motif d'Ir sont rincées à l'eau ultra pure et séchées sous flux d'Ar.

3.4. Caractérisation des surfaces

Les motifs d'Ir sur la surface Si/SiO_x de type *n* et *p*⁺⁺ sont visualisés au MEB à l'ISM, permettant de mesurer la largeur des bandes. Les images sont capturées avec un MEB VEGA3 TESCAN en HT à 10 kV avec un détecteur BSE. Les surfaces d'Ir homogènes sont caractérisées par AFM et XPS comme dans le chapitre III.

3.5. Fabrication des électrodes

Les électrodes sont préparées à partir des surfaces en Si recouvertes par l'Ir à l'ISCR. Un contact ohmique est créé au dos en grattant la surface avec un coupe-verre en diamant. Une goutte d'InGa eutectique (Sigma Aldrich, 99,99 %, base métallique) est versée sur la zone rayée puis est recouverte par un ruban de cuivre. Une fine couche de pâte d'argent (Electron Microscopy Sciences) est appliquée pour protéger le contact eutectique ainsi qu'une partie du ruban de cuivre. Après le séchage de la pâte, du ruban Kapton recouvre le tout pour protéger le contact ohmique.

3.6. Expériences photoélectrochimiques

Les expériences électrochimiques sont conduites à l'ISM avec un montage à 3 électrodes en utilisant un potentiostat PalmSens4. La WE est la surface en Si à motif d'Ir avec une zone active fixe de 0,5 cm², la REF est une électrode Ag/AgCl/KCl 3M et la CE est un fil de Pt. L'électrode en Si est scellée avec un joint torique à l'arrière d'une cellule électrochimique conçue au laboratoire ISCR (la même cellule utilisée dans le chapitre II, voir **Figure 6.4**). Une fenêtre en verre transparent disposée sur la face avant permet la transmission des photons vers la WE. L'électrolyte est composé de 5 mM de [Ru(bpy)₃]²⁺, 0,1 M de TPrA et 0,1 M de PBS à pH 7,4.

3.7. Imagerie de la PECL localisé par un laser

L'appareil hyperspectral confocal situé à l'institut FOTON est composé d'un microscope développé au laboratoire avec un grossissement 4x. La PECL est focalisée par la lentille tubulaire sur les fentes du spectromètre IHR320 (Horiba) qui disperse la lumière sur une caméra CCD Si open-electrode (Horiba Sincerity) 2048 × 256 pixels refroidie. Le spectromètre peut être utilisé à la fois pour une imagerie directe avec la caméra CCD ou pour une imagerie hyperspectrale. L'axe à 2048 pixels qui est perpendiculaire aux fentes du spectromètre permet d'obtenir la résolution spectrale et de séparer la tache PECL de celle du laser IR. En revanche, l'axe à 256 pixels capture l'image le long de la fente qui se reforme sur la caméra et qui permet d'obtenir les profils d'intensité.

3.8. Microscopie de la PECL localisé sur le motif d'Ir

Les expériences de microscopie PECL sont réalisées à l'ISM. L'électrode de Si est éclairée à l'avant (à travers l'électrolyte) par une LED à 850 nm (Thorlabs, M850L3) inclinée d'environ 45°. La PECL émise par l'électrode de Si est transmise à travers un filtre passe-bas avec une longueur d'onde de coupure à 750 nm (Thorlabs, FESH0750) (**Figure 6.5a**) afin de supprimer la lumière incidente IR. La PECL est imagée avec un microscope horizontal OLYMPUS connecté à une caméra EMCCD (Hamamatsu). Un objectif 5× (UMPlanFI, $ON = 0,15$) est utilisé pour le faible grossissement et un objectif 50× (LMPlanFLN, $ON = 0,5$) pour le fort grossissement (**Figure 6.5b**). Les images obtenues au microscope sont traitées par le logiciel ImageJ-Fiji pour ajouter le filtre rouge sur les images PECL et tracer les profils d'intensité. Le spectre de la PECL est enregistré avec un spectromètre (Spectra pro 2300i, Princeton Instrument).

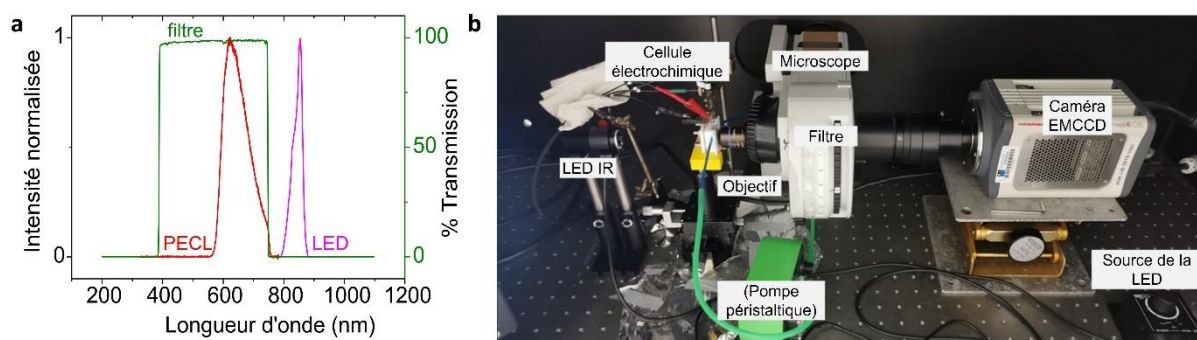


Figure 6.5 : a) Spectres normalisés : spectres d'émission de la PECL du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ localisés sur le motif d'Ir (courbe rouge) et de la LED IR (courbe rose). Les spectres sont superposés avec la transmission du filtre (courbe verte). b) Photographie du montage de l'imagerie PECL avec un microscope horizontal relié à une caméra (la pompe péristaltique n'a pas été utilisée pour les résultats présentés et la LED IR était positionnée du même côté que l'objectif).

4. Chapitre V : Développement et application de la PECL pour la bioanalyse et la bio-imagerie

4.1. ECL tout optique (AO-ECL)

4.1.1. Réactifs

Le luminol, le H₂O₂ (30 %), le KOH et le Triton X-100 sont fournis par Sigma-Aldrich. L'acétone (Erbatron de chez Carlo Erba) et l'éthanol anhydre (RSE electronic grade, Erbatron de chez Carlo Erba) ont été utilisés sans purification supplémentaire.

4.1.2. Fabrication de la jonction Au/*pnn*⁺⁺-Si/Pt

Les surfaces nanostructurées Au/*pnn*⁺⁺-Si/Pt sont fabriquées à l'institut de microélectronique de Barcelone en Espagne (BMI).

La jonction Si/Pt de la partie cathodique est fabriquée sur une plaque de Si dopée *n* (résistance de 1-12 Ω cm, Si dopé au bore, structure cristalline 100, 525 μm d'épaisseur) fournie par Siegert Wafer GmbH. La face polie est d'abord dopée au bore pour créer la jonction *np* (énergie à 50 KeV, densité 4.10¹⁵ cm⁻², EATON NV4206). Le dopage de la face opposée qui est non polie est augmenté par l'implantation d'atomes de phosphore formant une couche dopée *n*⁺⁺ (énergie à 50 KeV, densité à 4.10¹⁵ cm⁻², EATON NV4206). Cette étape est suivie par un recuit de la plaque à 950 °C pendant 15 min (Tempress Furnace, TS-Series V), puis par une immersion de la plaque dans du HF (5 %) pour éliminer la couche d'oxyde formée pendant le recuit.

Les couches de Ti/Au (Ti à 2 nm et Au à 75 nm d'épaisseur) du côté *np* et Ti/Pt (Ti à 5 nm et Pt à 50 nm d'épaisseur) du côté *n*⁺⁺ sont déposées par évaporation par faisceau d'e⁻ (OERLIKON UNIVEX 450B) à une vitesse de dépôt de 1 Å s⁻¹. Les nanopiliers de Si/Au sont formés par technique de lithographie colloïdale. La surface en Au est activée par gravure ionique réactive à oxygène (« Reactive-Ion Etching » ou RIE, Alcatel AMS 100 DE) HF 100 W, à un débit massique de 30 centimètres cube standard par minute ("Standard cubic centimeters per minute" ou sccm) à une pression de 3 Pa. Des billes de polystyrène fonctionnalisées par un amide (diamètres d'environ 270 nm, Thermo Fisher Scientifique) sont auto-assemblés sur la surface par incubation de la dispersion colloïdale à 0,1 % et à 0,002 % (concentrations massiques) pendant 3 minutes pour obtenir une haute-densité et une faible densité de piliers, respectivement. Après un rinçage à l'eau distillée, les échantillons sont séchés sous un flux de N₂ pour produire la monocouche de sphères de polystyrène distribuée de manière homogène et aléatoire sur la surface en Au. Cette monocouche colloïdale est utilisée comme masque pour fabriquer les nanopiliers Si-Au par le procédé RIE en deux étapes : *i*) Ar (ICP 1000 W, HF 50 W, 20 sccm, 1 Pa, 2 min, Alcatel AMS 110 DE) pour graver la couche d'au layer et laisser les disques d'au sous les billes de polystyrène, et *ii*) SF₆/C₄F₈ (ICP 800 W, HF 15 W, SF₆ 150 sccm, C₄F₈ 100 sccm, 20 s, Alcatel AMS 110 DE) pour former les nanopiliers Si/Au avec une hauteur à environ 265 nm. Les restes des billes de polystyrène sur les nanopiliers Si/Au sont éliminés mécaniquement par un ruban adhésif pour salle blanche.

La surface est découpée en plusieurs électrodes de surface de $1,2 \times 1,2 \text{ cm}^2$. La face anodique de la jonction $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}/\text{Pt}$ est traitée pendant 20 minutes avec un nettoyant UV-ozone ou pendant 15 minutes dans un nettoyeur plasma juste avant de débiter les expériences à l'ISCR ou à l'ISM respectivement.

4.1.3. Mesures photoélectrochimiques

4.1.3.1. Montage et mesures à trois électrodes

Les électrodes en $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}/\text{Pt}$ et la CE sont reliées par contact ohmique à l'aide d'un ruban de cuivre fixé au dos de l'électrode $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}$ du côté Si pour les mesures anodiques (**Figure 6.6.c**) ou du côté Pt pour les mesures cathodiques (**Figure 6.6.e**). L'électrode est scellée à l'arrière d'une cellule photoélectrochimique à l'aide d'un joint torique d'un diamètre inférieur à $0,8 \text{ cm}^2$. La surface électroactive de l'électrode en Si est fixée à $0,5 \text{ cm}^2$. La cellule photoélectrochimique est identique à celle utilisée dans les chapitres III et IV (voir section expérimentale, **Figure 6.3**). La CE et la REF ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl } 3\text{M}$) sont immergées dans l'électrolyte.

Les mesures de CV et d'OCP sont effectuées avec un potentiostat Biologic SP-300 et une CE en C à l'ISCR. Ces mesures sont réalisées avec un potentiostat PalmSens4 avec une CE en Pt à l'ISM. La CV cathodiques enregistrée sur le platine est réalisée en exposant le côté platine à l'électrolyte, en laissant le contact avec la bande de cuivre à l'extérieur du joint torique.

La mesure IPCE de l'électrode $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}/\text{Pt}$ est enregistrée à un potentiel de $0,6 \text{ V}$ dans la même cellule à trois électrodes, avec un système CIMPS-QE IPCE 3 (Zahner) comprenant une source de lumière TLS03 contrôlée par un potentiostat PP211.

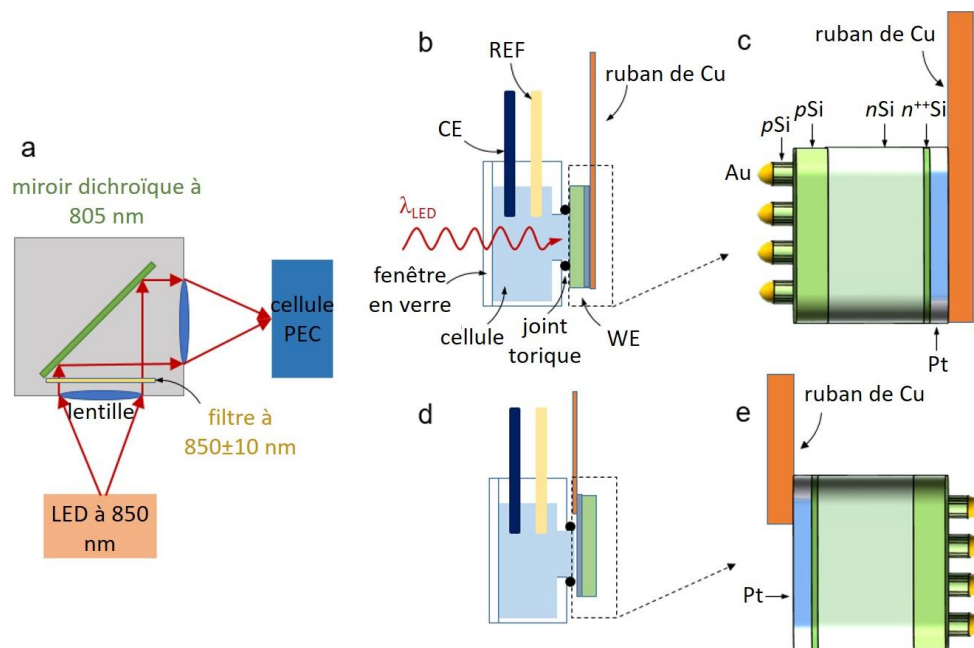


Figure 6.6 : a) Schéma du montage à trois électrodes pour les mesures photoélectrochimiques. b) Schéma de la cellule photoélectrochimique (PEC) utilisée pour les mesures de la photoanode $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}$ (côté Au) en montage à trois électrodes. c) Schéma de la photoanode $\text{Au}/\text{pnn}^{++}\text{-Si}$. d) Schéma de la cellule électrochimique utilisée pour les mesures de la cathode Pt en montage à trois électrodes. e) Schéma de la cathode Pt.

4.1.3.2. Montage et mesures à deux électrodes

La cellule à deux électrodes comprend la jonction $Au/pnn^{++}\text{-Si}$ comme anode et une grande plaque en Pt (2 cm^2) comme cathode, comme le montre la **Figure 6.7.b**. Les mesures sont effectuées avec un potentiostat ou avec un ampèremètre portatif (Keysight Technologies, U1253B) Dans le cas des mesures avec un potentiostat, l'anode $Au/pnn^{++}\text{-Si}$ est connectée à la sortie de la WE et la cathode en Pt est connectée aux sorties de la REF et de la CE.

Dans la configuration photoélectrochimique à deux électrodes, illustrée sur la **Figure 6.7.a**, la photoanode reçoit la lumière incidente IR à 850 nm (bande ajustée à $850 \pm 10\text{ nm}$) et l'émission ECL est enregistrée par un spectromètre (Spectra pro 2300i, Princeton Instrument), comme décrit dans la section expérimentale à propos du montage PECL. La CV et l'intensité ECL correspondante sont enregistrées simultanément en fonction du biais appliqué.

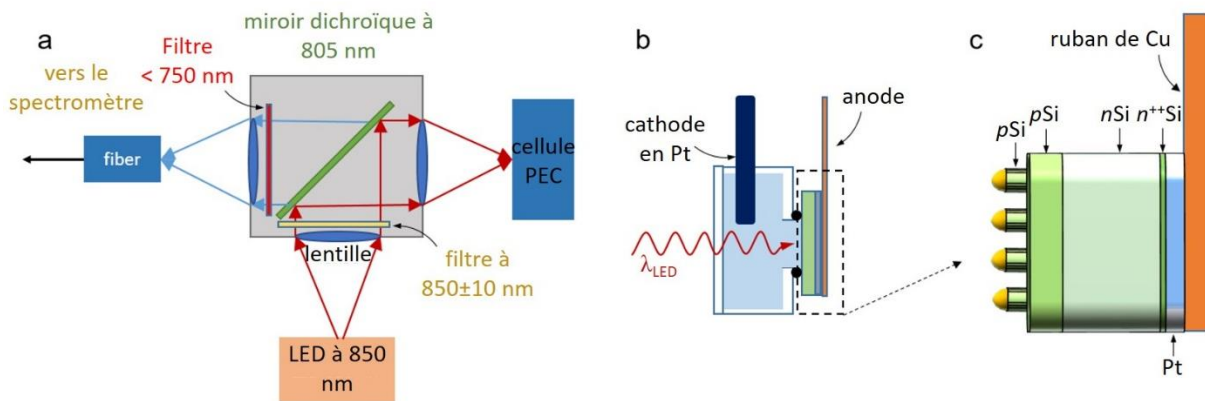


Figure 6.7 : a) Schéma du montage à deux électrodes utilisé pour les mesures photoélectrochimiques. b) Schéma de la cellule photoélectrochimique (PEC) utilisée pour les mesures de la photoanode $Au/pnn^{++}\text{-Si}$ (côté Au) en montage à deux électrodes. c) Schéma de la photoanode $Au/pnn^{++}\text{-Si}$.

Les images sont capturées par une caméra de téléphone portable (OPPO R11s) à travers un filtre de coupure IR (Thorlabs FESH0750). La LED IR est placée devant la photoanode $Au/pnn^{++}\text{-Si}$ avec un angle de 45° et une distance de 2 cm. Une partie de la surface de la jonction $Au/pnn^{++}\text{-Si}$ est recouverte par un scotch hydrophobe, donnant un carré d'environ $0,16\text{ cm}^2$ au centre du joint torique. Le téléphone portable est placé devant la cellule photoélectrochimique. L'appareil photographique est réglé en mode expert, en gardant une balance des blancs constante de 4800 K, une compensation d'exposition de 0, une sensibilité de 1000 et un $t_{\text{expo}} = 3\text{ s}$. Le paramètre de mise au point est variable en fonction de l'emplacement de la caméra et reste constant pendant la mesure. Les images ECL sont analysées avec les logiciels GIMP et ImageJ-Fiji.

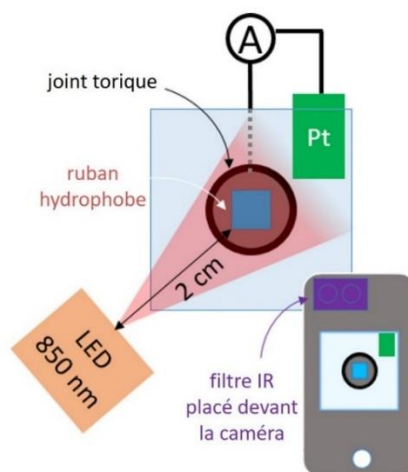


Figure 6.8 : Schéma du montage photoélectrochimique utilisé pour les mesures à deux électrodes avec un ampèremètre et un téléphone portable qui détecte l'émission AO-ECL.

4.1.4. Images macroscopiques de l'AO-ECL

Pour capturer les images macroscopiques de l'AO-ECL, la surface $Au/pnn^{++}\text{-Si/Pt}$ est entièrement immergée dans une cellule de forme parallélépipédique en verre sous agitation électrolytique à l'aide d'un barreau magnétique. La surface photoactive est délimitée à de $0,16\text{ cm}^2$ sur la face avant et la surface du côté du Pt à $0,65\text{ cm}^2$ à l'aide d'un ruban hydrophobe.

Les photographies d'AO-ECL sont prises à l'ISCR comme illustré sur la **Figure 6.9** sous un éclairage IR intermittent, en variant la puissance de la LED IR et en gardant les paramètres de capture de la caméra et de configuration décrites dans la section sur le montage et les mesures à deux électrodes ci-dessus. Les images AO-ECL obtenues sont ensuite analysées avec les logiciels GIMP et ImageJ-Fiji. Des photos AO-ECL ont également été prises sous illumination dans le domaine du visible avec un $t_{\text{expo}} = 16\text{ s}$. L'appareil photographique du téléphone portable était équipé d'un filtre à $450 \pm 10\text{ nm}$ pour ne détecter que la lumière issue de la PECL du luminol.

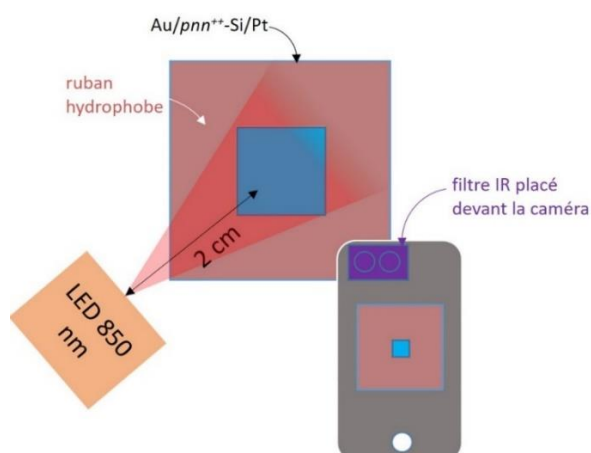


Figure 6.9 : Schéma du téléphone portable utilisé pour capturer l'émission AO-ECL sur la face anodique de la jonction $Au/pnn^{++}\text{-Si/Pt}$ sous illumination IR.

4.1.5. Images microscopiques de l'AO-ECL

La cellule électrochimique est fabriquée au laboratoire ISM avec un anneau épais en polydiméthylsiloxane collé sur une lamelle de microscope pour former un bain qui sera rempli par l'électrolyte (**Figure 6.10**). Un joint torique fin est découpé en morceaux qui sont collés au milieu du bain pour surélever l'électrode et que toute la surface de celle-ci soit en contact avec l'électrolyte. L'électrode est déposée sur la lame avec la face avant (où se produit l'AO-ECL) face à l'objectif. L'électrolyte est le même que pour les expériences photoélectrochimiques décrites dans cette partie.

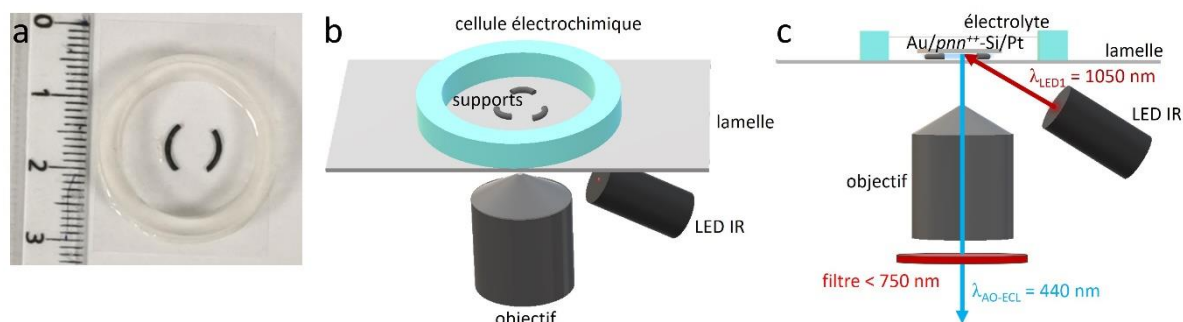


Figure 6.10 : a) Photographie de la cellule électrochimique utilisée pour la microscopie AO-ECL monolithique (échelle en cm). b,c) Schéma de la cellule positionnée sur le microscope et illuminée par la LED IR.

L'AO-ECL est généré à l'aide d'une lampe LED infrarouge (M1050L4, Thorlabs) à 1050 nm face à l'anode, en éclairage latéral (incliné à environ 45°), comme le montre la **Figure 6.10c**. L'AO-ECL est observée à l'ISM sur un microscope inversé à épi-fluorescence (Leica DMI8) avec un objectif grossissant 40× (11506155, type HC APO, $ON = 0,8$, distance de travail $WD = 3,3 \text{ mm}$) via un filtre IR ($< 750 \text{ nm}$). Les images sont enregistrées à l'aide d'une caméra EMCCD (Hamamatsu, 9100-13) avec un t_{expo} de 5 s (gain = 1 ; gain de sensibilité = 220). Les images sont ensuite traitées et analysées par le logiciel ImageJ-Fiji.

4.1.6. Caractérisation des matériaux

Les images MEB sont réalisées à l'ISCR avec un MEB JSM 7100F (JEOL). Les données XPS sont collectées par un spectromètre Thermo-Fisher NEXSA G2 utilisant la source de rayons X Al $K\alpha$ fonctionnant à 1486,6 eV et utilisant une taille de spot de 200 μm . Les spectres de 0 à 1000 eV sont acquis avec une énergie de passage de l'analyseur de 200 eV (1 eV/pas) et les énergies de liaison sont référencées au pic C1 à 285 eV.

4.1.7. Simulation optique

Les simulations de la réflectance et de la distribution des champ électromagnétique sont réalisées par le Dr. Borja Sepúlveda à l'IMB avec le logiciel Lumerical basé sur le domaine temporel à

différences finies (FDTD). Les simulations supposent un réseau périodique de nanopiliers de Si (avec un pas de 600 nm) d'un diamètre de 275 nm et d'une hauteur de 190 nm, coiffés d'un disque en Au du même diamètre et d'une hauteur de 75 nm. L'eau est considérée comme milieu incident avec un indice de réfraction de 1,33. Le réseau est éclairé par une onde plane incidente sur la surface Si/Au. Le disque d'Au est modélisé avec un maillage de 2 nm. La simulation est comparée à celle d'un substrat plat en Si. L'absorption A est obtenue avec $A = 1 - R - T$, où R prend en compte la lumière réfléchie et T est la transmission dans un plan situé 1 μm en dessous de l'interface Si/Au. Par conséquent, A représente la lumière absorbée dans les premiers 1 μm de la surface, ce qui correspond à la jonction np photoactive. La simulation montre une augmentation de l'absorption dans la plage spectrale de 800 nm à 900 nm par rapport au substrat plat en Si, ce qui permet une meilleure absorption des photons dans la région active pn .

4.2. Imagerie des cellules par PECL

4.2.1. Réactifs

L'acétone (Erbatron de chez Carlo Erba) et l'éthanol anhydre (RSE electronic grade, Erbatron de chez Carlo Erba) ont été utilisés sans purification supplémentaire. La TPrA, le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, l'acide sulfurique, le $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, le H_2O_2 (30 %), le H_2SO_4 , le $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, le PFA, le marqueur calcéine-AM ainsi que la streptavidine issue des bactéries *Streptomyces avidinii* sont commercialisés par Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans purification supplémentaire. La biotine X est fournie par Fisher Scientific et le DMSO par Invitrogen. Le PBS à 0,65 M est obtenu en mélangeant 0,55 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 0,1 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau ultra pure (Milli-Q). Après ajout de la TPrA, le pH de la solution PBS est abaissé à 7,4 en complétant par de l'acide sulfurique concentré. Le PBS 1 \times et la trypsine sont fournis par Gibco. Les cellules CHO-K1 proviennent du Public Health England (HPA) Culture Collections et sont commercialisées par Sigma (85051005). Le milieu de culture est un milieu de Dulbecco modifié par Iscove (« Iscove's modified Dulbecco's medium » ou IMDM) complété avec 10 % de sérum bovin foetal et 100 U/mL pénicilline/ streptomycine et il est utilisé pour la culture cellulaire qui a lieu dans un incubateur (37 °C, 5 % de CO_2).

4.2.2. Préparation des surfaces

Les surfaces $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ sont préparées de la même manière que dans le chapitre III.

4.2.3. Préparation des cellules

4.2.3.1. Culture cellulaire

Les cellules CHO-K1 ont été déposées sur les surfaces $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ du côté de l'Ir et incubées pendant 48 heures en présence de milieu de culture à 37°C à 5 % de CO_2 à l'ISM.

4.2.3.2. Marquage à la SA@Ru pour la PECL+

Les marqueurs SA@Ru sont préparées à l'ISM à partir d'une solution de 100 μL de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (10 mg/mL) dans du DMSO anhydre, de 100 μL de streptavidine (1 mg/mL dans du PBS) et 800 μL de PBS. La solution est centrifugée pendant 4 heures à 4 °C et dialysée pendant la nuit sous agitation à 4 °C. Pour le marquage, les cellules étaient fixées à l'électrode avec du PFA à 4 % pendant 10 minutes, perméabilisées pendant 10 minutes avec du Triton X-100 à 0,1 %, marquées d'abord à la biotine X à 11 μM pendant 1 heure et enfin avec la solution contenant le SA@Ru (0,1 mg/mL) pendant 45 minutes.^[4]

4.2.3.3. Marquage à la calcéine AM pour la PECL-

Les cellules sont marquées à la calcéine-AM (1 μM dans le milieu de culture) pendant 15 minutes dans l'incubateur et ensuite fixée pendant 10 minutes à l'électrode avec du PFA à 4 %.^[5]

4.2.4. Imagerie par PECL

4.2.5. Expériences d'électrochimie et de microscopie

La cellule photoélectrochimique est conçue au laboratoire ISM et imprimée en 3D pour un montage à 3 électrodes avec une WE plane et adaptée au microscope à épi-fluorescence inversé. Le matériau utilisé est opaque pour ne pas diffuser la lumière générée par la LED. Les mesures électrochimiques sont réalisées sur les surface $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ ou $p^{++}\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ en tant que WE avec un fil de Pt en CE et une électrode Ag/AgCl/KCl 3 M en REF. La WE est placée au milieu de la cellule et est stabilisée par un plateau fixé à l'aide de 4 vis. Une ouverture a été créée sur ce plateau pour permettre une illumination arrière de la WE par une LED. La surface en Ir de la WE est orientée vers le bas et le contact avec l'électrolyte est délimité par un joint torique sur 0,38 cm^2 . La surface visible à travers une lamelle de microscope située en dessous. Pour que les cellules CHO-K1 à la surface de l'électrode puissent être focalisées avec un objectif 40 \times qui a une distance de travail de 3,3 mm, la distance entre la WE et la lamelle de microscope (remplie par l'électrolyte) est réduite à une épaisseur minimale de 2,95 mm.

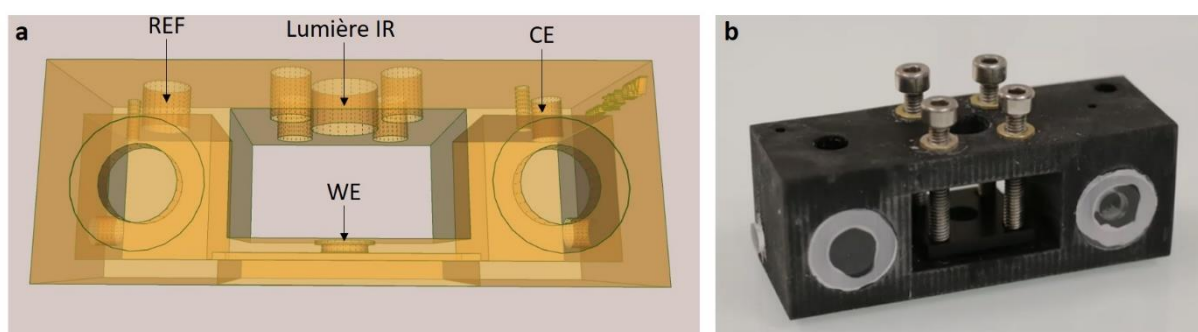


Figure 6.11 : a) Schéma de la cellule photoélectrochimique adaptée au microscope à épi-fluorescence inversé et conçu pour contenir une WE plane positionnée horizontalement avec une illumination au-dessus par la LED IR. b) Photographie de la cellule photoélectrochimique.

Les expériences de microscopie PECL sont réalisées avec un potentiostat PalmSens4 pendant que la WE est illuminée au dos (côté n -Si) par une LED IR à 1050 nm (Thorlabs, M1050L4). Les images PL et PECL sont observées du côté Ir de la surface avec microscope à épi-fluorescence inversé (Leica DMI8) et capturées à l'aide d'une caméra EMCCD (EMCCD 9100-13) de chez Hamamatsu. Un objectif 40× (Leica HC APO ; immersion dans l'eau) avec une ON de 0,8 a été utilisé pour l'imagerie par PECL et par PL. Les contre expériences par imagerie ECL sont réalisées dans les mêmes conditions mais avec des surfaces p^{++} -Si/SiO_x/Ir et sans illumination par la LED IR. Les images sont traitées et analysées par le logiciel ImageJ-Fiji. L'intensité de luminescences des images est colorée en vert pour la PL (Lookup table/Green color) et en rouge pour l'ECL et la PECL (Lookup table/Red color).

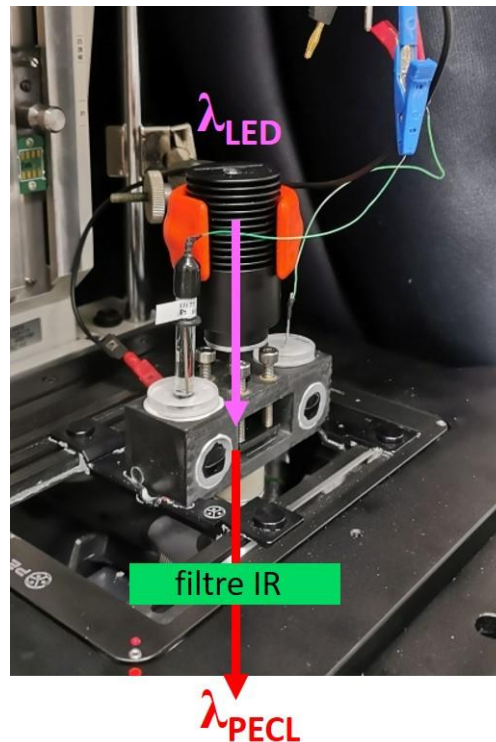


Figure 6.12 : a) Photographie du montage de la microscopie PECL en illumination arrière par une LED IR sur le microscope à épi-fluorescence inversé.

L'émission PECL a pu être mesurée avec un spectromètre (Spectra pro 2300i de chez Princeton Instrument) dans le même montage PECL que dans le chapitre III.

4.2.6. Imagerie

4.2.6.1. PECL+

Les images des cellules marquées avec la SA@Ru sont visualisées par PL avec un cube dichroïque FITC passe long composé d'un filtre d'excitation à $\lambda_{abs} = 470 \pm 20$ nm, d'un filtre barrière à $\lambda_{em} = LP 515$ nm et d'un miroir dichroïque à $\lambda_{DM} = 510$ nm. Les images de PL sont capturées avec un t_{expo} de 0,5 s avec une caméra CCD en mode normal. Les images par ECL+ et PECL+ de la SA@Ru sont

capturées avec un t_{expo} de 10 s et de 20 s respectivement avec un filtre passe bas IR ($\lambda_{\text{suppr}} = \text{SP } 750 \text{ nm}$) avec une caméra en mode EMCCD (sensibilité du gain = 255 ; gain = 1).

4.2.6.2. PECL-

Les images des cellules marquées avec la calcéine-AM sont visualisées par PL avec un cube dichroïque FITC passe long composé d'un filtre d'excitation à $\lambda_{\text{abs}} = 480 \pm 20 \text{ nm}$, d'un filtre barrière à $\lambda_{\text{em}} = 527 \pm 15 \text{ nm}$ et d'un miroir dichroïque à $\lambda_{\text{DM}} = 505 \text{ nm}$. Les images de PL sont capturées avec un t_{expo} de 1 s avec une caméra CCD en mode normal. Les images par ECL- et PECL- du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en libre diffusion dans l'électrolyte sont capturées avec un t_{expo} de 5 s et de 10 s respectivement avec un filtre passe bas IR ($\lambda_{\text{suppr}} = \text{SP } 750 \text{ nm}$) avec une caméra en mode EMCCD (sensibilité du gain = 255 ; gain = 1).

Références

- [1] B. Guérin, P. Labbe, M. Somlo, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **1979**, pp. 149–159.
- [2] “Calculate SSIM Index,” can be found under <https://imagej.net/ij/ij/plugins/ssim-index.html>, **n.d.**
- [3] Y. Zhao, J. Descamps, S. Ababou-Girard, J. Bergamini, L. Santinacci, Y. Léger, N. Sojic, G. Loget, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202201865.
- [4] S. Voci, B. Goudeau, G. Valenti, A. Lesch, M. Jović, S. Rapino, F. Paolucci, S. Arbault, N. Sojic, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14753–14760.
- [5] J. Descamps, C. Colin, G. Tessier, S. Arbault, N. Sojic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *135*, e202218574.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'ECL est un processus de conversion d'un courant électrique en lumière via une réaction électrochimique, appliqué dans le domaine analytique avec les immunoessais et dans le diagnostic clinique. D'autre part, la photoélectrochimie sur SC est un processus inverse de l'ECL dans lequel une électrode absorbe la lumière pour déclencher une réaction électrochimique, principalement utilisé pour des applications dans les énergies renouvelables. L'objectif principal de cette thèse était de mettre au point de nouvelles stratégies de détection et d'imagerie basées sur l'ECL et sur la PECL.

L'ECL a été introduite dans un premier chapitre en détaillant les phénomènes électrochimiques et photophysiques impliqués, les couples luminophore/co-réactif modèles ainsi que l'histoire de l'ECL.

La microscopie d'entités biologiques par ECL est abordée dans le deuxième chapitre. Les recherches se sont focalisées plus exactement sur la bio-imagerie ECL- basée sur la diffusion simple du luminophore et co-réactif du système ECL modèle $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ dans l'électrolyte à pH physiologique. Elle se différencie de l'ECL+ dans lequel l'objet d'étude est lié de manière covalente au luminophore. En comparant avec des images en PL, l'ECL- a permis d'observer des détails qui n'étaient que peu ou pas visibles par PL tels que des organites ou bien les points de jonction des cellules sur l'électrode. Cette méthode est également très sensible car les objets sont détectés avec une concentration en luminophore pouvant aller jusqu'à l'ordre du picomolaire. La microscopie par ECL- est finalement plus simple à mettre en place que l'imagerie par ECL+ car elle s'affranchit des étapes de marquage du substrat, n'interférant donc pas avec l'activité biologique de celui-ci, et peut être finalement adaptée à tout type d'objet à la surface d'une électrode.

Pour étendre ses champs d'applications, l'ECL a ensuite été combinée à la photoélectrochimie avec le développement de la PECL sur SC dans le troisième chapitre. La bande interdite du Si étant étroite, elle a permis de concevoir un décalage de type anti-Stokes, c'est-à-dire la génération d'une lumière visible à partir d'une énergie supérieure à la lumière. Ce processus s'oppose à la conversion de type Stokes classiquement observée en PL et a pour but d'évoluer vers de l'imagerie PECL visible par de la lumière IR invisible à l'œil nu. Bien que le Si soit instable en photoélectrochimie, trois systèmes PECL efficaces et stables ont pu être mis en place en protégeant l'électrode par une structure MIS en oxydation en milieu aqueux, à pH neutre ou alcalin, ou une couche de Si hydrogéné en réduction en milieu organique. Ces améliorations ont été une étape cruciale pour pouvoir déployer la PECL en microscopie et imagerie, avec notamment une activité ECL de 35 heures pour la photoanode de structure $n\text{-Si}/\text{SiO}_x/\text{Ir}$ avec le système ECL $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$.

La stabilité de la structure MIS à base d'Ir a ouvert la voie pour une première application de la PECL dans la caractérisation des SC en photoélectrochimie. Le quatrième chapitre décrit les travaux sur l'application de la PECL avec le système ECL $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ pour visualiser l'absorption de la lumière, la diffusion et le transfert des charges vers l'électrolyte. L'activité photoélectrochimique a été, dans un premier temps, localisée sur le SC par la lumière incidente en utilisant un laser IR. La PECL a permis par photo-adressage laser de révéler expérimentalement la diffusion des porteurs de charges à la surface du SC en comparant la taille de la tâche PECL avec la taille de la tâche IR. Dans un second temps, le transfert de charge a été localisé par PECL à la surface d'une électrode hétérogène recouverte

d'un motif micrométrique en Ir conducteur sur une surface SiO_x quasi-isolante. La bonne corrélation entre l'image du motif par MEB et le motif lumineux observé par microscopie PECL montre la fiabilité de l'imagerie par PECL. Dans ce chapitre, la PECL a ainsi contribué à étendre l'analyse par ECL au-delà de la sphère médicale et à toucher le domaine des énergies en photoélectrochimie.

Enfin, la PECL a été adaptée pour une utilisation en bio-imagerie en suivant deux approches qui sont présentées dans le cinquième chapitre. La première s'est focalisée sur la simplification et la portabilité de la PECL. En effet, malgré la lumière incidente, la PECL nécessitait jusqu'ici un montage avec au moins deux électrodes reliées par des fils à un potentiostat. Grâce à l'ingénierie de la structure du SC à base de Si de forme $\text{Au/pnn}^{++}\text{-Si/Pt}$, le photovoltage sous illumination a été augmenté pour générer de l'ECL tout optique : l'AO-ECL. De cette manière, l'ECL du système luminol/ H_2O_2 a pu être capturée avec la caméra d'un téléphone portable et localisée en microscopie optique seulement en immergeant une électrode monolithique dans l'électrolyte ECL et en l'irradiant avec les longueurs d'ondes allant du rouge à l'IR. La seconde approche consistait à associer la PECL par illumination IR au dos de la photoanode $n\text{-Si/SiO}_x/\text{Ir}$ à la microscopie ECL de cellules CHO-K1. Pour cela, les cellules ont été déposées et cultivées sur la surface en Ir, puis traitées pour les imager par PECL+ et par PECL-. Ces deux méthodes de bio-imagerie PECL faisaient intervenir l'ECL du système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ et ont permis d'imager des cellules uniques avec une bonne intensité et un bon contraste.

Les travaux de cette thèse ont permis de mettre en place de nouvelles méthodes pour la détection et l'imagerie par ECL. Tout d'abord, il a été possible de visualiser des objets micrométriques par la localisation de la PECL au niveau d'un motif d'Ir avec des bandes de 50 à 5 μm d'épaisseur et d'un réseau de nanopilliers en or de 275 nm de diamètre. De plus, l'observation d'organites cellulaires comme les mitochondries par ECL- a ouvert la voie à la microscopie ECL d'entités de taille micrométrique et inférieur. Ensuite, inspiré par les travaux de recherche dans le secteur de la photoélectrochimie, l'application et le développement de la structure MIS du SC a considérablement allongé la durée de fonctionnement de la PECL. Ces efforts ont permis de mettre en pratique la PECL dans le domaine de l'énergie avec la caractérisation de matériaux pour la photoélectrochimie et dans le domaine médical avec la bio-imagerie. L'introduction d'une lumière d'excitation sur l'électrode offre de nombreux avantages tels que la réduction du potentiel à appliquer, un contrôle spatial et temporel de la réaction ECL. L'ingénierie de la structure du SC a pu aboutir à une électrode monolithique générant le premier système AO-ECL reporté dans la littérature.

La stratégie du développement de l'ECL à partir de l'utilisation d'une lumière d'excitation pour photogénérer les charges pourrait sembler contre-productive. En effet, l'imagerie et la détection par ECL se différencie de celle par PL par l'absence de photoexcitation lui procurant un excellent SNR. La PECL semblerait donc annuler tous les bénéfices de l'ECL. Mais grâce au développement et à l'optimisation de la PECL sur un SC à base de Si, qui est pourtant connu comme étant instable en oxydation en milieu aqueux, la lumière incidente peut être convertie de manière anti-Stokes avec une longueur d'onde incidente maximale à 1107 nm. De cette manière, la lumière d'excitation n'est donc pas ou faiblement détectée et offre une bonne émission et imagerie par PECL. De plus, la conversion de type anti-Stokes permet de photoinduire de l'ECL visible par une lumière invisible à faible énergie comme l'IR. Cette conversion aurait été problématique si elle avait été de type Stokes comme en PL car la lumière invisible à l'œil nu aurait été dans la gamme des UV qui peut être délétère pour les bio-organismes.

Les travaux effectués sur l'ECL et la PECL sont transposables à d'autres études. En effet, pour réaliser les expériences de microscopie ECL et PECL sur une électrode plane, différentes cellules (photo)électrochimiques ont été conçues en laboratoire. Elles ont été spécifiquement adaptées pour permettre l'observation de l'électrode sur un microscope horizontal ou vertical et inversé et sont adaptables pour d'autres applications d'imagerie avec ou sans ECL, photoinduit ou non. De plus, le développement de la PECL sur du SC a abouti à la fabrication d'électrodes stables et à l'architecture simple à partir d'un matériau abondant et peu coûteux tel que le Si et qui peuvent être impliquées dans d'autres études en photoélectrochimie.

Le développement de l'imagerie ECL et PECL a reposé sur l'utilisation des couples luminophore/co-réactifs modèles. Cependant, il existe beaucoup d'autres systèmes ECL qu'ils seraient intéressants d'exploiter. Les études en bio-imageries ont été exclusivement réalisées avec le système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$, principalement parce qu'il est optimal à pH neutre. Le couple L-012/ H_2O_2 , qui génère également de l'ECL à un pH physiologique, n'a pas été utilisé car la durée de vie des radicaux est plus longue ce qui augmente la distance de diffusion et rend l'image moins nette.

Les images par microscopie PECL présentées dans ce manuscrit constituent une première approche et ne prennent pas en compte tous les aspects optiques et physiques du montage. L'indice de réfraction et la diffusion de la lumière par l'électrolyte, la potentielle réflexion de l'ECL sur le SC métallique et l'influence de l'angle d'excitation du SC par la LED seraient des points à clarifier. De plus, l'intégration de la lumière IR dans le système optique du microscope permettrait d'illuminer le SC de face et de potentiellement améliorer la qualité de l'image PECL. Pour une application en bio-imagerie, il faudrait vérifier que la lumière IR ne soit pas néfaste pour les entités biologiques.

L'approche de ces travaux de recherche est majoritairement expérimentale. Des calculs et simulations des phénomènes observés permettraient d'aller plus loin dans les interprétations. Elles serviraient par exemple à déterminer le niveau exact de l'épaisseur de la couche ECL- selon les concentrations en luminophore ou à connaître le rendement total de la conversion de la lumière LED en ECL et savoir par exemple si une partie de la lumière ECL pourrait être absorbée par le SC. Enfin, il serait intéressant de compléter ces travaux par des études de répétabilité de plus grande ampleur et des tests de stabilité plus poussés pour déployer la PECL à plus grande échelle en laboratoire ou dans l'industrie

La microscopie ECL et PECL a permis de détecter des objets de taille micrométrique avec les mitochondries, jusqu'à l'échelle de la centaine de nanomètres au niveau de couche en Au située au sommet des nanopilliers. L'augmentation du grossissement est un axe de développement majeur de la bio-imagerie ECL. Elle permettrait d'aller plus loin dans l'étude et la compréhension de la biochimie à l'intérieur des cellules uniques, jusqu'à la détection ultime de molécules uniques. Avec un microscope à épi-fluorescence, une technique d'approche consiste à les observer à travers une électrode transparente, par exemple en ITO. Avec la PECL basée sur le Si, les images sont capturées en face de l'électrode à travers l'électrolyte. Cet espacement créé entre l'électrode et l'objectif peut être limitant dans le choix d'un objectif à plus fort grossissement car il devrait garder une distance de travail assez grande tout en ayant une ouverture numérique optimale pour bien détecter l'ECL.

Une étape cruciale dans le développement de l'imagerie et de la détection par ECL serait la conception d'une photoélectrode capable de générer l'AO-ECL du système $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$. Elle

permettrait d'abord de fabriquer des modules d'immunoessais portatifs dont la mise en place et l'utilisation serait simplifiées. La possibilité de visualiser l'AO-ECL avec la caméra du téléphone portable ouvre des perspectives sur une accessibilité de la mesure et du traitement du signal AO-ECL car ils pourraient être réalisés directement par le patient à l'aide de la caméra de son téléphone et d'une application mobile. Ensuite, l'AO-ECL du couple $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPrA}$ permettrait de réaliser de l'imagerie de cellules uniques, d'organites ou de tissus. L'électrode étant libérée de toute connexion par des fils, elle pourrait être miniaturisée et positionnée dans des zones spécifiques dans le substrat. Pour cela, il faudrait concevoir une électrode avec par exemple plusieurs couches qui apporteraient un V_{oc} sous illumination supérieur au potentiel d'oxydation $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ qui est d'environ 1 V. L'AO-ECL offrant un contrôle de l'ECL exclusivement par la lumière incidente, une autre approche intéressante serait de relier la durée de l'illumination à l'échelle de temps de l'évènement ECL unique.

