

Imagerie multi-échelle : de l'électrochimie à la biologie

Neso Sojic

Résumé

« Voir » l'infiniment petit est un rêve très ancien qui se réalise progressivement depuis une à deux décennies. Cet article présente de nouvelles approches en physico-chimie analytique permettant de sonder simultanément à distance les échelles micro- et nanométriques, et aussi de relier les informations recueillies à ces deux longueurs fondamentales. En effet, malgré la course indispensable et souvent effrénée vers le « nano », de nombreux processus ou questions en chimie, physique ou biologie demeurent à l'échelle micrométrique/submicrométrique. L'approche des auteurs repose sur l'élaboration de nanocapteurs à partir de faisceaux ordonnés de fibres optiques. A partir de ce matériau initial, différents réseaux haute densité de nanocapteurs fonctionnant en parallèle et permettant d'acquérir une grande quantité d'informations de nature électrochimique et/ou optique ont été développés. Il s'agit d'une part de réseaux de nanocapteurs électrochimiluminescents pour la bioanalyse, et d'autre part de réseaux de nanosondes pour la microscopie à champ proche optique. Les atouts de cette approche d'imagerie à distance offrent l'opportunité d'explorer des environnements complexes dans leur globalité. Une première application porte sur l'étude de la dynamique d'un processus électrochimique tel que la formation de gradients de concentration s'établissant au niveau d'une couche de diffusion. Une autre facette de ce travail est orientée vers l'imagerie *in vivo* des cellules formant la peau humaine.

Mots-clés

Nanofabrication, faisceau de fibres optiques, réseaux de nanocapteurs, électrochimiluminescence, champ proche optique, cornéocytes.

Abstract

Multi-scale imaging: from electrochemistry to biology

Visualizing events at the ultimate scale of molecules is an ancient dream that has become true over the last one or two decades. In this review, some new approaches in analytical physico-chemistry which allow probing remotely and simultaneously the micrometer and the nanometer scales are presented. In addition, the information collected at these two fundamental lengths is inter-related. Indeed, despite the rush towards the « nano », several essential issues remain to be understood at the micrometer/submicrometer scale in chemistry, physics and biology. The author's approach is based on the fabrication of nanosensors using coherent optical fiber bundles. From this starting material, different high-density arrays of nanosensors have been developed, allowing collecting a large amount of electrochemical and/or optical information. Electrochemiluminescent nanosensor arrays have thus been developed for the bioanalytical chemistry field. Furthermore, nanoprobe arrays for near-field optical microscopy have been fabricated. This global remote imaging approach allows investigating complex phenomena, such as the dynamics of concentration gradients or the generation mechanism of electrochemiluminescent species. Another typical application is focused on the *in vivo* imaging of skin cells.

Keywords

Nanofabrication, optical fiber bundle, nanosensor arrays, electrochemiluminescence, near-field optics, corneocytes.

La chimie analytique a été classiquement orientée vers l'étude d'échantillons homogènes du point de vue spatial. Cependant, pour approfondir la compréhension de nombreux phénomènes physico-chimiques et biochimiques, il est progressivement devenu fondamental d'étudier la dynamique des événements se produisant à l'échelle micrométrique ou nanométrique. La détection sélective résolue en temps de flux chimiques locaux impliquant des femtomoles, voire des attomoles, est ainsi devenue un enjeu essentiel dans de nombreux domaines : biologie cellulaire, neurobiologie, catalyse, corrosion, microélectronique, etc. Ces besoins pressants ont alimenté la miniaturisation des outils de mesure, jusqu'à atteindre la taille nanométrique pour certains. Cette évolution permet d'obtenir une résolution spatiale adéquate et d'analyser finement des volumes confinés. Par ailleurs, elle ouvre la voie à la mesure d'un nombre infime de molécules dans des

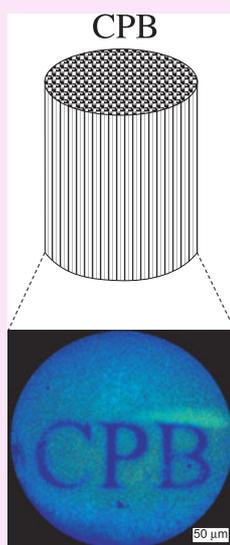
environnements souvent complexes. Pour conserver une vision complète de l'ensemble du processus, deux approches peuvent alors être suivies : soit effectuer une mesure locale et la répéter en différents points pour explorer l'ensemble de l'échantillon, soit développer des réseaux de nanocapteurs pouvant fournir directement « l'image chimique » globale.

L'esprit de cette recherche est orienté vers le développement de nouvelles approches analytiques combinant l'extrême richesse des outils, des concepts, et des techniques de l'électrochimie, de l'imagerie et de l'optique. Cette dualité se révèle féconde et ouvre les portes à de multiples applications en bioanalyse. Comme l'optique, l'électrochimie est une science aux multiples facettes permettant de l'utiliser à la fois comme principe de détection, mais aussi par exemple comme outil de nanofabrication.

Encadré 1

Le faisceau de fibres optiques

Un faisceau de fibres optiques est constitué de plusieurs milliers de fibres optiques individuelles (également appelées cœurs). Chaque cœur est entouré d'une gaine optique pour transmettre la lumière par réflexion totale interne. Leur arrangement ordonné d'une extrémité à l'autre du faisceau permet de transmettre une image sans déformation avec une résolution micrométrique. La *figure* ci-contre, qui illustre les performances de résolution spatiale et de transmission d'image, montre l'image d'un faisceau de 6 000 cœurs de 1,5 microns de rayon. Ce type d'objet est couramment utilisé en endoscopie ou comme éléments d'optique. Les propriétés de tels faisceaux de fibres optiques ont été exploitées, notamment par le groupe de David R. Walt, pour développer des réseaux de capteurs fluorescents ainsi que pour mettre au point des nez artificiels et des biopuces à ADN (www.illumina.com).



Nous en présentons quelques aspects marquants dans cet article en passant de l'électrochimie à la biologie.

Réseau de nanocapteurs : applications à l'imagerie électrochimiluminescente

L'électrochimiluminescence (ECL ou luminescence électrogénérée) peut être considérée comme le fruit du mariage intime et réussi entre les propriétés électrochimiques et spectroscopiques d'un luminophore [1]. En fait, l'ECL est l'émission lumineuse qui a été initiée par un transfert électronique se produisant directement à la surface de l'électrode. Cette technique est très performante et couramment employée dans des configurations variées pour détecter de nombreux composés : le peroxyde d'hydrogène, l'oxalate, des alcaloïdes, des antibiotiques, etc. [2-4]. Différents complexes de ruthénium comportant des ligands bipyridine modifiés sont utilisés commercialement comme marqueurs ECL de biomolécules. Les applications les plus importantes sont tournées vers le diagnostic médical, tels l'immunodosage et les biopuces à ADN. Le succès de cette technique est lié à ses nombreux avantages : simplicité d'utilisation en routine, génération *in situ* du réactif, sensibilité, faible coût et stabilité. De plus, ces marqueurs ECL peuvent être détectés

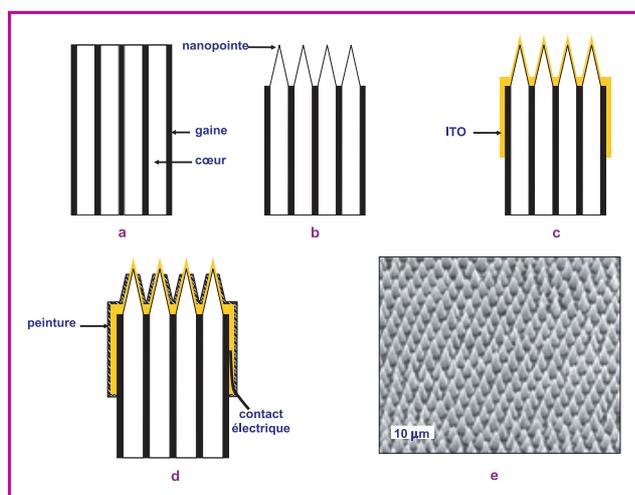


Figure 1 - (a-d) : étapes de fabrication du réseau de nanocapteurs ECL ; (e) : image obtenue en microscopie électronique à balayage de la surface du réseau final.

à des concentrations subpicomolaires avec un domaine de linéarité s'étendant sur plus de six ordres de grandeur.

Dans cet ordre d'idées, nous avons développé un réseau haute densité de nanocapteurs ECL en nous inspirant des méthodes de fabrication des nanoélectrodes et des sondes pour la microscopie en champ proche optique [5-6]. Le matériau initial est un faisceau de fibres optiques (*figure 1a*) dont le cœur et la gaine optique sont formés de silice dopée respectivement par GeO_2 et F afin d'introduire une légère variation d'indice de réfraction (3,5 %) [7-8]. Les différentes étapes de fabrication schématisées sur la *figure 1* permettent de modeler ce matériau afin de lui conférer de nouvelles propriétés. Tout d'abord, en jouant sur la différence de vitesse de dissolution du cœur et de la gaine dans une solution tamponnée de HF, un réseau de nanopointes peut être obtenu (*figure 1b*) [9-10]. La surface du réseau est ensuite recouverte par pulvérisation cathodique radiofréquence avec un semi-conducteur transparent, l'ITO⁽¹⁾ (*figure 1c*). Cet oxyde est un bon matériau d'électrode pour cette application étant donné qu'il est transparent dans le visible et stable au potentiel relativement élevé requis pour induire l'émission ECL. Enfin, en adaptant un procédé électrochimique utilisé pour fabriquer des nanoélectrodes [5, 11], l'ensemble de la surface est isolé par une peinture électrophorétique isolante à l'exception de l'apex (ou extrémité) des nanopointes (*figure 1d*). La *figure 1e* montre l'image enregistrée par microscopie électronique à balayage de la surface finale du réseau de nanocapteurs. L'ensemble de ces étapes conserve l'architecture ordonnée du faisceau initial de fibres optiques ; en d'autres termes, chaque nanocapteur est relié optiquement à la fibre optique sous-jacente [12].

Le réseau de nanocapteurs a été caractérisé par microscopie à force atomique (AFM) à pointe conductrice (*figure 2*). Cette technique permet d'acquérir l'image topographique classique obtenue avec un AFM et simultanément l'image de la résistance de contact locale de la même surface. La *figure 2a* représente l'image topographique d'une partie du réseau de nanocapteurs (80 x 80 µm) ; on peut y voir une structure régulière tout à fait similaire à celle observée préalablement par microscopie électronique à balayage (*figure 1e*). Le point le plus important est que la distribution spatiale des zones électroactives est clairement visible (*figure 2b*). Les zones sombres correspondent à des zones de plus faible résistance, donc aux sites électroactifs où l'ITO n'a pas été recouvert par la peinture isolante. Cette répartition spatiale correspond parfaitement à l'architecture du réseau de nanopointes observées par AFM. Les résultats fournis par

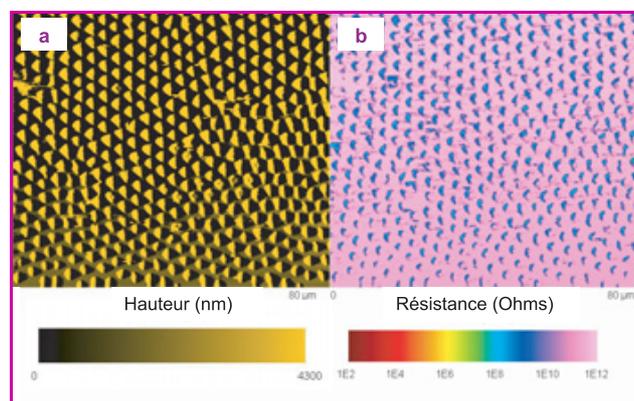


Figure 2 - Images (a) topographique et (b) électrique réalisées au niveau de la même région du réseau de nanocapteurs.

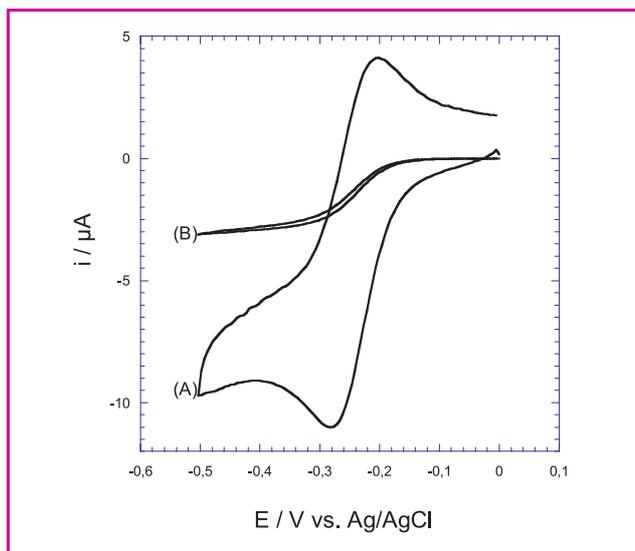


Figure 3 - Voltammogrammes cycliques du réseau de nanopointes d'ITO enregistrés avant (A) et après (B) le dépôt isolant de peinture électrophorétique.

La solution de mesure contient 5 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ et 1 M Na_2SO_4 .

cette méthode sont essentiels puisqu'elle démontre que la totalité des capteurs est opérationnelle.

Afin de caractériser les propriétés électrochimiques de notre réseau, nous avons utilisé la voltamétrie cyclique qui peut fournir des informations qualitatives et quantitatives. La figure 3 montre les voltammogrammes cycliques du réseau de nanopointes d'ITO réalisés, dans une solution de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, avant (A) et après (B) le dépôt de peinture isolante. Avant l'étape d'isolation électrophorétique, on observe le signal transitoire classique d'une macroélectrode. Ce résultat montre également que le film ITO déposé par pulvérisation cathodique radiofréquence possède d'excellentes propriétés électrochimiques. Après le dépôt de la peinture isolante, la forme ainsi que l'amplitude du signal voltamétrique sont modifiées. La forme sigmoïdale indique que les couches de diffusion individuelles ne se recouvrent pas ou de façon négligeable, et que l'on peut donc considérer les nanocapteurs comme étant indépendants du point de vue diffusionnel [13]. En supposant que tous les capteurs aient la même géométrie hémisphérique, le courant quasi stationnaire est directement relié à la valeur moyenne du rayon apparent d'un seul capteur. D'après la valeur du courant de plateau détecté, on peut calculer un rayon apparent d'un capteur de l'ordre de 300 nm.

Ce réseau de capteurs offre la possibilité d'initier l'émission ECL et, de façon concomitante, de détecter à distance la lumière transmise avec une résolution micrométrique [12]. L'ECL est générée localement au niveau de l'apex de la nanopointe et est transmise par le film transparent d'ITO (figure 4a). La lumière est ensuite guidée dans chaque cœur par réflexion totale interne jusqu'à la face proximale où son intensité est mesurée avec une caméra CCD⁽²⁾ [14]. Les performances analytiques de ce réseau de nanocapteurs ECL ont été testées avec un système ECL modèle et sont résumées sur la figure 4. Le couple $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}^{(3)}$ offre de nombreux avantages analytiques et est commercialisé pour le diagnostic clinique. En augmentant la concentration de co-réactif, l'émission ECL détectée par la caméra CCD est bien plus intense (figure 4c-d).

On observe également que l'intensité ECL de l'ensemble des nanocapteurs est mesurée simultanément à un temps donné avec une seule image. Cela montre donc que l'imagerie ECL est réalisée à distance *via* le faisceau de fibres optiques [14]. Les nanocapteurs du réseau ne sont pas adressables individuellement du point de vue électrochimique. Cependant, comme l'ECL est optiquement liée au cœur optique et que le faisceau est ordonné, les nanocapteurs sont lisibles individuellement et chacun d'entre eux sonde un environnement différent. La courbe d'étalonnage démontre la validité quantitative de cette approche ECL. De plus, ce réseau nanostructuré conserve toutes ses propriétés d'imagerie en lumière blanche [14-15] ; en d'autres termes, il est possible de « voir » simultanément l'image ECL et l'image en lumière blanche (ou par fluorescence) de l'échantillon étudié. Notre équipe travaille actuellement sur les applications bioanalytiques de ces réseaux dans les domaines des biocapteurs enzymatiques et des biopuces à ADN.

Réseaux de nanosondes pour la microscopie à champ proche optique

Depuis une à deux décennies, le rêve très ancien de pouvoir explorer l'infiniment petit se réalise progressivement et modifie certaines représentations classiques que nous avons faites nôtres. Les développements de nouvelles approches fondées sur le champ proche optique constituent une voie d'accès privilégiée pour explorer et manipuler le « nanomonde ». En effet, à l'échelle du nanomètre, la lumière se joue des lois de l'optique classique et possède un comportement relativement exotique. Par exemple, elle s'incurve au voisinage des bords des objets et peut même s'enrouler autour de ces objets en y adhérant par l'intermédiaire d'ondes évanescentes [16]. L'idée conceptuellement simple

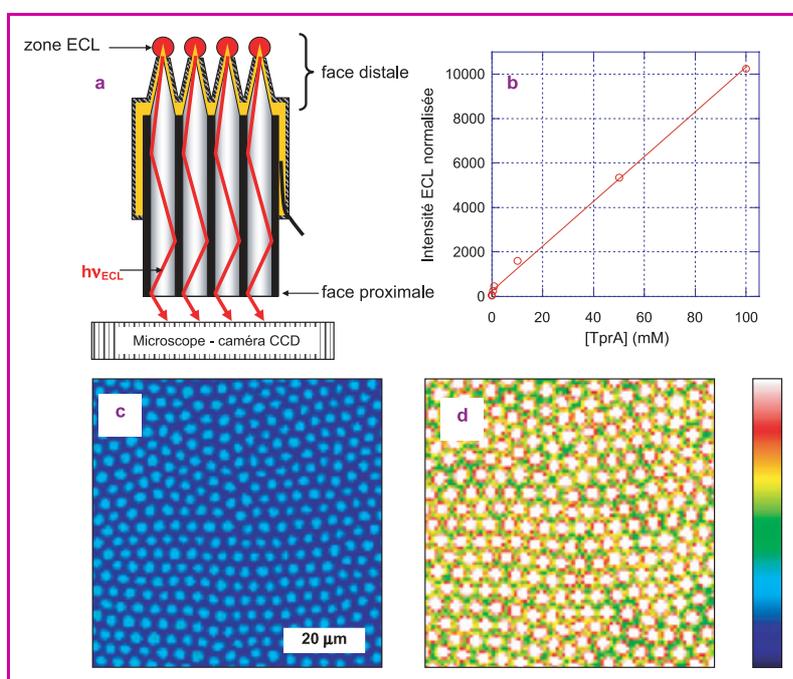


Figure 4 - (a) : schéma montrant l'ECL générée par le réseau de nanocapteurs et qui est transmise *via* le faisceau cohérent de fibres optiques ; (b) : évolution de l'intensité ECL en fonction de la concentration en TPrA dans une solution contenant également 1 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Images ECL enregistrées à travers le faisceau de fibres optiques dans une solution de 1 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et (c) 10 mM TPrA ou (d) 100 mM TPrA. La couleur blanche symbolise les intensités lumineuses plus importantes. Potentiel imposé aux réseaux d'électrodes : $E = 1,2 \text{ V/Ag}$.

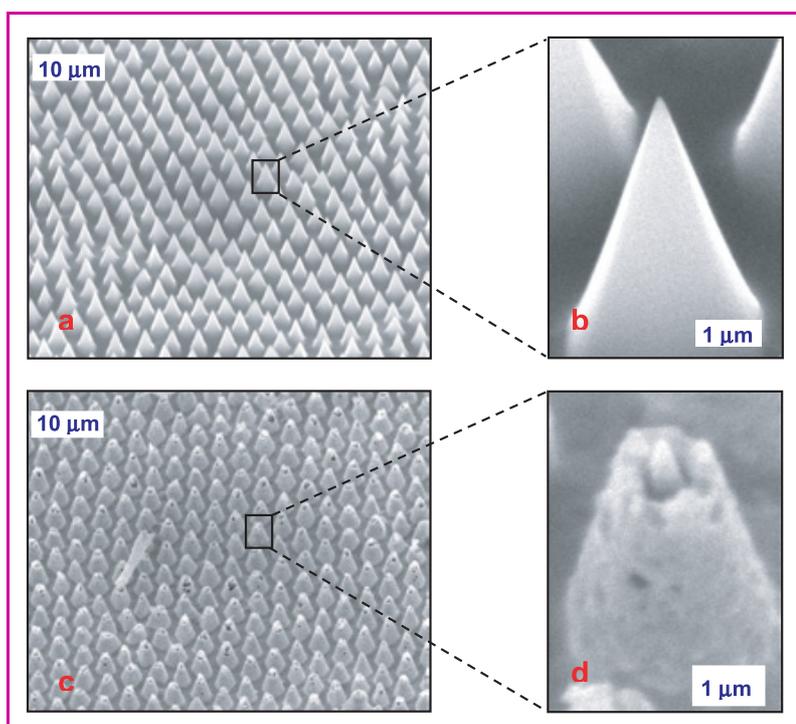


Figure 5 - Images obtenues en microscopie électronique à balayage de réseaux de nanosondes optiques sans ouverture (a-b) et avec ouverture (c-d) à différents grossissements.

pour atteindre une résolution suffisante est de confiner soit la perturbation, soit la collection de l'information au niveau nanométrique. Parmi les nombreuses méthodes développées dans ce but, la microscopie à champ proche optique est une technique puissante qui permet de « voir » des détails en s'affranchissant du critère de diffraction de Rayleigh (typiquement 300 nm dans le spectre visible) [17] : il devient ainsi possible d'acquérir des informations optiques et spectroscopiques à l'échelle nanométrique [18]. Cette microscopie utilise une nanosource lumineuse ou un nano-détecteur (suivant le mode de détection choisi) qui est placé à proximité immédiate de la surface de l'échantillon. Parmi les différentes configurations utilisées, les deux plus répandues sont basées sur des fibres optiques dont l'apex est compris entre ~ 20 et 200 nm. Dans le premier cas, la sonde est sans ouverture et il s'agit d'une pointe de structure souvent métallique [19-20] ; l'exaltation du champ se produit alors à l'extrémité de la pointe. La résolution est principalement liée à la valeur du rayon de courbure de la pointe. Dans le second cas, une ouverture de dimension sub-longueur d'onde est créée à l'apex de la fibre optique. Pour fabriquer une telle source, les côtés d'une fibre optique préalablement étirée sont recouverts par un métal réfléchissant (aluminium ou or) afin de confiner la lumière provenant d'un laser au niveau de l'ouverture optique de dimension nanométrique formée à l'extrémité de la fibre [17]. La lumière émanant d'une telle nano-ouverture va interagir fortement avec la matière située à proximité immédiate, dans son champ proche, avant que les effets liés à la diffraction ne dégradent la résolution spatiale. Les phénomènes d'exaltation locale qui en résultent sont notamment utilisés pour explorer ces objets à l'échelle nanométrique. La résolution latérale dépend du degré de confinement de la lumière et est donc fonction de la dimension de la nano-ouverture et de la distance entre la sonde et la surface de l'échantillon. Cette microscopie se caractérise donc essentiellement par l'exploitation des

propriétés non propagatives de la lumière ; un point essentiel étant cependant la conversion de l'onde évanescente codant l'information nanométrique en onde détectée en champ lointain.

En s'inspirant des méthodes de fabrication des nanoélectrodes et des nanosondes optiques, nous avons réalisé deux types de réseaux ordonnés [21-22]. Le réseau de nanosondes sans ouverture (figure 5a-b) est préparé par dissolution chimique sélective du faisceau cohérent de fibres optiques. Le rayon de courbure de chaque nanopointe optique est inférieur à 50 nm [10] et chaque nanopointe correspond à un cœur optique. Pour le réseau de nano-ouvertures (figure 5c-d), les étapes sont en partie similaires à celles employées pour préparer le réseau de nanocapteurs ECL décrit précédemment. Cependant, une première différence fondamentale réside dans le choix du matériau conducteur : à la place de l'ITO, une couche d'or est déposée par pulvérisation cathodique. En changeant de métal, on modifie complètement les propriétés optiques. En effet, l'or est un matériau réfléchissant (épaisseur de peau pour la lumière visible ~ 30 nm [23]), permettant de confiner la lumière excitatrice qui est alors guidée dans chaque cœur jusqu'à l'apex de la nanopointe. La dernière étape de fabrication est la formation de la nano-ouverture par attaque chimique ou électrochimique de l'apex (figure 5c-d) [22]. Le résultat final est visible sur la figure 5d. Une nano-ouverture est constituée de l'apex de la nanopointe qui est entouré par un manteau d'or et de la peinture électrophorétique. En jouant sur les conditions de fabrication, nous avons pu également moduler la taille moyenne des nano-ouvertures entre 95 et 270 nm dans un réseau donné [15].

Les propriétés optiques de ces réseaux de nano-sondes ont été caractérisées en champ lointain pour les polarisations P (polarisation parallèle au plan d'analyse) et S (polarisation perpendiculaire au plan d'analyse). L'intensité transmise par le réseau est mesurée en fonction de l'angle d'incidence θ d'un laser polarisé linéairement (figure 6a) [22]. En faisant tourner la polarisation du laser, on accède à des informations sur l'anisotropie dans l'émission d'un réseau de nanosondes. La dépendance angulaire de l'intensité normalisée détectée en champ lointain est représentée sur la figure 6b en polarisation P pour des réseaux de différentes nanosondes. Pour les nanosondes sans ouverture, le profil est relativement étroit. Par contre, nous observons une évolution différente suivant le rayon des nano-ouvertures : lorsque leur rayon diminue, le profil tend à s'élargir. Ce comportement est caractéristique d'un objet dont la dimension est inférieure à la longueur d'onde. En fait, chaque nano-ouverture diffracte la lumière transmise. Une autre propriété importante concerne la transmission aux grands angles : on constate que pour $\theta > 40^\circ$, l'intensité transmise est d'autant plus grande que le rayon des ouvertures est faible [24]. Par ailleurs, l'allure lisse et la symétrie du profil angulaire montrent que la distribution de taille des nano-ouvertures varie peu autour d'une valeur moyenne dans un même réseau. La forme de la courbe est très sensible à la qualité du film d'or. En effet, des défauts dans celui-ci et donc des « fuites » se révéleraient par un profil d'émission irrégulier. Ce résultat est corroboré par les images obtenues par microscopie électronique à balayage et par AFM à pointe conductrice (données non présentées) [24-25].

Connaissant la longueur d'onde, il est possible de caractériser les propriétés optiques et de déterminer le rayon de la nano-ouverture optique jusqu'à une valeur limite de $\lambda/6$ [26].

Les largeurs à mi-hauteur des profils angulaires varient en fonction de la taille de l'ouverture. Les valeurs estimées à partir des données en champ lointain sont en très bon accord avec les valeurs moyennes obtenues par microscopie électronique à balayage [24]. La caractérisation en champ lointain de ces réseaux a montré que les sondes étaient indépendantes du point de vue optique [24] ; en d'autres termes, chaque élément du réseau peut sonder un nano-environnement différent [27]. Comme l'information collectée par l'ensemble des 6 000 sondes peut être lue simultanément *via* le faisceau avec une caméra CCD, cette approche en réseaux permet donc d'acquérir une information optique et spectroscopique résolue simultanément à l'échelle nanométrique et à l'échelle micrométrique [28]. Ces caractéristiques sont particulièrement bien adaptées pour l'étude *in vivo* d'échantillons biologiques, cellules et structures multicellulaires. En effet, étant donné la taille typique de ces éléments, il est précieux de pouvoir sonder et relier les informations recueillies à ces deux échelles caractéristiques.

« Voir » la dynamique d'une couche de diffusion plane

Un grand nombre de processus en chimie et en biologie sont contrôlés par la direction et la forme des gradients de concentration de molécules actives. Par exemple, en neurobiologie, l'orientation de gradient de concentration d'espèces chimiotactiques (NGF⁽⁴⁾, AMPc⁽⁵⁾, Ca²⁺, etc.) guide la navigation axonale jusqu'à des récepteurs spécifiques lors du développement du système nerveux. De même, l'efficacité de la transmission neuronale au niveau des synapses est intimement contrôlée par les flux locaux de neurotransmetteurs et par le confinement spatial de ces vecteurs de l'information [29-30]. Une autre illustration de l'importance de pouvoir mesurer les profils de concentration se retrouve tout naturellement en électrochimie. En effet, le courant faradique reflète la valeur du gradient de concentration de l'espèce électroactive au voisinage de la surface de l'électrode.

La grande majorité des méthodes de mesure de profils de concentration est basée sur des techniques d'analyse locale, telles que la microscopie électrochimique à balayage (SECM) ou la microscopie Raman confocale [31-33]. L'approche que nous avons suivie permet de « voir » la dynamique de gradients de concentration se développant au voisinage d'une macroélectrode. Son principal intérêt est de fournir instantanément une image globale de la couche de diffusion. Cette approche repose sur l'utilisation d'un faisceau poli de fibres optiques. L'idée de base est de positionner le faisceau perpendiculairement à la surface de l'électrode [34]. Le faisceau sert à exciter la photoluminescence⁽⁶⁾ d'une solution contenant Ru(bpy)₃²⁺ en plus d'un électrolyte support. Une fraction de la lumière émise est collectée par le même faisceau avant d'être visualisée par un microscope épifluorescent équipé d'une caméra CCD. Ainsi, chaque fibre individuelle sonde localement la concentration de cette espèce photoluminescente, sans interférer avec la diffusion plane des espèces. Lorsqu'un potentiel de 1,2 V/Ag est appliqué à la macroélectrode (valeur correspondant au palier limite de diffusion), Ru(bpy)₃²⁺ est oxydé en Ru(bpy)₃³⁺, générant ainsi une espèce non luminescente. En suivant les variations locales de la photoluminescence, il devient alors possible de cartographier la distribution spatiale de Ru(bpy)₃²⁺.

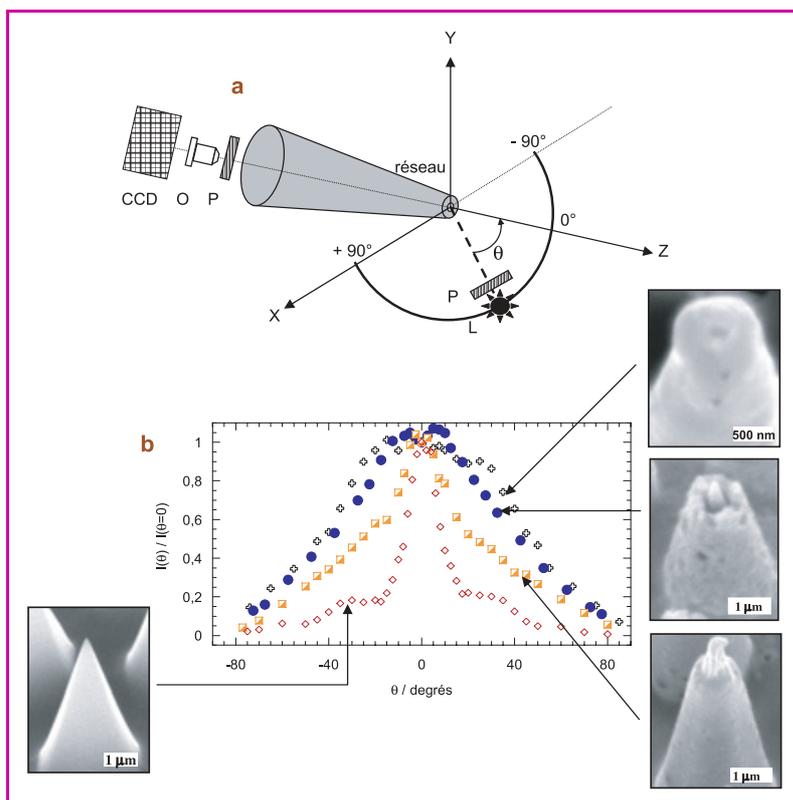


Figure 6 - (a) : montage expérimental de caractérisation en champ lointain. Le réseau de nanosondes est situé à l'origine des axes ; (b) : profil angulaire de l'intensité normalisée transmise par des réseaux de nanosondes optiques sans et avec ouvertures.

Les mesures ont été réalisées en polarisation P. L : laser He-Ne ; P : polariseur ; O : objectif ; CCD : caméra CCD.

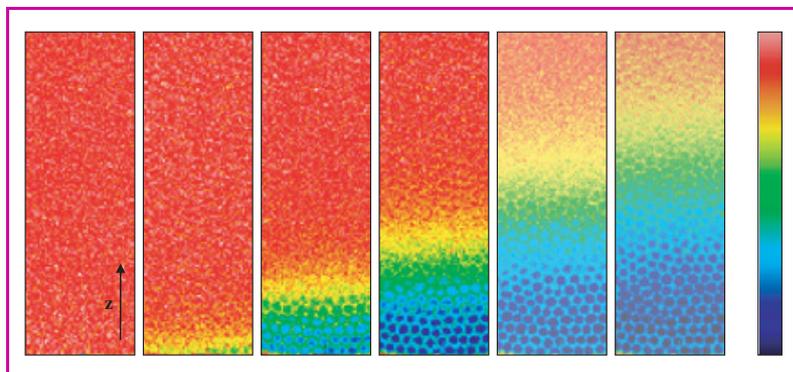


Figure 7 - Séquence d'images normalisées enregistrées *via* le faisceau de fibres optiques à différents temps (0 ; 0,05 s ; 0,1 s ; 0,2 s ; 0,4 s et 0,8 s) permettant de visualiser la dynamique d'une couche de diffusion plane par photoluminescence.

La figure 7 montre une séquence d'images normalisées de photoluminescence collectées *via* le faisceau de fibres optiques [34]. Chaque image représente le profil de photoluminescence qui est enregistré pendant 10 ms ; cette valeur correspond au temps minimal d'exposition de la caméra CCD. L'intensité de photoluminescence est plus faible au voisinage de la surface de l'électrode, zone où Ru(bpy)₃²⁺ est consommé. Sur cette séquence, on peut voir clairement que cette « vague de diffusion » se propage au cours du temps en s'éloignant de la surface de la macroélectrode vers le sein de la solution. Les profils de photoluminescence peuvent ainsi être enregistrés à un instant donné et corrélés aux profils de concentration.

Un bon accord est observé aux différents temps entre les profils théoriques et expérimentaux, sauf au voisinage immédiat de l'électrode (figure 8). En effet, un écart significatif existe pour des distances de quelques microns. Cette divergence est observée aux différents temps et s'accroît pour les temps plus longs. En se basant sur l'évolution de l'écart expérience/théorie, nous avons pu montrer qu'il s'agissait probablement d'un effet dynamique de filtre interne primaire (lié à l'absorbance du milieu à la longueur d'onde d'excitation). L'ensemble de ces résultats permet de valider notre approche d'imagerie globale de profils de concentration au voisinage d'une interface électrochimique. Une voie que nous souhaitons explorer à l'avenir concerne la détection indirecte par fluorescence d'une espèce non fluorescente [35] mais dont les propriétés d'absorption varient en fonction de l'état redox (en jouant donc sur l'effet de filtre interne).

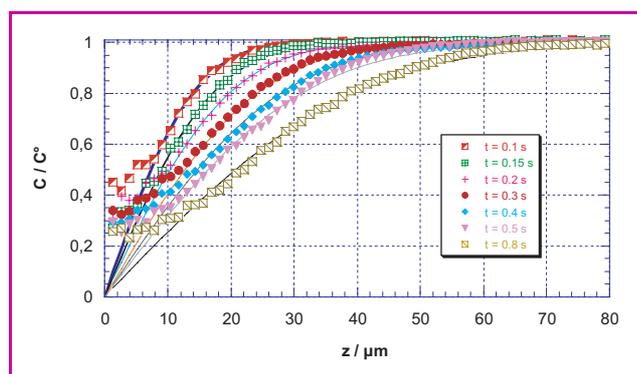


Figure 8 - Comparaison des profils expérimentaux de photoluminescence et des profils théoriques de concentration de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (traits pleins) après l'application du saut de potentiel.

Imagerie *in vivo* de cornéocytes formant le *stratum corneum* humain

Le *stratum corneum* est la couche la plus externe de la peau. Son rôle est d'être une barrière ultime entre le milieu vivant et son environnement, et donc de contrôler les échanges indispensables à cette interface. Il doit limiter l'évaporation de l'eau à partir de l'épiderme et empêcher également la pénétration de xénobiotiques⁽⁷⁾ à l'intérieur de l'organisme. Cette fonction de barrière est fondamentale pour se défendre contre l'extérieur et maintenir l'homéostasie⁽⁸⁾

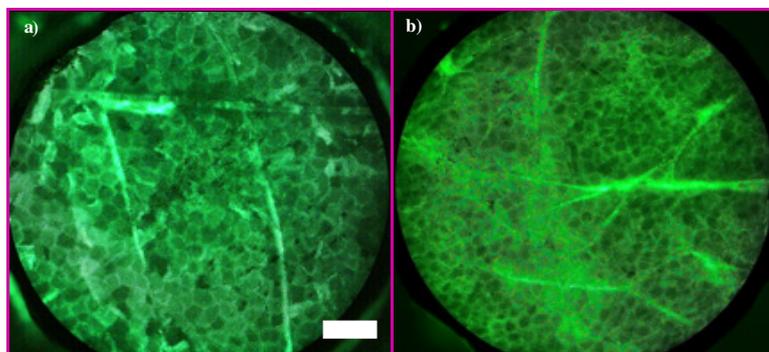


Figure 9. Image épifluorescente d'une centaine de cornéocytes de l'épiderme humain obtenue à distance par un faisceau de fibres optiques sur l'avant-bras de deux personnes âgées de (a) 64 et (b) 22 ans. Les cellules ont été marquées préalablement par la fluorescéine. Barre blanche : 100 μm .

[36]. Le *stratum corneum* est composé de cellules différenciées appelées cornéocytes. Suite à la desquamation, ces cellules sont constamment renouvelées par différenciation à partir de l'épiderme. De nombreux paramètres influent sur leur taille : exposition au soleil, âge, maladies de peau, produits cosmétiques, médicaments. De plus, la taille des cornéocytes peut être utilisée comme un marqueur d'inflammation [37]. Pour l'ensemble de ces raisons, la mesure de la dimension de ces cellules constitue un enjeu important en dermatologie et en cosmétique.

Dans ce but, nous avons développé une nouvelle méthode d'imagerie *in vivo* à distance des cornéocytes directement sur la peau humaine [38-39]. La peau est traitée par une solution contenant de la fluorescéine ; ce fluorophore a été choisi car son usage externe est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Le faisceau de fibres optiques a été poli préalablement et ses propriétés ont été utilisées pour réaliser l'imagerie épifluorescente de cellules de la peau ainsi marquées. Notre approche exploite la distance de focalisation extrêmement faible (de l'ordre du champ proche optique) des fibres optiques choisies. En l'occurrence, seule la monocouche de cornéocytes la plus externe qui est en contact direct avec l'environnement est visualisée. La mesure s'effectue en mode contact en approchant le faisceau modifié de fibres optiques contre la surface de la peau humaine marquée. Une image obtenue par épifluorescence est enregistrée *via* le faisceau à l'aide d'un microscope équipé d'une caméra CCD (figure 9) [38]. Le temps de mesure est de quelques centaines de millisecondes. Sur ces images, on peut clairement visualiser la forme relativement pentagonale caractéristique des cornéocytes constituant le *stratum corneum* et leur organisation régulière. Le microrelief et différentes microstructurations de la peau sont également visibles. À l'aide de cette méthode de diagnostic, on peut facilement visualiser plus d'une centaine de cellules et donc obtenir une information statistique représentative de l'état local du *stratum corneum* chez une personne. Par exemple, la taille moyenne des cornéocytes mesurée sur deux personnes diffère fortement en fonction de l'âge (figure 9) : en vieillissant, elle augmente de près de 50 %. Des essais similaires ont également été effectués sur des prélèvements constitués d'une monocouche de cornéocytes marqués. Les résultats obtenus sont tout à fait équivalents et permettent de valider cette nouvelle approche de bio-imagerie *in vivo* [38-39]. Les avantages de la méthode sont nombreux : rapide, non toxique, indolore, non invasive et non destructive.

Conclusion

La mise en œuvre de nouvelles approches analytiques permet d'aborder l'étude de processus ou d'échantillons complexes, tels que les cellules vivantes. Les avancées récentes reposent pour une large part sur la miniaturisation et sur une convergence pluridisciplinaire. Dans cet article, nous avons essayé d'illustrer ce propos par certains de nos travaux s'inscrivant dans cette dualité féconde en montrant le cheminement indissociable (s'il était encore besoin de le rappeler) depuis la recherche fondamentale jusqu'à la recherche applicative. La combinaison de l'électrochimie et de l'optique permet ainsi de fabriquer de nouveaux outils hybrides nanostructurés qui tirent parti de leur architecture et de leur dimension pour offrir des solutions originales, notamment pour la bio-imagerie. Ces approches sont maintenant suffisamment matures pour aborder des études au niveau du Vivant.

Remerciements

Cet article est basé sur les recherches menées par des étudiants et des chercheurs post-doctorants en collaboration avec de nombreuses équipes. Je les remercie pour leur travail et leur apport essentiel à cet article. Nous remercions également le Ministère de la Recherche, le programme ACI Jeunes Chercheurs, le programme ANR Nanosciences et Nanotechnologies, la Région Aquitaine, L'Oréal et l'ENSCP, pour leur soutien financier.

Notes et références

- (1) ITO : oxyde d'indium et d'étain, « indium tin oxide ».
- (2) Une caméra CCD est l'équivalent numérique du boîtier photographique. La surface sensible n'est pas un film, mais une puce, une « matrice CCD » (« charge couple device », dispositif à transfert de charges).
- (3) TPra : tripropylamine.
- (4) NGF : « nerve growth factor », facteur de croissance du nerf.
- (5) AMPc : adénosine monophosphate cyclique.
- (6) Nous préférons utiliser le terme photoluminescence qui est plus générique, plutôt que fluorescence ou phosphorescence car l'état émetteur est un mélange d'états triplet et singulet du fait du fort couplage spin-orbite, même si le caractère triplet prédomine.
- (7) Xénobiotique : désigne en général ce qui est étranger à la vie (substance possédant des propriétés toxiques par exemple).
- (8) Homéostasie : maintien à un niveau constant, par les organismes vivants, des caractéristiques internes (température, concentrations des substances, etc.).
- [1] Bard A.J., Faulkner L.R., *Electrochemical methods*, Wiley, New York, **2001**.
- [2] Kuhn L.S., Weber A., Weber S.G., *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, p. 1631.
- [3] Cohen C.B., Weber S.G., *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, p. 169.
- [4] Wang H., Xu G., Dong S., *Electrochem. Commun.*, **2002**, *4*, p. 214.
- [5] Conyers J.L., White H.S., *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, p. 4441.
- [6] Monobe S., Naya M., Saiki T., Ohtsu M., *Appl. Opt.*, **1997**, *36*, p. 1496.
- [7] Chigusa Y., Fujiwara K., Hattori Y., Matsuda Y., *Optoelectronics*, **1986**, *1*, p. 203.
- [8] Khan S.S., Jin E.S., Sojic N., Pantano P., *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *404*, p. 213.
- [9] Pantano P., Walt D.R., *Rev. Sci. Instrum.*, **1997**, *68*, p. 1357.
- [10] Szunerits S., Garrigue P., Bruneel J.-L., Servant L., Sojic N., *Electroanalysis*, **2003**, *15*, p. 548.
- [11] Abbou J., Demaille C., Druet M., Moiroux J., *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, p. 6355.
- [12] Chovin A., Garrigue P., Vinatier P., Sojic N., *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, p. 357.
- [13] Amatore C., *Physical electrochemistry*, I. Rubinstein (ed), Marcel Dekker, New York, **1995**, p. 131.
- [14] Chovin A., Garrigue P., Sojic N., *Electrochim. Acta*, **2004**, *49*, p. 3751.
- [15] Sojic N., Chovin A., Garrigue P., Manek-Hönninger I., Servant L., *Spie Nanotechnology*, **2005**, *5838*, p. 1.
- [16] Tong L., Gattass R.R., Ashcom J.B., He S., Lou J., Shen M., Maxwell I., Mazur E., *Nature*, **2003**, *426*, p. 816.
- [17] Dunn R.C., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, p. 2891.

- [18] Lewis A., Taha H., Strinkovski A., Manevitch A., Khatchatourians A., Dekhter R., Ammann E., *Nature*, **2003**, *21*, p. 1378.
- [19] Fikri R., Barchiesi D., H'Dhili F., Bachelot R., Vial A., Royer P., *Optics Commun.*, **2003**, *221*, p. 13.
- [20] Protasenko V.V., Gallagher A.C., *Nano Letters*, **2004**, *4*, p. 1329.
- [21] Chovin A., Garrigue P., Servant L., Sojic N., *ChemPhysChem*, **2004**, *5*, p. 1125.
- [22] Chovin A., Garrigue P., Manek-Hönninger I., Sojic N., *Nano Lett.*, **2004**, *4*, p. 1965.
- [23] Ohstu M., *Optoelectronics*, **1995**, *10*, p. 147.
- [24] Chovin A., Garrigue P., Pecastaings G., Saadaoui H., Manek-Hönninger I., Sojic N., *Ultramicroscopy*, **2006**, *106*, p. 57.
- [25] Chovin A., Garrigue P., Sallard S., Manek-Hönninger I., Sojic N., *Proc. Opt. Fibre Sens.*, **2005**, *5855*, p. 246.
- [26] Obermüller C., Karrai K., *Appl. Phys. Lett.*, **1995**, *67*, p. 3408.
- [27] Chovin A., Garrigue P., Pecastaings G., Saadaoui H., Sojic N., *Meas. Sci. Technol.*, **2006**, *17*, p. 1211.
- [28] Chovin A., Garrigue P., Sojic N., *Bioelectrochem.*, **2006**, *69*, p. 25.
- [29] Hochstetler S.E., Puopolo M., Gustincich S., Raviola E., Wightman R.M., *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, p. 489.
- [30] Amatore C., Arbault S., Bonifas I., Bouret Y., Erard M., Guille M., *ChemPhysChem*, **2003**, *4*, p. 147.
- [31] Baltes N., Thouin L., Amatore C., Heinze J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, p. 1431.
- [32] Rey I., Bruneel J.-L., Grondin J., Servant L., Lassègues J.-C., *J. Electrochem. Soc.*, **1998**, *145*, p. 3034.
- [33] Amatore C., Bonhomme F., Bruneel J.-L., Servant L., Thouin L., *Electrochem. Commun.*, **2000**, *2*, p. 235.
- [34] Amatore C., Chovin A., Garrigue P., Servant L., Sojic N., Szunerits S., Thouin L., *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, p. 7202.
- [35] Tohda K., Lu H., Umezawa Y., Gratzl M., *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, p. 2070.
- [36] Lévêque J.-L., Corcuff P., *Non invasive methods for the quantification of skin functions*, P.J. Frosch, A.M. Kligman (eds), Springer Verlag, Berlin, **1993**.
- [37] Corcuff P., Lévêque J.-L., *Aging skin*, J.-L. Lévêque, P.G. Agache (eds), Marcel Dekker, New York, **1993**.
- [38] Dromard T., Lévêque J.-L., Sojic N., *J. Biomed. Opt.* (soumis).
- [39] Lévêque J.-L., Sojic N., Patent PCT IB2005/05392, **2005**.



Neso Sojic

est professeur au Laboratoire d'analyse chimique par reconnaissance moléculaire de l'ENSCP* (à partir du 1^{er} janvier 2007 : groupe NanoSystèmes Analytiques de l'Institut des Sciences Moléculaires, UMR CNRS 5255).

Il a reçu le **prix de la division de Chimie analytique en 2005** pour l'ensemble de ses travaux.

* LACReM, ENSCPB, Université Bordeaux 1, 16 avenue Pey-Berland, 33607 Pessac.
Tél. : 05 40 00 24 96. Fax : 05 40 00 27 17.
Courriel : sojic@enscpb.fr

**L'Actualité Chimique vous invite
à visiter son site web**

**Retrouvez la revue dès maintenant
sur <http://www.lactualitechimique.org>**

Découvrez les sciences chimiques à l'interface des sciences de la vie et de la physique.

Consultez les brèves et archives en ligne.