



HAL
open science

Elaboration de Nouveaux Matériaux d'Electrodes obtenus par Autoassemblage de Polyélectrolytes, Nanoparticules et Biomolécules : Etudes physico-chimiques et applications.

Julien Fatisson

► **To cite this version:**

Julien Fatisson. Elaboration de Nouveaux Matériaux d'Electrodes obtenus par Autoassemblage de Polyélectrolytes, Nanoparticules et Biomolécules : Etudes physico-chimiques et applications.. Matériaux. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011154

HAL Id: tel-00011154

<https://theses.hal.science/tel-00011154>

Submitted on 6 Dec 2005

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.

THESE

N° attribué par la bibliothèque

/ _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ /

Présentée par

Julien FATISSON

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1

Spécialité : CHIMIE – PHYSIQUE MOLECULAIRE ET STRUCTURALE

**ELABORATION DE NOUVEAUX MATERIAUX D'ELECTRODES
OBTENUS PAR AUTOASSEMBLAGE
DE POLYELECTROLYTES, NANOPARTICULES ET
BIOMOLECULES :
ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES ET APPLICATIONS.**

Soutenue publiquement le 25 Octobre 2005

Préparée au

Laboratoire d'Electrochimie Organique et Photochimie Redox (UMR UJF-CNRS 5630)

Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (FR CNRS 2607)

Membres du jury :

Pr. Vincent Ball
Dr. Liliane Guérente
Pr. Pierre Labbé
Pr. Eric Peyrin
Dr. Alain Walcarius
Dr. Jean-Claude Moutet

Rapporteur
Co-directrice de thèse
Directeur de thèse
Président du jury
Rapporteur
Directeur du LEOPR

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Electrochimie Organique et de Photochimie Redox, LEOPR, (UMR 5630 CNRS – Université Joseph Fourier Grenoble 1), dirigé par Mr Jean-Claude Moutet, Directeur de recherche au CNRS. Le LEOPR est un laboratoire de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (FR 2607), dirigé par Mr Alain Deronzier, Directeur de recherche au CNRS. Je les remercie vivement de m'avoir accueilli dans le laboratoire et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.

J'aimerais également sincèrement remercier Mr Vincent Ball, Professeur à l'INSERM de Strasbourg (U 595), et Mr Alain Walcarius, Directeur de recherche au Laboratoire de Chimie – Physique et Microbiologie de Nancy (UMR 7564 CNRS – UHP Nancy 1), pour avoir accepté, en tant que rapporteurs, d'examiner et de juger ce travail.

Je remercie aussi Mr Eric Peyrin pour avoir accepté de présider le jury, ainsi que les autres membres du jury pour avoir participé à l'examen de ce travail.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude à Mr Pierre Labbé, Professeur au LEOPR, équipe Physico-Chimie des Interfaces, qui a dirigé cette thèse et sans qui tout ce travail n'aurait pu être mené. Sa grande disponibilité, son savoir scientifique, sa rigueur, son esprit d'analyse m'ont permis d'acquérir des compétences dans plusieurs domaines. Je tiens à insister (et à le remercier pour cela) sur le soutien qu'il m'a apporté durant ces trois années lors desquelles nous avons partagé de très (et parfois moins) bons moments.

Je voudrais particulièrement remercier Mme Liliane Guérente, Maître de conférences au LEOPR, pour avoir co-dirigé ces travaux. Sa gentillesse, son enthousiasme et ses compétences m'ont vraiment aidé à avancer, durant cette période, dans les travaux de recherche que nous avons pu mener ensemble.

Quiero agradecer mucho a Sr Gustavo Rivas, de la Universidad nacional de Cordoba, para su ayuda, su amabilidad durante los seis meses que hice en Cordoba y por haberme enseñado muchísimas cosas. En el mismo tiempo, quisiera agradecer a todo su grupo para su acogida y especialmente a Dolo por haberme ayudado mucho en este trabajo cordobés y a Marce para su alegría, durante esta época lejos de Francia.

Le travail que j'ai réalisé en Argentine n'aurait pu avoir lieu sans l'aide de la Région-Alpes, que je remercie de m'avoir octroyé une bourse dans le cadre du programme Eurodoc.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LEOPR et tous les gens qui sont passés dans le laboratoire (chercheurs, thésards, post-doc, étudiants, techniciens, secrétaires, etc.) pour leur aide et pour tous les bons moments passés en leur compagnie. La liste est longue (voir le site web du LEOPR) et je ne veux oublier personne, alors un grand merci à tous...

Merci au capitaine Bruno Galland pour l'aide et les connaissances qu'il m'a apporté en synthèse organique. Je ne peux oublier Christophe Bucher qui, lui aussi, m'a aidé pendant la synthèse et pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci à Cheikh pour son aide et sa participation dans ces travaux.

Merci aussi à l'ensemble des gens de l'Université de Savoie qui m'ont aidé et avec qui j'ai enseigné. Merci à mes étudiants passés pour leur attention et pour m'avoir permis d'acquérir une agréable expérience en tant que moniteur. Je tiens aussi à remercier le personnel du CIES pour le poste de moniteur et pour l'aide qu'ils m'ont apporté durant ces trois ans.

En parlant de bons moments, merci au P'tit Gars (à qui je souhaite bonne chance pour son poste de Maître de conférences à Toulouse) pour sa joie de vivre et ses bons conseils en tout genre..., merci à Marie W et à Jean, à qui je souhaite bonne chance pour la suite.

Un grand merci (et un gros bisou) à Jean-Claude Leprêtre pour tout : sa bonne humeur, son aide lors de la synthèse de mes polyélectrolytes, son impressionnante capacité à transmettre son savoir et son soutien non négligeable. Et dommage...

Un grand merci à tous ceux qui m'ont soutenu (et supporté) durant ces trois années : mes amis hors LEOPR, mes covoitureurs de train, ma famille et plus particulièrement Stéphane, qui mérite la palme d'or, si palme d'or il y a à donner.

Je vais maintenant terminer « en beauté » en m'adressant à ceux qui vont bien me manquer car il va me rester un grand vide lors de mon départ, à ceux qui ne sont plus des collègues du LEOPR à mes yeux mais des amis avec qui j'espère rester en contact à et qui je souhaite le meilleur pour la suite : Madame Marie-Pierre, mon Lulu, Naouf (dit aussi Nurofen), Aymericounet, Marie (la chiquita), Charles (à prononcer avec

l'accent américain, svp !), la petite Soph (dite aussi la mère Romain ou La Mouche). A ces sept-là, un très grand merci pour m'avoir supporté, aidé et pour les excellents que j'ai pu passer pendant ces trois superbes (mais courtes) années. Ce fut un honneur mais surtout une joie et un plaisir de les avoir passées avec vous. Vous allez bien me manquer...

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Introduction générale | 1 |
| Chapitre 1 : Etude bibliographique | 5 |
| 1.1 Introduction | 5 |
| 1.2 Films multicouches obtenus par autoassemblage | 5 |
| 1.2.1 Généralités | 5 |
| 1.2.2 Technique d'autoassemblage électrostatique couche par couche | 6 |
| 1.2.3 Influence du pH et de la force ionique sur les propriétés des films..... | 10 |
| 1.3 Méthodes de caractérisation..... | 12 |
| 1.3.1 Techniques optiques..... | 12 |
| 1.3.2 Microgravimétrie par microbalance à quartz | 13 |
| 1.3.3 Electrochimie | 17 |
| 1.3.3.1 Voltampérométrie cyclique | 17 |
| 1.4.3.2 Voltampérométrie sur électrode tournante | 20 |
| 1.4 Fonctionnalisation des surfaces d'électrode | 21 |
| 1.4.1 Platine..... | 22 |
| 1.4.2 Oxyde d'indium et d'étain (Indium Tin Oxide ITO) | 23 |
| 1.4.3 Carbone vitreux | 23 |
| 1.4.4 Or..... | 24 |
| 1.5 Utilisation de l'électrochimie dans le cas d'assemblages LBL ESA de polyélectrolytes..... | 26 |
| 1.5.1 Autoassemblage de polyélectrolytes électroactifs | 26 |
| 1.5.2 Autoassemblage de polyélectrolytes et de biomolécules ... | 29 |
| 1.5.3 Membranes permsélectives..... | 32 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| 1.6 | <i>Autoassemblage de polyélectrolytes et de nanoparticules.....</i> | 33 |
| 1.7 | <i>Conclusion.....</i> | 36 |
| | <i>Références chapitre 1.....</i> | 37 |
| Chapitre 2 | Modification de surface d'électrodes de carbone vitreux..... | 51 |
| 2.1 | <i>Introduction.....</i> | 51 |
| 2.2 | <i>Choix des conditions pour l'assemblage électrostatique de polyélectrolytes et d'enzymes.....</i> | 51 |
| 2.2.1 | Choix du substrat d'électrode..... | 51 |
| 2.2.2 | Le chitosane..... | 54 |
| 2.2.3 | La polyphénol oxydase..... | 55 |
| 2.3 | <i>Assemblages électrostatiques multicouches de chitosane quaternisé et de polyphénol oxydase.....</i> | 56 |
| 2.3.1 | Etudes structurales d'un film multicouche de PPO et de chitosane..... | 56 |
| 2.3.1.1 | Etude spectroscopique de la croissance du film..... | 56 |
| 2.3.1.2 | Etude microgravimétrique..... | 58 |
| 2.3.2 | Réponse électrochimique d'une électrode enzymatique à base de polyphénol oxydase..... | 62 |
| 2.3.3 | Traitement théorique du système enzymatique et établissement des relations structure – propriétés..... | 66 |
| 2.3.3.1 | Système PPO - Catéchol..... | 70 |
| 2.3.3.2 | Analyse cinétique de la bioélectrode à base de PPO..... | 71 |
| 2.4 | <i>Conclusion.....</i> | 76 |
| | <i>Références chapitre 2.....</i> | 77 |
| Chapitre 3 | Modification de surface d'électrodes d'or..... | 79 |
| 3.1 | <i>Introduction.....</i> | 79 |
| 3.2 | <i>Greffage de thiol sur une surface d'électrode d'or.....</i> | 82 |
| 3.2.1 | Analyse microgravimétrique de la monocouche de thiol ... | 82 |
| 3.2.2 | Analyse électrochimique de la monocouche de thiol sur une surface d'électrode d'or..... | 85 |

| | | |
|---------------------|--|------------|
| 3.2.2.1 | Préparation des surfaces d'électrodes d'or..... | 85 |
| 3.2.2.2 | Détermination électrochimique du recouvrement de la surface d'or par la monocouche de thiol..... | 87 |
| 3.2.2.3 | Utilisation de sondes redox en solution..... | 91 |
| 3.2.2.4 | Cas du catéchol..... | 93 |
| 3.2.2.5 | Cas du ferrocène méthanol et de l'hexacyanoferrate..... | 99 |
| 3.3 | Immobilisation de glucose oxydase dans un autoassemblage électrostatique multicouche avec le chitosane quaternisé | 101 |
| 3.3.1 | Analyse spectroscopique | 102 |
| 3.3.2 | Analyse microgravimétrique d'un assemblage de chitosane et de glucose oxydase | 106 |
| 3.3.3 | Etude des propriétés électrochimiques d'un assemblage de chitosane et de glucose oxydase..... | 110 |
| 3.4 | Conclusion chapitre..... | 116 |
| | Références chapitre 3..... | 119 |
| Chapitre 4 : | Assemblages de polyélectrolytes, de nanoparticules et d'enzymes sur une surface d'or | 121 |
| 4.1 | Introduction chapitre | 121 |
| 4.2 | Caractérisation d'assemblage de polyélectrolytes non redox et de nanoparticules d'or..... | 121 |
| 4.2.1. | Caractérisation structurale des assemblages de polydiallyldiméthylammonium et de nanoparticules d'or de 10 nm | 124 |
| 4.2.1.1 | Etude spectroscopique | 124 |
| 4.2.1.2 | Etude microgravimétrique | 126 |
| 4.2.1.3 | Propriétés électrochimiques | 130 |
| 4.3 | Caractérisation d'assemblage de polyélectrolytes redox et de nanoparticules d'or..... | 132 |
| 4.3.1 | Polyélectrolyte comportant un groupe viologène..... | 132 |
| 4.3.1.1 | Synthèse et caractérisation | 133 |
| 4.3.1.1.1 | Polyviologène greffé : PV ₁ | 133 |
| 4.3.1.1.2 | Polyviologène linéaire : PV ₂ | 137 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.1.2 Caractérisation d'assemblages de polyviologène et de nanoparticules d'or | 140 |
| 4.3.1.2.1 Etude spectroscopique..... | 141 |
| 4.3.1.2.2 Etude électrochimique | 143 |
| 4.3.2 Polyélectrolyte comportant un groupe à base d'un complexe d'osmium..... | 145 |
| 4.3.2.1 Synthèse et caractérisation | 146 |
| 4.3.2.1.1 Complexes d'osmium | 146 |
| 4.3.2.1.2 Polyvinylpyridine osmium..... | 149 |
| 4.3.2.1.3 Polyallylamine osmium..... | 151 |
| 4.3.2.2 Assemblage de polyallylamine osmium et de nanoparticules d'or | 157 |
| 4.3.2.2.1 Etude spectroscopique..... | 157 |
| 4.3.2.2.2 Etude microgravimétrique par QCM-D | 160 |
| 4.3.2.2.3 Etude électrochimique | 163 |
| 4.3.2.2.3.1 Suivi de la construction de l'autoassemblage..... | 163 |
| 4.3.2.2.3.2 Comportement des films (OsPAH/NP ₁₀) _n autoassemblés sur électrode d'or vis-à-vis du catéchol | 169 |
| 4.3.2.2.3.3 Etudes de perméabilité..... | 170 |
| 4.4 Application à la transduction d'un processus électroenzymatique : Assemblage de polydiallyldiméthylammonium, de nanoparticules d'or et de polyphénol oxydase | 172 |
| 4.4.1 Caractérisation structurale | 172 |
| 4.4.1.1 Etude spectroscopique..... | 172 |
| 4.4.1.2 Etude microgravimétrique | 173 |
| 4.4.2 Sensibilité des bioélectrodes construites vis-à-vis du catéchol..... | 176 |
| 4.5 Conclusion chapitre | 178 |
| Références Chapitre 4..... | 179 |
| Conclusion générale | 181 |

| | |
|--|------------|
| Partie expérimentale :..... | 185 |
| <i>P.1 : Modes opératoires des synthèses de polyélectrolytes redox.....</i> | 185 |
| P.1.1 : Polyviologène PV₁..... | 185 |
| P.1.1.1 : Synthèse du composé a _v | 185 |
| P.1.1.2 : Synthèse du composé b _v | 185 |
| P.1.1.3 : Synthèse du composé c _v | 186 |
| P.1.1.4 : Synthèse de PV ₁ | 186 |
| P.1.2 : Polyviologène PV₂..... | 186 |
| P1.3 : Complexes d'osmium..... | 187 |
| P.1.3.1 : Synthèse du ligand pyridine-4-acétal..... | 187 |
| P.1.3.2 : Formation du complexe b | 187 |
| P.1.3.3 : Formation du complexe c..... | 188 |
| P.1.3.4 : Formation du complexe d | 188 |
| P.1.4 Synthèse de OsPAH..... | 189 |
| P1.5 : OsPVP | 189 |
| <i>P.2 : Réactifs et solvants.....</i> | 190 |
| P.2.1 : Synthèse et caractérisation | 190 |
| P.2.2 : Electrochimie..... | 191 |
| P.2.3 : Solvants | 192 |
| <i>P.3 : Appareillage et méthodes.....</i> | 193 |
| P.3.1 : Electrochimie..... | 193 |
| P.3.1.1 : Appareillage | 193 |
| P.3.1.2 : Polissage des électrodes..... | 193 |
| P.3.1.3 : Modification des surfaces d'électrodes | 193 |
| P.3.2 : Spectroscopie UV-Visible..... | 195 |
| P.3.3 : Microbalance à Quartz avec suivi de la Dissipation d'énergie : QCM-D..... | 195 |
| P.3.4 : Autres méthodes de mesures..... | 196 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------------------------------|---|
| LbL ESA : | « Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly » : Autoassemblage Electrostatique Couche par Couche |
| SAM : | « Self-Assembled Monolayer » : Monocouche Autoassemblée |
| GC : | « Glassy Carbon » : Carbone vitreux |
| Au : | Or |
| IgG : | Couche d'immunoglobuline associée à l'anticorps conjugué de la glucose oxydase |
| MPS: | 3-mercaptopropanesulfonate |
| PE : | Polyélectrolyte |
| PER: | Polyélectrolyte Redox |
| PDDA+ : | Polydiallyldimethylammonium |
| CHI ⁺ : | Chitosane quaternisé |
| PSS ⁻ : | Polystyrène sulfonate |
| PV : | Polyviologène |
| OsPAH : | Polyallylamine osmium |
| OsPVP : | Polyvinylpyridine osmium |
| Gox : | Glucose oxydase |
| PPO : | Polyphenol oxydase |
| NP : | Nanoparticules |
| NP ₅ et NP ₁₀ : | Nanoparticules d'or de 5 et 10 nm de diamètre respectivement |
| FcMeOH : | Ferrocène méthanol |
| TP : | Tampon Phosphate |
| TRIS : | Tampon Tris(hydroxyméthyl)aminoéthane |
| VC : | Voltampérométrie Cyclique |
| QCM-D : | « Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring » : Microbalance à Cristal de Quartz avec suivi de la Dissipation d'énergie |
| RMN ¹ H : | Résonance Magnétique Nucléaire du proton |

Les grandeurs physiques utilisées sont définies au fur et à mesure dans ce mémoire.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La maîtrise des nanotechnologies constitue un enjeu majeur pour l'industrie de demain. En effet, les progrès accomplis dans la maîtrise de la matière à l'échelle du nanomètre ouvrent des perspectives nouvelles, sources d'enjeux scientifiques, techniques et économiques majeurs dans des champs d'activité variés. Les nanotechnologies ne peuvent se développer sans l'apport d'une recherche fondamentale importante : c'est ce qui constitue le domaine des nanosciences au croisement de plusieurs disciplines.

Suivant la définition retenue au niveau international, les nanosciences et les nanotechnologies visent la réalisation, l'étude et la manipulation de structures, systèmes, ou objets dont la taille typique est inférieure à 100 nm et dont les propriétés physiques, chimiques ou biologiques découlent spécifiquement de cette taille nanométrique. Les nanosciences fédèrent plusieurs grands champs thématiques de recherche fondamentale : on peut notamment retenir les nanocomposants pour l'électronique, la photonique et l'information quantique, les nanomatériaux et les nanobiosciences.

L'organisation de certains matériaux à l'échelle nanométrique (on parle de matériaux nanostructurés) leur permet d'avoir des propriétés optiques, mécaniques, chimiques nouvelles et dans ce domaine, beaucoup reste à explorer. Ces matériaux nanostructurés peuvent être élaborés de manière collective par des procédés de croissance totalement nouveaux. Par exemple en jouant sur les conditions expérimentales, il est possible de fabriquer des nanostructures organisées en utilisant des lois de la physico-chimie qui vont dicter comment des nanoobjets vont s'assembler de manière spontanée dans une forme voulue. Cette technique d'autoassemblage connaît actuellement des développements sans précédents.

Parmi les multiples possibilités, la méthode d'autoassemblage électrostatique couche par couche connaît un intérêt considérable. Le principe de cette méthode a été introduit par Iler¹ en 1966, mais ce n'est que récemment qu'une explosion d'intérêt, en liaison avec le développement des nanosciences, s'est manifestée suite aux travaux de Gero Decher² en 1991. L'adsorption alternée couche par couche de polyélectrolytes de charge opposée sur une surface chargée permet d'inverser la charge de surface à chaque étape, mais surtout de former des structures complexes avec un contrôle moléculaire de

l'arrangement spatial des entités constitutives. C'est une technique flexible, versatile et simple à mettre en œuvre ; des avantages intéressants par rapport à d'autres méthodes comme l'élégante technique Langmuir – Blodgett.

C'est dans ce contexte que se situe mon travail de thèse dont les objectifs concernent l'étude de la méthode d'autoassemblage électrostatique pour modifier des surfaces d'électrodes et leur conférer des propriétés spécifiques en vue d'applications dans les domaines des transducteurs, des capteurs chimiques et biocapteurs, ou de l'électrocatalyse. Un acte électrochimique est un processus multiétape se déroulant à l'interface entre un métal, conducteur électronique, et un électrolyte, conducteur ionique. Ainsi l'efficacité d'un processus électrochimique sera la résultante d'une succession d'étapes élémentaires (transfert de charge, transport de matière, réactions chimiques couplées) ; chacune d'entre elles pouvant être cinétiquement limitante selon les conditions d'utilisation. Comme nous le verrons, la nature de l'électrode, ainsi que la nature de l'assemblage électrostatique réalisé à la surface de cette électrode, de même que sa structure, son organisation et les conditions de sa construction, constituent autant de paramètres qui conditionnent les propriétés collectives du dispositif élaboré.

L'étude bibliographique, menée dans le premier chapitre de ce mémoire, permet de connaître les avancées de recherches effectuées dans le domaine des électrodes modifiées avec la technique d'autoassemblage électrostatique. Cette technique est basée sur des interactions électrostatiques principalement. Pour pouvoir réaliser de tels assemblages sur une surface, il est nécessaire que cette surface soit chargée (négativement ou positivement). Des surfaces de différentes natures ont été utilisées pour cela car elles sont soit « naturellement » chargées, soit il est possible de les fonctionnaliser pour les rendre chargées. A titre d'exemple, des surfaces d'électrodes de platine, d'ITO, de carbone vitreux et d'or ont été étudiées. Pour chaque type de surface, il existe différentes méthodes de fonctionnalisation. Dans le cas du carbone vitreux, il est possible de greffer, à la surface, des molécules chargées, de déposer directement un polyelectrolyte par physisorption. Il est reconnu que l'or peut former des liaisons covalentes avec le soufre. De telles surfaces peuvent être modifiées par des monocouches d'alcanethiols, parmi les autres possibilités de greffage sur ce type de surface.

Le deuxième chapitre est dédié à la modification d'une surface d'électrode de carbone vitreux. Dans un premier temps, nous avons étudié différentes méthodes de fonctionnalisation de cette surface : le dépôt direct de polyélectrolyte, le greffage d'un sel de diazonium et l'adsorption d'une couche immunologique. L'étude de ces différentes méthodes a montré que la modification par une sous-couche immunologique est plus adéquate pour la construction ultérieure d'un biocapteur à base de polyphénol oxydase (PPO), utilisée comme enzyme modèle, et de chitosane sélectionné pour ses propriétés biocompatibles. Grâce à des mesures électrochimiques et structurales, nous avons pu mettre en évidence des relations structure – propriétés pour ce type de biocapteur³.

Puis nous nous sommes orientés, dans le troisième chapitre, vers la modification d'électrode d'or qui permet un meilleur contrôle de la surface réelle active et donc de la reproductibilité des mesures. Un autre avantage de ce type de surface est que leur fonctionnalisation peut se faire par le greffage d'un thiol. En choisissant la nature du thiol déposé en surface, il est possible ainsi de contrôler l'interface or – solution, en vue de telle ou telle propriété recherchée ou de telle application visée. Parmi les multiples possibilités, nous avons choisi de travailler avec le 3-mercaptopropanesulfonate de sodium, MPS, pour les propriétés intéressantes qu'il peut offrir. En effet, l'étude de la structure de cette monocouche et de ses propriétés électrochimiques, nous a permis de mieux comprendre ses propriétés vis-à-vis du transport de charge et du transport de matière à l'interface électrode modifiée – solution, et de voir que les propriétés remarquables de cette monocouche autoassemblée dépendent de l'espèce redox détectée⁴. De plus, cette surface d'or ainsi fonctionnalisée est utilisée comme plateforme pour l'ancrage électrostatique des assemblages de polyélectrolytes. A cause des propriétés particulières de la monocouche de MPS, vis-à-vis du catéchol, l'assemblage direct de PPO avec un polyélectrolyte non redox ne peut donner lieu à son utilisation dans la biodétection, de façon satisfaisante. Cependant, nous avons remarqué que le ferrocène méthanol peut être détecté sur une surface modifiée par du MPS, ce qui nous a incité à utiliser ce produit comme médiateur redox de la glucose oxydase (Gox), qui a été immobilisée dans un assemblage multicouche avec un chitosane quaternisé, rendant possible la réalisation d'un tel biocapteur.

Dans un souci d'optimiser les performances de biocapteurs construits sur de telles surfaces d'électrode, nous avons voulu intégrer des nanoparticules d'or à ces assemblages, pour leurs propriétés intéressantes de conduction électronique. En effet, dans le quatrième chapitre, nous avons pu montrer qu'un assemblage composé de nanoparticules d'or et de polyélectrolytes, constitue une matrice conductrice électronique, qui a donc pour conséquence d'améliorer considérablement l'étape de transduction pour la biodétection. Ainsi un biocapteur à base de PPO a pu être réalisé avec cette sous-couche conductrice, ayant pour conséquence d'augmenter considérablement la sensibilité d'un tel biocapteur. Une partie de ce même chapitre est dédiée à l'étude de polyélectrolytes redox actifs, qui peuvent améliorer les connexions électriques, voire être utilisés dans la médiation d'enzymes. Nous y avons décrit leur synthèse et les propriétés particulièrement intéressantes qu'ils peuvent apporter quand ils sont autoassemblés avec des nanoparticules d'or⁵.

- [1] Iler, R. K.; *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, *21*, 569-594.
- [2] Decher, G.; Hong, J. D. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft* **1991**, *95*, 1430-1434.
- [3] Coche-Guerente, L.; Desbrieres, J.; Fatisson, J.; Labbe, P.; Rodriguez, M. C.; Rivas, G. *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 2865-2877.
- [4] Mokrani, C.; Fatisson, J.; Guerente, L.; Labbe, P. *Langmuir* **2005**, *21*, 4400-4409.
- [5] Ferreyra, N.; Coche-Guérente, L.; Fatisson, J.; Teijelo, M. L.; Labbé, P. *Chem. Commun.* **2003**, 2056-2057.

CHAPITRE 1

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1.1 Introduction

Le dépôt alterné de polyanions et de polycations conduit à la formation de films minces appelés multicouches de polyélectrolytes. Les films autoassemblés constituent une nouvelle classe de matériaux où les propriétés macroscopiques peuvent être programmées « à façon » en contrôlant au niveau microscopique non seulement la structure mais également l'organisation spatiale des entités constitutives (moléculaires ou nanoparticulaires).

Cette étude bibliographique présente l'état de l'art quant à ce type d'assemblages dans l'objectif de construire de nouveaux matériaux d'électrodes par la technique d'autoassemblage électrostatique couche par couche.

1.2 Films multicouches obtenus par autoassemblage

1.2.1 Généralités

Dans la nature, on peut trouver toute sorte d'objets ayant des tailles qui vont de l'échelle atomique jusqu'à l'échelle du globe terrestre. Cependant, l'homme est réduit à manipuler des objets à des échelles restreintes. Du fait que, dans la nature, on trouve des formes de vie ayant une dimension minimale allant du nanomètre au micromètre, il devient donc intéressant d'étudier des organisations nanoscopiques. Il existe pour cela deux approches possibles. La première, nommée « bottom-up », correspond à la synthèse chimique, tandis que la seconde, intitulée « top-down », vise la miniaturisation. La maîtrise de tels systèmes nanoorganisés constitue un enjeu majeur pour les progrès de demain et demande une interdisciplinarité. La construction d'architectures complexes nanométriques fait appel à la chimie supramoléculaire. En effet, celle-ci a pour objet la conception, la création et l'étude de structures complexes, constituées d'éléments simples. Les propriétés de ces matériaux nanostructurés vont découler de l'assemblage contrôlé des différents composants. La structure de ces systèmes dépend essentiellement des interactions entre les éléments constitutifs. Ces interactions peuvent être des attractions dipolaires, des liaisons covalentes ou hydrogènes, et de type électrostatique.

Le principe de l'adsorption alternée a été introduit en 1966 par Iler¹ à partir de particules colloïdales de charges opposées. Mallouk et al ont développé ensuite l'adsorption alternée d'ions Zr^{4+} et d'acide phosphonique². Enfin, plus récemment, Decher et al ont étendu cette technique à l'assemblage de polycations et de polyanions linéaires³.

1.2.2 Technique d'autoassemblage électrostatique couche par couche

Cette technique est basée, entre autres, sur des interactions électrostatiques entre des polyanions et des polycations.

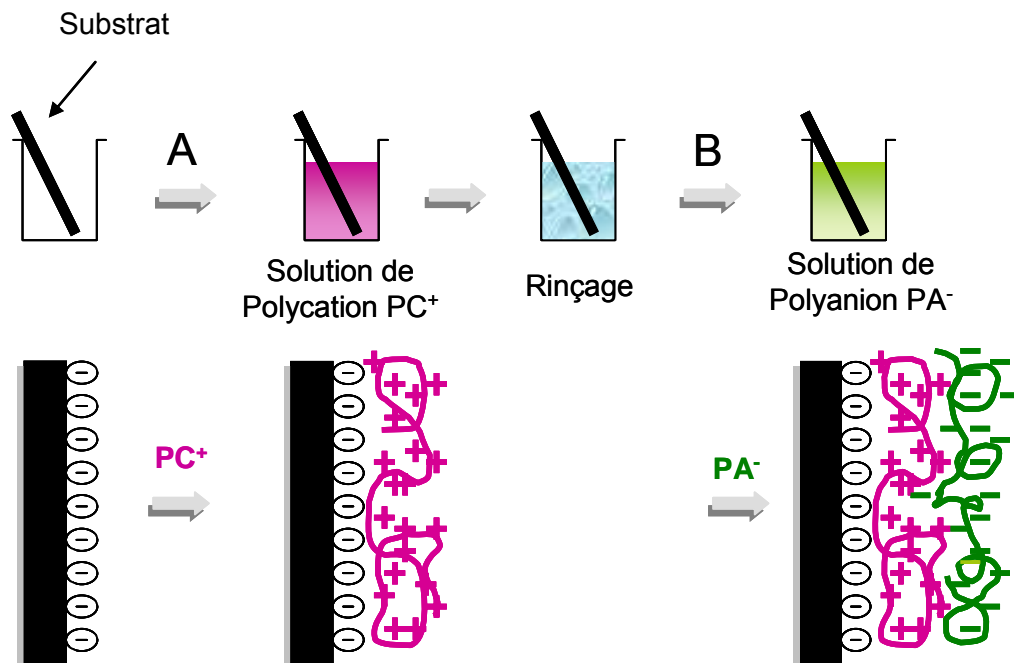


Figure n°1.1 : Représentation schématique de la technique d'autoassemblage électrostatique couche par couche (« Layer by Layer Electrostatic Self-Assembly » LbL ESA)

La procédure d'élaboration est décrite sur le schéma de la figure 1.1 :

Etape A : un solide possédant une surface chargée (de nombreuses méthodes de greffage d'une monocouche de charges positives ou négatives peuvent être mises en œuvre en fonction de la nature du substrat) est immergé dans une solution contenant un polyélectrolyte de charge opposée. Il en résulte l'adsorption d'une couche de polyélectrolyte (PE) qui conduit à l'inversion de la charge en surface du solide.

Etape B : Après rinçage, le solide est immergé dans une solution de polyélectrolyte de charge opposée à celle du polyélectrolyte de l'étape A. De nouveau, une seconde couche de PE s'adsorbe, ce qui restaure la charge initiale du solide.

La répétition alternée de ces étapes permet de construire ainsi des matériaux multicouches, dont une représentation schématique et idéalisée est montrée dans le schéma de la figure 1.1. L'étape de rinçage consiste à éliminer les molécules de polyélectrolyte qui ne sont pas adsorbées électrostatiquement à la surface.

Si on utilise des polymères chargés, des macromolécules, c'est pour assurer une certaine cohésion des films⁴. En effet, l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires des PE va procurer des propriétés mécaniques de cohésion plus importantes que pour l'assemblage de petites molécules.

Lors de l'adsorption d'un PE, l'électroneutralité est maintenue grâce aux contre-ions qui viennent contrebalancer la charge apportée par le PE. Lors de l'adsorption de la couche de PE de charge opposée, une grande partie de ces ions est remplacée par les charges du PE. Il subsiste alors un excès de charge. Lorsque ce processus opère, des petits ions peuvent rester piégés dans le film^{5,6}.

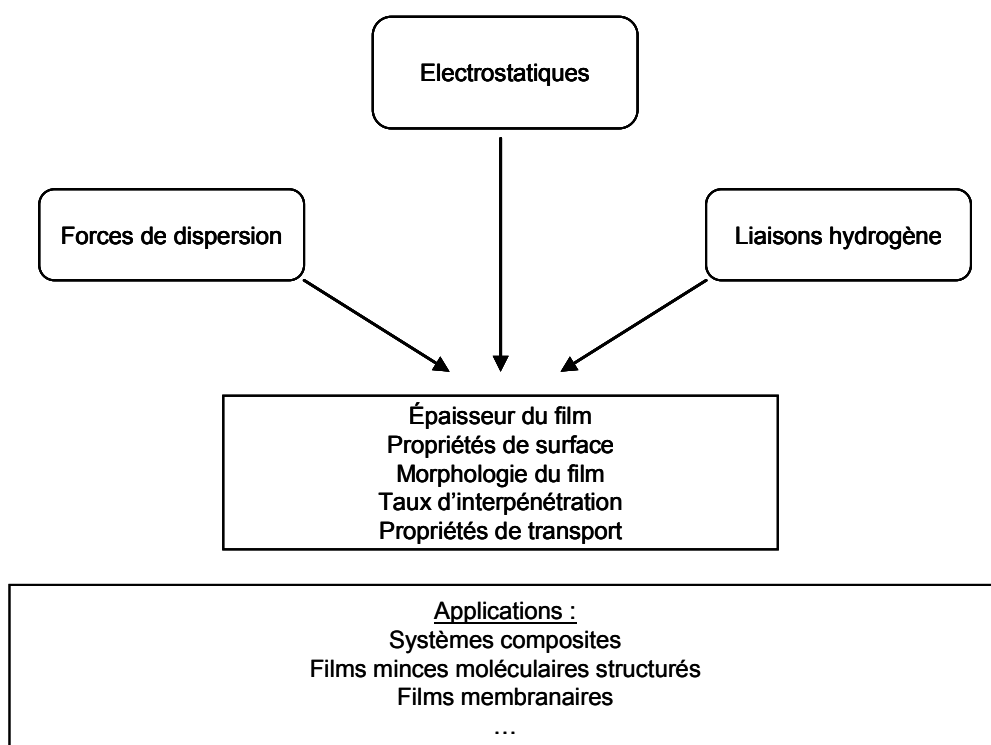


Figure n°1.2 : Représentation schématique des forces influençant les propriétés des films LbL et des applications possibles en contrôlant ces forces⁷

Kotov⁸ ont analysé la contribution des interactions hydrophobes dans ce type d'assemblage, vis-à-vis du relargage des contre-ions, d'eau et de la formation de complexes de polyélectrolytes (PE). Schlenoff et al⁹ ont aussi montré que les interactions entre les polymères et la surface ont une influence sur l'épaisseur, entre autres paramètres du film.

Les interactions électrostatiques sont la force motrice de cette technique d'assemblage mais aussi la clé de la structure finale de ces films minces polychargés. Cependant, d'autres interactions secondaires peuvent être mises en jeu et avoir une influence sur l'épaisseur des films, sur leurs propriétés morphologiques finales, et dans certains cas sur leur stabilité. Ces interactions secondaires (figure 1.2) jouent aussi un rôle sur l'adsorption sélective des polymères, la perméabilité et le transport ionique dans ces assemblages. Cette procédure de fonctionnalisation de surface par autoassemblage couche par couche a été élargie à l'introduction de couches chargées constituées de protéines globulaires¹⁰, ou de nanoparticules minérales^{11,12}, organiques¹³, métalliques¹⁴ ou semi-conductrices¹⁵ (figure 1.3).

Ce sont ces caractéristiques avantageuses qui ont permis à cette technique de connaître un vif succès depuis ces dernières années, sans doute au détriment des techniques précédentes, comme l'élégante technique Langmuir-Blodgett qui a été utilisée pendant plus de 65 ans mais qui requiert des équipements plus coûteux.

En contrôlant la nature des espèces autoassemblées, les conditions de leur adsorption, on peut ainsi contrôler l'organisation spatiale, la structure et les propriétés des matériaux qui résultent de ces autoassemblages. Ce qui élargit le champ d'applications possible de ces matériaux.

La versatilité de cette technique provient aussi des différents types de surfaces qu'il est possible de fonctionnaliser par des assemblages : des surfaces planes de nature différente (quartz, métaux, silice), ou sphériques (colloïdes organiques ou métalliques) par exemple.

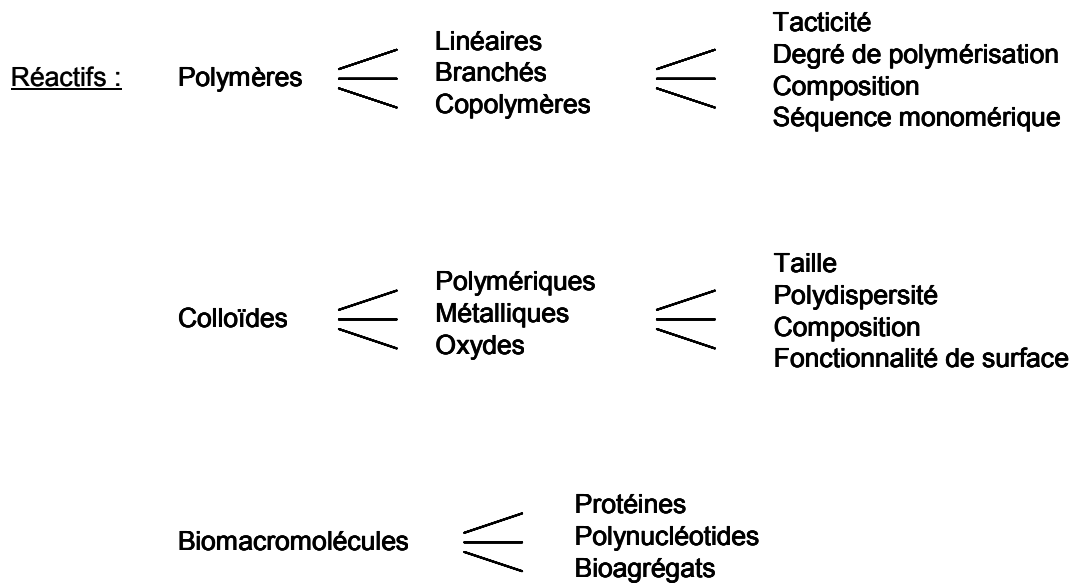


Figure n°1.3 : Réactifs possibles pour un assemblage couche par couche avec quelques détails sur la composition pour les polymères et les colloïdes

Il existe notamment de nombreux exemples décrivant la préparation de colloïdes nanostructurés. Les colloïdes ont montré leur importance dans différents domaines : la cosmétique, les peintures, la photographie, l'agriculture. Pour stabiliser un colloïde, il faut contrôler des interactions intermoléculaires qui influencent la stabilité du colloïde. La technique LbL peut être utile dans ce cas, soit pour modifier la surface de particules sphériques, soit pour encapsuler diverses espèces. Divers travaux¹⁶⁻³⁴ ont montré la croissance d'un film multicouche de polymères anioniques et cationiques à la surface de différentes particules³⁵ organiques (polystyrène, latex) ou minérales (silice, or, zeolite). En contrôlant le nombre de couches déposées, la taille des particules peut être programmée en vue d'obtenir une épaisseur bien définie. Ce concept a permis, par exemple, d'encapsuler des espèces biologiques, comme des enzymes³⁶⁻³⁹ ou d'autres protéines, pour créer des réacteurs enzymatiques intéressants du fait de la grande surface disponible, due aux particules. C'est cette caractéristique attrayante qui a motivé l'utilisation de particules comme substrats pour des autoassemblages, ce qui a pour conséquence d'augmenter les performances (catalytiques, optiques, etc.) de ces matériaux par rapport à l'utilisation de substrats plans. Même si ces substrats particuliers sont intéressants, il est nécessaire de contrôler des paramètres supplémentaires pour stabiliser ces suspensions et pour obtenir les propriétés désirées, qui restent cependant restreintes par rapport à des surfaces planes.

Même en restreignant notre étude bibliographique au domaine des surfaces planes, un nombre très important de travaux a été publié à ce sujet. Outre la morphologie du substrat utilisé (plan, sphérique ou quelconque), sa nature va déterminer les propriétés des assemblages et plus particulièrement les applications visées.

1.2.3 Influence du pH et de la force ionique sur les propriétés des films

De même que la nature du substrat et des PE utilisés, d'autres paramètres comme le pH et la force ionique des solutions de ces espèces vont influencer la structure et les propriétés finales des matériaux.

Etant donné que la force motrice de cette technique d'autoassemblage, par rapport à d'autres, est basée sur des interactions électrostatiques, il est concevable que la densité de charge des PE utilisés va avoir une influence certaine sur leur adsorption, leur conformation et donc sur la structure et les propriétés finales des matériaux réalisés. Le taux d'ionisation de certains polyélectrolytes dépend du pH du milieu. C'est le cas du polyallylamine (PAH) par exemple. Le choix du pH de la solution a une influence sur la densité de charges de ce PE, reliée au nombre de groupements amines protonées ou non. Le pKa des fonctions amine dans le PAH est de 7,2⁴⁰. Plus le pH de la solution de PAH est proche de son pKa, plus la quantité de groupements ammonium est faible, donc plus la densité de charge du PAH est faible. Ceci favorise l'adsorption de ce polycation. Mais cela réduit l'inversion de la charge en surface, ce qui ne facilite pas l'adsorption d'un polyanion à la surface du PAH.

Un polymère est capable de changer de conformation durant son adsorption et on peut le trouver sous trois formes : (i) les formes plates, où tous les segments sont connectés à la surface, (ii) les formes en boucles, qui relient deux formes plates et (iii) les formes queues qui sont dirigées vers la solution (figure 1.4).

On peut donc dire que le pH a une influence sur la conformation du PE, de part la quantité de formes plates ou de boucles dans la chaîne polymère, et par conséquent sur la structure de l'autoassemblage entre ces PE. Or les propriétés structurales sont reliées aux propriétés mécaniques, optiques, chimiques, électroniques finales du matériau construit.

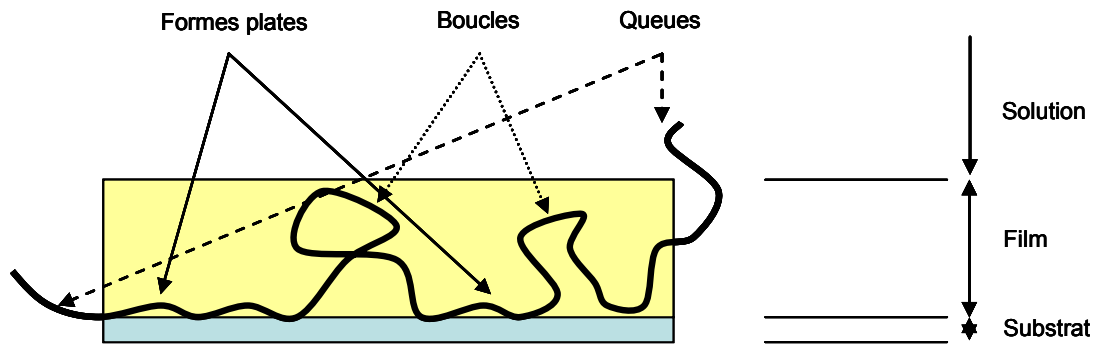


Figure n°1.4 : Représentation schématique des formes que peut prendre un polymère lors de son adsorption

Par exemple, les propriétés d'émission de lumière d'un polycation contenant un complexe de ruthénium Ru(II) varient en fonction du pH des solutions des PE utilisées⁴¹. En faisant varier le pH des solutions, il est possible de créer des pores dans les couches de PE autoassemblés pour fabriquer des matériaux microporeux³⁵.

Le pH a aussi une influence sur les fonctionnalités chimiques d'une couche de PE au niveau de sa structure interne ou en surface. En effet, à un pH adéquat (en fonction des PE utilisés), il est possible de créer des liaisons avec des cations métalliques. Par exemple, il a été montré que l'ajustement du pH permet de contrôler le taux de fonctions acides carboxyliques libres, qui vont pouvoir créer des liaisons avec des ions inorganiques, ce qui peut permettre, par exemple, la synthèse de nanoparticules⁴². D'autres travaux ont montré que le choix du pH des solutions de PE influence la façon dont un catalyseur, le complexe tétraamine de palladium, se fixe à la surface des assemblages de PE faibles, polyacide acrylique et polyallylamine. Ces films composites sont appliqués au plaquage non électrolytique du nickel catalysé par le palladium⁴³. Ces exemples d'applications, parmi les multiples possibilités existantes, montrent que ces autoassemblages peuvent être utilisés comme nanoréacteurs.

Mais le pH n'est pas le seul paramètre que l'on peut faire varier pour modifier la structure et les propriétés d'un matériau autoassemblé. La force ionique du milieu joue un rôle important dans ce processus. A force ionique élevée, la proportion de boucles est plus importante, du fait d'un effet d'écran des charges du PE par les contre-ions présents. Il a d'ailleurs été montré, par réflectivité de rayons X notamment, mais aussi par ellipsométrie^{9,44}, que, dans ces conditions, il n'y a pas de stratification absolue mais une interpénétration de chaque couche les unes dans les autres^{45,46}. Les effets de l'influence de la force ionique sont bien connus et semblables à ceux de l'influence du

pH : si la force ionique est élevée, l'effet d'écran est plus important, ce qui tend à favoriser l'adsorption d'un PE et comme expliqué précédemment, l'adsorption du partenaire de charge opposée devient plus difficile. A force ionique faible, les PE s'adsorbent préférentiellement en adoptant une conformation plane avec des parties « queues » longues alors qu'à force ionique élevée, les boucles sont en plus grand nombre car les polymères deviennent plus flexibles du fait d'un effet d'écran plus important⁴⁷.

La cinétique d'adsorption de différents PE a été analysée par différentes techniques, dont des méthodes optiques (ellipsométrie⁴⁸, réflectivité de rayons X⁴⁹, spectroscopie UV-Visible⁵⁰), par microbalance à quartz⁵¹ et il a été montré que cette adsorption atteint un état stationnaire au bout de 20 – 30 minutes. Il apparaît également que les premières bicouches sont plus fines que les suivantes. Ceci a été expliqué par le fait que la rugosité des premières couches est grande, ce qui implique une nécessité de compenser les charges, puis la rugosité diminue jusqu'à être constante pour les couches ultérieures. La structure (liée à l'épaisseur de chaque couche), va influencer les propriétés du matériau ainsi que son champ d'applications. Il faut tout de même noter que ces effets d'enchevêtrements des chaînes macromoléculaires dépendent de la nature des PE utilisés⁴. De plus, la plupart des mesures structurales ont été réalisées *ex situ*. On peut raisonnablement penser que la structure *in situ* est différente et qu'une étude de la structure interne des matériaux autoassemblés est une étape importante.

1.3 Méthodes de caractérisation

Il existe un très grand nombre de méthodes de caractérisation des autoassemblages électrostatiques multicouches *in-situ* et *ex-situ*, et donc une très grande quantité d'articles consacrés à ces études. Le but, ici, n'est pas d'énoncer la liste complète de toutes ces méthodes, ni de tous ces articles mais de voir quel type d'information on peut obtenir via quelques-unes de ces méthodes.

1.3.1 Techniques optiques

Parmi les méthodes de caractérisation possibles, beaucoup d'entre elles sont rattachées aux propriétés optiques au sens large du terme.

Le moyen le plus simple pour suivre la construction d'un assemblage, couche par couche, est probablement la spectroscopie d'absorption UV-Visible, à la seule condition

qu'au moins une des espèces assemblées absorbe dans ce domaine spectral. En mesurant l'absorbance à la longueur d'onde d'absorption caractéristique d'une des espèces et en connaissant le coefficient d'extinction molaire de cette espèce, il est possible de calculer, grâce à la loi de Lambert-Beer, la concentration surfacique de cette espèce immobilisée dans le film. Ainsi, il est possible d'en déduire la cinétique d'adsorption de cette espèce, mais aussi d'avoir des informations structurales sur le film, du point de vue de son mode de croissance (linéaire ou non)⁵²⁻⁵⁴.

Sur le même principe de mesure de l'absorbance à une certaine longueur d'onde, par des mesures ellipsométriques ou de réflectivité de rayons X, l'épaisseur des films peut être ainsi déterminée et contrôlée en faisant varier, comme cela a été vu précédemment la nature des PE, le pH, la force ionique du milieu. L'épaisseur d'un film peut également être obtenue par différentes méthodes microscopiques (microscopie à force atomique (AFM), microscopie à transmission électronique (TEM), microscopie confocale) ou spectroscopiques (résonance plasmonique de surface (SPR), spectroscopie à guide d'onde optique (OWLS), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode de réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)) qui donnent aussi des informations sur la cinétique d'adsorption des espèces, sur la réorganisation structurale du film, par exemples.

1.3.2 Microgravimétrie par microbalance à quartz

Une des méthodes les plus utilisées pour suivre la construction d'un film et obtenir des informations structurales est la microbalance à quartz (QCM pour Quartz Crystal Microbalance).

Depuis la découverte en 1880 par Jacques et Pierre Curie du phénomène de piézoélectricité de plusieurs matériaux, en particulier du quartz, un grand nombre de recherches ont été réalisées dans ce domaine. La piézoélectricité a été définie par Cady⁵⁵ : il s'agit de « la polarisation électrique produite par un effort mécanique dans des cristaux appartenant à certaines classes, et cette polarisation est proportionnelle à l'effort et change de signe avec ». L'effort mécanique peut être de type torsion, tension, compression, flexion ou cisaillement. De plus, l'inverse peut être aussi réalisé : l'application d'un champ électrique à travers le quartz produit une déformation mécanique, les mesures par QCM sont basées sur ce principe.

Le quartz est composé de silice et se trouve sous la forme de cristaux (figure 1.5).

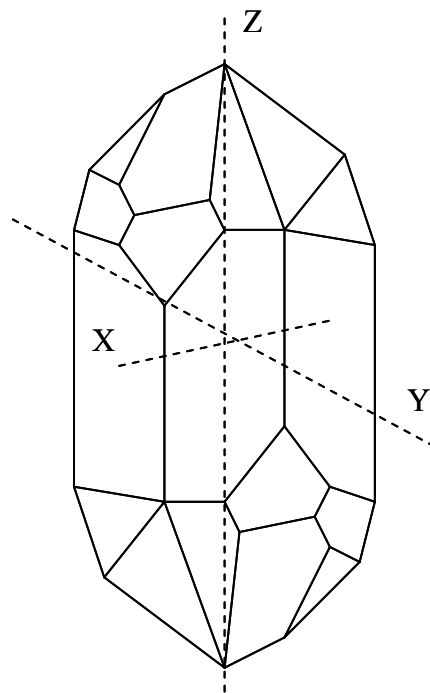


Figure n°1.5 : Schéma d'un cristal de quartz avec ses différents axes d'orientation

Mais ces cristaux ne peuvent être utilisés à l'état brut, il est nécessaire de les couper selon certains axes. Le choix de l'axe et des angles de coupe détermine les propriétés physiques et électriques du cristal. Les cristaux de quartz sont utilisés dans plusieurs techniques du fait de ces multiples possibilités de choix de coupe. Dans le cas de la microbalance, la coupe AT (figure 1.6) est choisie car elle permet une vibration du quartz en mode cisaillement et d'avoir un signal stable.

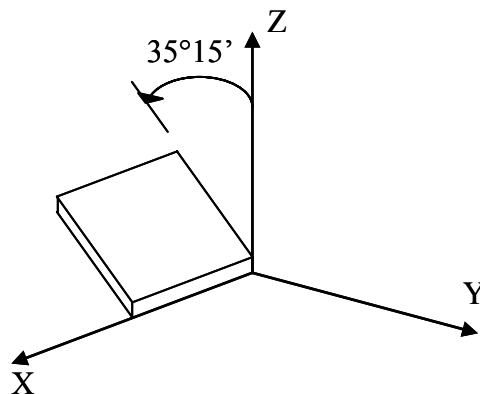


Figure n°1.6 : Schéma d'une coupe, selon l'axe AT, d'un cristal de quartz

Le cristal de quartz utilisé en QCM est recouvert d'une surface conductrice sur les deux faces. L'établissement d'un champ électrique alternatif à travers le cristal de quartz provoque un mouvement vibrationnel à la fréquence de résonance du quartz. Cette fréquence de résonance est sensible à la variation de masse du cristal (figure 1.7).

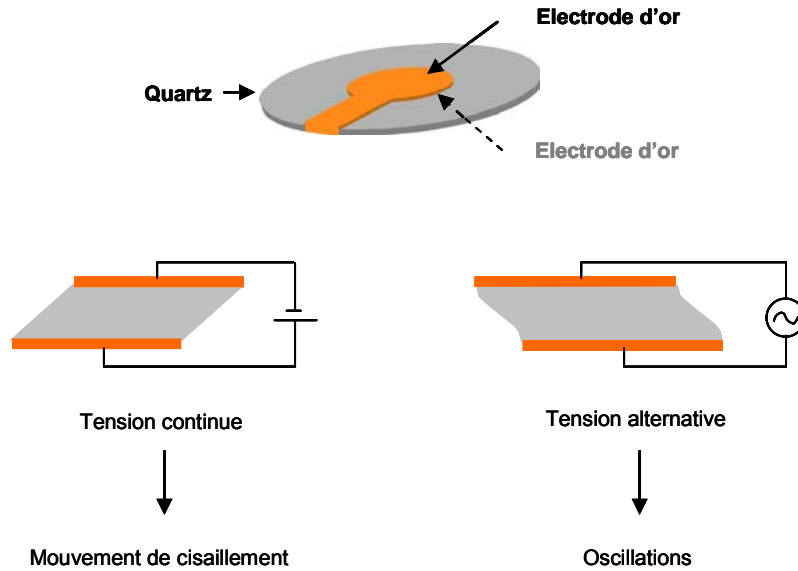


Figure n°1.7 : Schéma représentant le mode de fonctionnement de la microbalance à quartz

Sauerbrey⁵⁶ a été le premier à montrer qu'il existe une relation (équation (1)) linéaire entre la variation de masse ajoutée (dans le vide) Δm et le changement de fréquence de résonance du quartz Δf ,

$$\Delta m = -C\Delta f \quad (1)$$

où C est une constante qui dépend des propriétés intrinsèques du cristal de quartz,

$$C = \frac{A(\rho_q \mu_q)^{1/2}}{2f_0^2} \quad (2)$$

avec f_0 , la fréquence de résonance du cristal de quartz, A , la surface piézoélectriquement active, ρ_q la densité du quartz ($2,648 \text{ g.cm}^{-3}$) et μ_q , le module de cisaillement ($2,947.10^{11} \text{ dynes.cm}^{-2}$ pour une coupe AT du quartz).

Depuis, un grand nombre de chercheurs ont utilisé cette technique de QCM. Les premières recherches ont été faites dans le vide ou en phase gazeuse pour le contrôle de dépôt de films minces, pour des études de contamination et pour des mesures de masse dans des aérosols⁵⁷⁻⁶¹. Puis la microbalance a été utilisée en milieu liquide, en premier par Nomura et al^{62,63}. Après, plusieurs études ont été dédiées à la détermination de trace

de métaux, à la réalisation d'immunocapteurs, à l'adsorption de protéines, de phospholipides, à l'adhésion de cellules⁶⁴⁻⁷⁰.

Cette technique a aussi beaucoup été utilisée pour suivre la construction d'un assemblage en temps réel⁷¹⁻⁷⁵, et plus particulièrement les cinétiques d'adsorption des espèces assemblées pour ainsi optimiser les conditions d'adsorption⁷⁶⁻⁸⁰.

Puis, plus récemment, la QCM a été couplée à l'électrochimie, sous la forme d'EQCM^{81,82}. Cette technique permet de voir la variation de masse lors d'un processus électrochimique. Cette variation est liée à la rentrée ou sortie d'ions dans le film adsorbé à l'électrode, pour venir compenser l'excès de charge produit par la réaction électrochimique étudiée.

Cependant, subsistait un problème quant à l'utilisation de la loi de Sauerbrey. En effet, celle-ci n'est utilisable que pour des couches adsorbées suffisamment fines et rigides et elle n'est pas applicable dans le cas d'un film viscoélastique. Ce comportement correspond le plus souvent à celui des films de polymères ou de biomolécules. Dans cette optique, plusieurs études ont été menées pour connaître les limites de validité de l'équation de Sauerbrey⁸³ ou pour déterminer les propriétés viscoélastiques^{84,85}. Mais ces mesures étaient faites indépendamment des mesures de masse ou nécessitaient un appareillage bien plus coûteux que la QCM. Pour pallier ce problème, Rodahl et al^{86,87} ont mis au point une technique permettant la mesure simultanée du changement de fréquence et de la dissipation d'énergie : il s'agit de la microbalance à quartz avec suivi de la dissipation d'énergie (QCM-D pour « Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring »). Après une excitation électrique de courte durée au cours de laquelle le quartz oscille à sa fréquence de résonance, la source de tension est déconnectée et on enregistre la décroissance de l'amplitude des oscillations (figure 1.8). Cette décroissance est plus rapide dans le cas d'un film visqueux qui dissipe plus d'énergie qu'un film rigide. Ces opérations sont réalisées en alternance plusieurs fois par seconde et les mesures sont effectuées sur plusieurs harmoniques.

Le facteur de dissipation, D , représentant la somme de toutes les pertes d'énergie dans le système, s'écrit :

$$D = \frac{E_{dissipée}}{2\pi E_{stockée}} \quad (3)$$

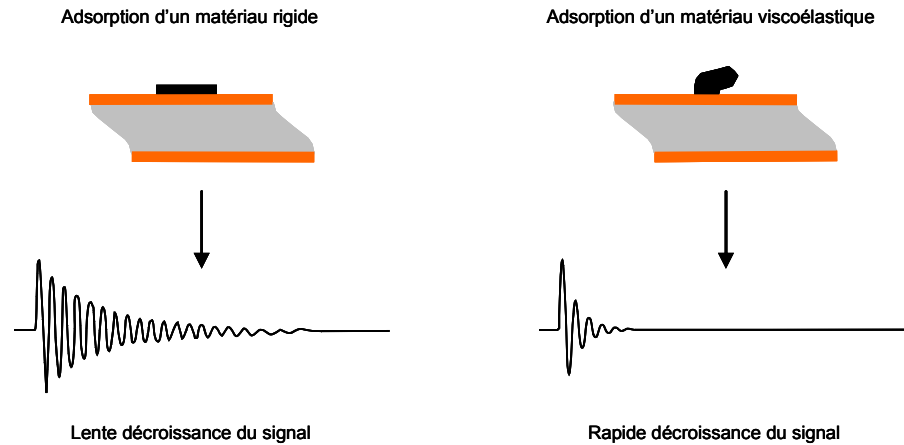


Figure n°1.8 : Représentation schématique du principe de fonctionnement de la microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation d'énergie (QCM-D)

La QCM-D a beaucoup apporté et a ensuite entraîné un nombre important d'études dans plusieurs domaines⁸⁸⁻⁹⁷. Cette méthode a été appliquée à la caractérisation des films multicouches autoassemblés et en particulier pour montrer que la croissance de films à partir de certains PE n'est pas linéaire mais exponentielle^{52,54,98-102}.

1.3.3 Electrochimie

Il existe, en électrochimie, plusieurs méthodes pour caractériser des films multicouches autoassemblés. Pour notre part, nous avons utilisé la voltampérométrie cyclique (VC) et la voltampérométrie sur électrode tournante (VET). Ces méthodes nous donnent accès à des informations sur les propriétés des matériaux étudiés principalement.

1.3.3.1 Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est sans doute la plus universelle des méthodes électrochimiques pour étudier les réactions électrochimiques. La VC permet de caractériser l'électroactivité d'un film autoassemblé possédant des propriétés redox (étude du transport de charge, du transfert d'électrons) ou dans le cas d'un assemblage électroinactif, l'utilisation de sondes redox, qui diffusent à travers le film jusqu'à la surface de l'électrode, permet d'étudier le transport de matière au sein des films et leur perméabilité.

Cette technique consiste à faire varier le potentiel (pris par rapport à une référence) entre deux valeurs, à une certaine vitesse (en $V.s^{-1}$) de balayage, lors d'un balayage aller et d'un balayage retour (constituant un cycle) et de mesurer l'évolution du courant lors de ces balayages. La figure 1.9 représente un exemple de courbe de voltampérométrie cyclique d'une espèce redox en solution.

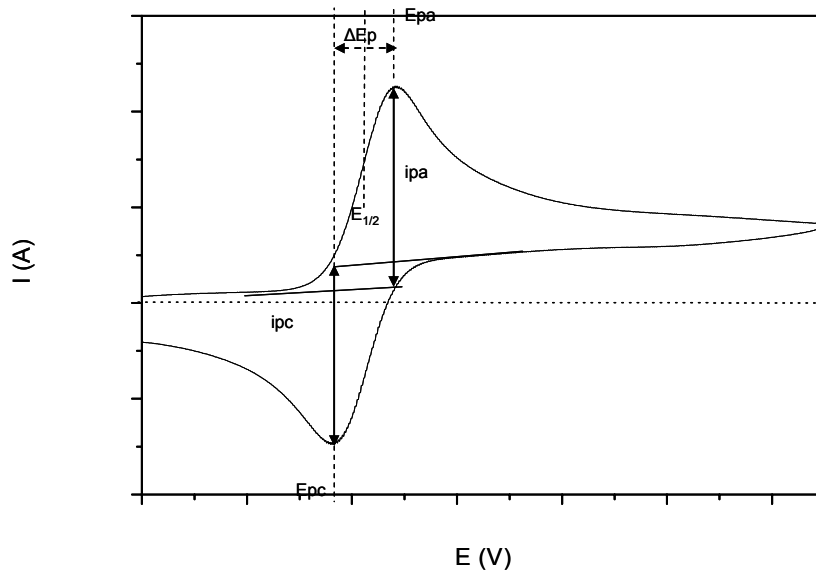


Figure n°1.9 : Exemple d'une courbe de voltampérométrie cyclique d'une espèce redox diffusant en solution, comportant les paramètres que l'on peut mesurer sur cette courbe, E_{pa} et E_{pc} , i_{pa} et i_{pc} .

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \quad (4)$$

$$E_{1/2} = \frac{1}{2}(E_{pa} + E_{pc}) \quad (5)$$

Sur la courbe de la figure 1.9, il est possible de mesurer plusieurs paramètres caractéristiques du système redox mis en jeu. Au potentiel du pic d'oxydation E_{pa} , on mesure le courant faradique anodique d'oxydation i_{pa} . Au potentiel du pic de réduction, on mesure le courant faradique i_{pc} . Le courant faradique est relié à la quantité d'espèce redox mesurée. Pour déterminer la nature d'une espèce redox, on mesure le potentiel $E_{1/2}$ (relation (5)) car il est caractéristique de chaque espèce redox. En mesurant la différence de potentiel, ΔE_p (relation (4)), il est possible de déterminer la réversibilité du système électronique étudié. Pour un système redox réversible, $\Delta E_p = 0,058/n$ (n étant le nombre d'électrons échangés lors de la réaction électrochimique mise en jeu). En étudiant la

réversibilité du système électrochimique utilisé, on a accès à la cinétique de transfert d'électrons et de transport de matière (diffusion).

Dans le cas d'une espèce redox adsorbée en monocouche à la surface de l'électrode, le transport de matière de l'espèce redox est négligeable et pour un système redox rapide et réversible, la vitesse de transfert d'électrons n'est pas l'étape limitante du processus électrochimique et $\Delta E_p=0$ (figure 1.10).

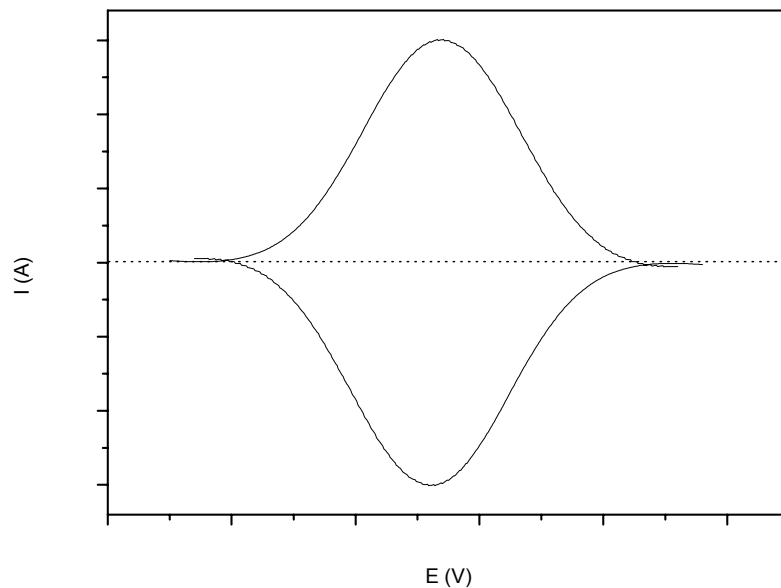


Figure n°1.10 : *Exemple d'une courbe de voltampérométrie cyclique pour un système redox rapide réversible, caractéristique d'une espèce adsorbée en couche mince à l'électrode*

Pour un film autoassemblé avec un polyélectrolyte contenant un groupement redox dans la chaîne polymère, on se trouve dans ce cas. Ainsi, en mesurant le courant faradique anodique (ou cathodique) et la charge anodique (ou cathodique) et en intégrant la surface du pic correspondant, on peut calculer la quantité d'électricité nécessaire à l'oxydation (ou à la réduction) de l'espèce redox immobilisée et en déduire la quantité de sites redox électrochimiquement accessibles au transfert d'électrons. Cette étude permet de suivre la construction de l'assemblage de ce PE redox avec une autre espèce de charge opposée, couche après couche^{40,103-109}.

Si les PE assemblés ne comportent pas de groupes redox dans leur chaîne, il est tout de même possible de caractériser le film autoassemblé par électrochimie. La réponse

électrochimique de sondes redox neutres, anioniques ou cationiques diffusant dans le film jusqu'à la surface de l'électrode, en VC nous renseigne sur le transport de matière dans les films et l'état de charge des films autoassemblés. Une méthode, autre que la VC, couramment utilisée est la voltampérométrie sur électrode tournante.

1.4.3.2 Voltampérométrie sur électrode tournante

Le principe, similaire à celui de la VC, est basé sur le fait que la rotation de l'électrode cylindrique autour de son axe de symétrie entraîne, sur une électrode disque, une aspiration du liquide dans lequel elle est immergée (figure 1.11).

L'avantage de cette méthode est que l'on peut contrôler l'apport de matière qui se fait par diffusion - convection hydrodynamique.

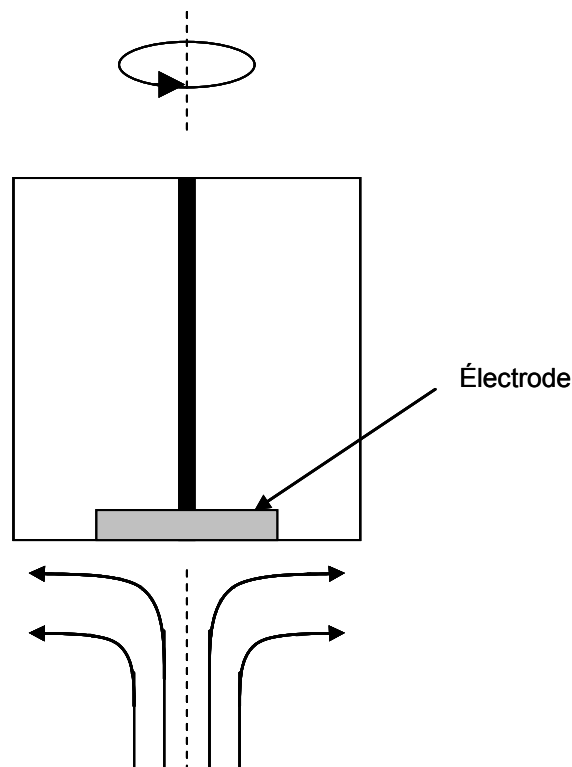


Figure n°1.11 : Schéma d'une électrode tournante

L'allure des courbes intensité-potentiel tracées en voltampérométrie sur électrode tournante, dans le cas de sondes redox en solution, est illustrée en figure 1.12.

Dans le cas d'une oxydation, si le potentiel imposé est suffisamment grand, le courant atteint une valeur limite (i_{lim}) correspondant à une limitation du processus électrochimique par l'apport de matière à l'électrode par diffusion - convection.

Le courant limite (anodique ou cathodique) que l'on mesure sur le palier horizontal de courant (figure 1.12), est proportionnel à la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode.

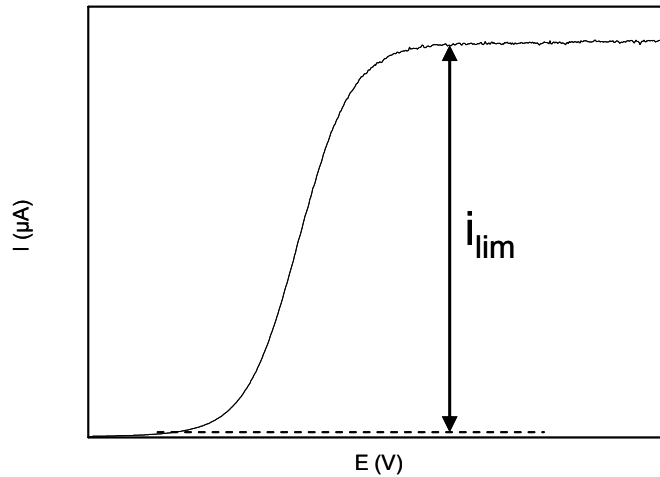


Figure n°1.12 : Exemple d'un voltampérogramme à balayage linéaire obtenu sur électrode tournante en présence d'une espèce redox en solution

L'expression de l'intensité du courant limite est nommée loi de Levich :

$$i_{\text{lim}} = 0.69nFD^{2/3}\nu^{1/6}AC\omega^{1/2} \quad (6)$$

Où n est le nombre d'électrons échangés lors du processus électrochimique mis en jeu, F est le faraday, A est la surface géométrique de l'électrode, D est le coefficient de diffusion en solution de l'espèce redox utilisée, ν est la viscosité cinématique ($10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour un milieu aqueux), C est la concentration en solution de l'espèce redox utilisée. La variation du courant avec la racine carrée de la vitesse de rotation nous permet de calculer le coefficient de diffusion de l'espèce redox en solution.

Comme nous le verrons à la page 32, cette méthode permet aussi de quantifier la perméabilité des assemblages multicouches.

1.4 Fonctionnalisation des surfaces d'électrode

La caractérisation d'assemblages électrostatiques de polyélectrolytes par électrochimie nécessite l'utilisation de surface conductrices électroniques. Pour réaliser un autoassemblage électrostatique couche par couche sur une surface d'électrode (comme

sur toute autre surface), il faut tout d'abord fonctionnaliser cette surface pour lui conférer une charge (positive ou négative) permanente.

Cette plateforme chargée positivement ou négativement est nécessaire pour l'ancrage de polyélectrolytes via la technique LbL ESA.

Il existe de nombreuses possibilités pour fonctionnaliser une surface par greffage d'une monocouche anionique ou cationique, qui dépendent de la nature de la surface étudiée.

Cependant, dans le cas où l'électrochimie est utilisée comme outil de caractérisation, il sera indispensable de vérifier que cette monocouche ne perturbe pas le transfert d'électron mis en jeu à l'interface électrode/film.

La majorité des travaux consacrés à la modification d'électrodes utilisent des surfaces de platine, d'oxyde de titane et d'étain, de carbone vitreux et d'or.

1.4.1 Platine

Différentes possibilités sont envisageables pour modifier une surface de platine : modification par une monocouche d'organosilanes sur une surface d'oxydes de platine ou greffage de thiols, comportant un groupement fonctionnel chargé en position terminale, sur une surface de platine. La formation d'une monocouche d'organosilanes n'est pas simple car elle dépend beaucoup de paramètres qu'il n'est pas toujours facile de contrôler, ce qui implique un manque de reproductibilité de ces monocouches¹¹⁰. Cependant, Finklea et al¹¹¹ ont utilisé cette méthode sur une surface de platine pour comparer les propriétés électrochimiques des monocouches qu'ils avaient obtenus sur une surface d'or. Quant aux thiols, il est connu que les composés soufrés ont une forte affinité avec les métaux de transition¹¹²⁻¹¹⁴, comme le platine¹¹⁵ ou l'or. Des assemblages électrostatiques de polystyrène sulfonate et de polydiallyldiméthylammonium ont été réalisés sur une surface d'électrode de platine modifié par du mercaptoethanesulfonate car ce composé permet de conférer une charge négative permanente à la surface d'électrode¹¹⁶. La quasi-totalité des analyses vis-à-vis du transfert électronique sur des surfaces métalliques modifiées par des monocouches autoassemblées (SAM pour SelfAssembled Monolayer) de thiol ont été réalisées sur des substrats d'or. Ce qui explique le faible nombre d'exemples où des électrodes de platine sont utilisées pour des autoassemblages. Néanmoins, on peut citer quelques travaux d'autoassemblages directs sur platine non fonctionnalisé, pour réaliser des membranes perm-sélectives¹¹⁷, des biocapteurs¹¹⁸ ou des matériaux électrochromes¹¹⁹.

1.4.2 Oxyde d'indium et d'étain (Indium Tin Oxide ITO)

Les électrodes ITO ont l'avantage d'être transparentes dans le domaine UV-Visible, ce qui permet, sur une même surface, de réaliser des mesures électrochimiques mais aussi spectroscopiques. En combinant les informations complémentaires obtenues par ces deux techniques, de telles surfaces peuvent être utilisées pour caractériser des matériaux électrochromes^{108,120} et des biocapteurs^{72,121-124} principalement, grâce aux caractéristiques optiques et électrochimiques des espèces que l'on désire assembler.

Malgré l'avantage de combiner deux méthodes d'analyse avec un même substrat, la réalisation d'autoassemblage sur des surfaces d'ITO est restreinte car leur utilisation n'est pas simple. En effet, cela demande des traitements chimiques lourds pour nettoyer et activer ces surfaces, comme un traitement par un plasma d'oxygène^{108,125}, ou différents acides¹²⁶⁻¹²⁸ ou encore, plus récemment, par un mélange d'eau oxygénée, d'hydroxyde d'ammonium et d'eau^{120,122,129,130}. Après ces traitements, la construction directe d'un assemblage électrostatique est possible. Il faut ajouter que ces traitements chimiques n'altèrent pas les propriétés opto-électrochimiques de ces surfaces.

1.4.3 Carbone vitreux

Il existe différents moyens de fonctionnaliser une surface d'électrode de carbone vitreux (GC) pour lui conférer une charge positive ou négative permanente. La première approche que l'on peut citer est celle de l'adsorption directe de PE sur une surface de GC. Certains travaux relatent la construction d'un biocapteur suivant cette méthode^{131,132} et montrent que les performances de ces biocapteurs ne dépendent pas de la taille de l'électrode ni de sa morphologie¹³². Cependant, il a été remarqué que cette méthode ne conduit pas à une bonne reproductibilité des mesures sur ces assemblages de PE¹³³. Suite à ces résultats, d'autres méthodes plus récentes ont été utilisées pour modifier ce type d'électrode. Une de ces stratégies utilise l'électrochimie pour greffer de façon covalente des groupements chimiques particuliers à la surface de carbone vitreux. L'oxydation de ces composés chimiques à la surface de carbone vitreux ne présente pas une bonne reproductibilité et rend la surface corrodable. Au lieu de réaliser cette oxydation, une autre stratégie a été développée par Pinson et al¹³⁴, en se basant sur la réduction électrochimique de sels de diazonium. Grâce à cette méthode, il est possible de mesurer le taux de recouvrement de la surface ainsi que de modifier les groupements chimiques terminaux pour obtenir certaines propriétés.

Sur le même principe, Dong et al¹³⁵⁻¹³⁸ ont montré que la modification d'électrodes de GC par l'acide 4-aminobenzoïque conduit aussi à un recouvrement reproductible de la surface. Lors de ces travaux, des études ont été effectuées pour connaître l'influence de cette modification de surface sur le transfert électronique avec différentes sondes redox. Il a été démontré que le comportement électrochimique de sondes chargées dépend de l'état de charge de la surface de l'électrode modifiée et qu'il est possible de contrôler le blocage de la surface, vis-à-vis du transfert électronique, en modifiant la charge des groupements greffés, en faisant varier le pH de la solution d'étude, en fonction du pKa de ces groupements. Grâce aux résultats de cette étude, cette méthode a été utilisée pour réaliser des autoassemblages électrostatiques de PE et d'autres espèces pour différentes applications^{135,137-141}.

D'autres travaux ont montré, en utilisant la méthode de Pinson et al¹³⁴, qu'il est possible de fabriquer un biocapteur à glucose en immobilisant la Gox dans un assemblage LbL sur une surface de carbone vitreux¹³³. Lors de ces études, il a été vérifié que la surface de GC modifiée par un sel de diazonium ne bloque pas l'accès des espèces qui diffusent à travers le film jusqu'à l'électrode et que les films sont réalisés de façon reproductible. Dans ces mêmes travaux, une autre méthode de fonctionnalisation a été étudiée par rapport au même film enzymatique. Elle est basée sur l'adsorption d'une couche immunologique, de façon similaire à la méthode développée par Bourdillon et al¹⁴². Cette couche immunologique repose sur la réaction d'un antigène (adsorbé en premier sur la surface de GC) avec l'anticorps correspondant conjugué à la glucose oxydase. Cette méthode présente la même reproductibilité que le greffage covalent d'un sel de diazonium mais également l'avantage d'immobiliser une plus grande quantité d'enzyme, ce qui améliore les performances du biocapteur à glucose réalisé.

Même si les surfaces d'électrodes de GC permettent de travailler dans une large fenêtre de potentiels, leur modification pour obtenir une charge permanente en surface, de façon reproductible, n'est pas très simple à mettre en œuvre. Peut-être est-ce pour cette raison que la majorité des travaux relatifs à la modification de surface d'électrodes ont été effectués avec des substrats en or.

1.4.4 Or

Il y a plusieurs raisons qui expliquent pourquoi l'or a été, historiquement, le plus utilisé comme substrat pour fabriquer des matériaux multicouches ou des monocouches autoassemblées. L'or est un métal relativement inerte, il peut tout aussi facilement

former des films minces que des colloïdes, ce qui lui permet d'être utilisé dans différentes techniques analytiques (SPR, QCM, ellipsométrie) et il est compatible avec les cellules, d'où son utilisation dans des applications biologiques¹⁴³.

La modification de surface d'or se fait essentiellement par des SAM, qui présentent une meilleure reproductibilité que l'adsorption directe de PE, comme dans le cas du carbone vitreux. Une grande partie des SAM formés sur des surfaces d'or a été effectuée avec des thiols car l'or peut former aisément des liaisons covalentes avec des atomes de soufre, selon la réaction présentée en figure 1.13., De plus, ce type de SAM est stable pour des périodes allant de quelques jours à plusieurs semaines¹⁴³.

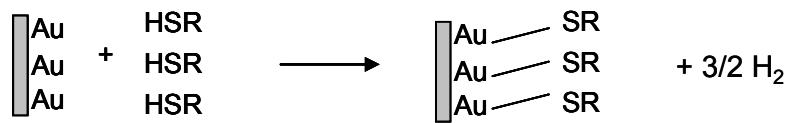


Figure n°1.13 : Réaction d'une surface d'or avec un thiol (RSH)

Depuis quelques années, il y a une explosion d'intérêt pour ces surfaces présentant des propriétés particulières grâce aux multiples possibilités de fonctionnalisation chimique des groupements terminaux. Cependant, il y a plusieurs paramètres à prendre en considération lors de la modification d'une surface d'or par une monocouche autoassemblée de thiol : solvant, concentration, temps d'immersion, température, etc. Un grand nombre d'études ont été dédiées à ce sujet et les relations entre les propriétés de ces SAM et ces paramètres ne sont pas encore toutes bien définies. De nombreux travaux font tout de même état d'une structure bien organisée et avec peu de défauts dans ces monocouches de thiols sur or¹⁴³. Ceci est également valable pour une grande variété de thiols. En effet, il est possible de fonctionnaliser le thiol par des groupements chimiques en position terminale en vue de conférer différentes propriétés à ces surfaces. Des surfaces d'or fonctionnalisées par un thiol¹⁴³ peuvent être utilisées comme modèles pour des surfaces biologiques, comme substrat pour la cristallisation ou encore dans le domaine de la photolithographie.

Les SAM sont aussi largement utilisées en électrochimie comme barrière énergétique au transport d'électrons¹⁴³. Dans ce cas, les SAM ω -fonctionnalisés ont souvent été utilisés comme transducteurs ampérométriques. Dans cette catégorie, le 3-mercaptopropanesulfonate a fait l'objet de diverses études. Il confère à l'or des caractéristiques d'hydrophilie, de non dépendance du pH et une charge négative. Ainsi

cette surface modifiée peut être utilisée comme plateforme pour l'adsorption électrostatique de films LbL pouvant être étudiés par des méthodes électrochimiques^{75,104,133,144-149}. Cependant, il n'y a que peu d'études qui ont été effectuées sur des monocouches de mercaptoalkylsulfonate du point de vue de leur structure et de leur comportement électrochimique. L'étude la plus complète a été menée par Mandler et al¹⁵⁰, où il est montré qu'une monocouche désorganisée de mercaptodécane-sulfonate a un comportement électrochimique particulier.

Un grand nombre d'applications sont possibles grâce à des films multicouches autoassemblés dans différents domaines : l'optoélectronique, la détection d'espèces chimiques et biologiques, la catalyse, l'analyse, pour ne citer que ceux-ci. Dans chacun de ces domaines, l'électrochimie est présente soit comme outil de caractérisation, soit comme application directe. L'intérêt de nos travaux de recherche réside dans ces deux possibilités d'utilisation de l'électrochimie. En effet, nous désirons développer de nouveaux matériaux d'électrodes par autoassemblage électrostatique LbL de différentes espèces. Il existe dans ce cas, plusieurs types d'espèces qui peuvent être autoassemblées.

1.5 Utilisation de l'électrochimie dans le cas d'assemblages LBL ESA de polyélectrolytes

Les applications que l'on peut viser dépendent de la nature des espèces, que ce soit des PE ou des nanoparticules (NP), ou des protéines, qui sont assemblées. Ces multiples applications concernent, par exemple, les domaines de l'optoélectronique, des matériaux semi-conducteurs, de la (bio)détection et du biomédical. Ceci offre un large choix des matériaux possibles. Plusieurs ouvrages et revues sont consacrés à la description d'exemples d'assemblages LbL^{6,35,151}. En se restreignant aux exemples mettant en jeu l'électrochimie comme outil de caractérisation, on trouve plusieurs applications possibles pour les systèmes électroluminescents, la catalyse, les capteurs et biocapteurs et les membranes permselectives.

1.5.1 Autoassemblage de polyélectrolytes électroactifs

Depuis ces dernières années, il y a un intérêt grandissant pour la fonctionnalisation des espèces autoassemblées par la technique LbL, en vue d'apporter de nouvelles propriétés

aux matériaux construits ou pour améliorer les propriétés existantes de ces matériaux. Pour un matériau de transduction, par exemple, il existe plusieurs possibilités pour améliorer ses performances, comme favoriser le transport de matière ou de charges, en augmentant la perméabilité, en faisant varier les conditions d'adsorption (pH ou force ionique), ou en rendant ces films utilisables comme membranes perméables vis-à-vis d'une espèce en particulier. Il est aussi envisageable de favoriser le transfert d'électrons. Pour cela, on peut modifier un PE par greffage ou synthétiser un polymère contenant des centres électroactifs. La plupart des groupes redox contenus dans ce type de polyélectrolytes, sont de trois types : le groupe ferrocène^{40,105-107,152}, le groupe à base de complexe bipyridinique d'osmium^{75,104,148,153-158} et le groupe viologène^{103,108,109,159,160} (voir figure 1.14).

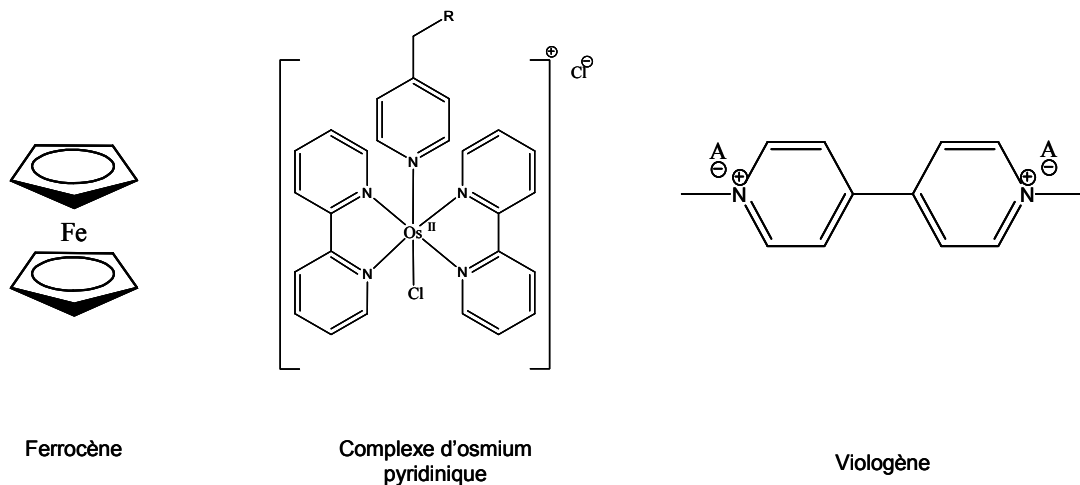


Figure n°1.14 : Schéma des groupes redox les plus étudiés et les plus utilisés pour modifier chimiquement un polyélectrolyte

On utilise ces groupes redox car le transfert est monoélectronique dans ces trois cas pour passer de la forme réduite à la forme oxydée ou inversement. Grâce à ces groupes redox immobilisés directement dans les assemblages, des études sur le transfert électronique au sein de ces films ont été réalisées. L'avantage de contenir un centre redox dans la chaîne polymère est que l'on peut suivre la construction du film autoassemblé par électrochimie^{40,103-109}. Il est également possible de caractériser le transfert de charge au sein de ces matériaux, ce qui permet ensuite d'améliorer les propriétés électroniques de tels matériaux⁷¹. D'autres études ont été menées, grâce à ces centres redox, pour contrôler la perméabilité de ces films¹⁰⁴.

Certains de ces assemblages de polyélectrolytes redox ont des propriétés électrochromes (dont la couleur dépend de leur état d'oxydation). L'électrochromisme représente un bon exemple de l'utilisation de systèmes électrochimiques obtenus par technique LbL. Ces systèmes sont de grande importance dans le domaine des vitres intelligentes, des encres électroniques par exemple. Un effort particulier a été mené pour réaliser de tels systèmes sur différents substrats, comme le plastique, le papier et même les textiles. Les techniques électrochimiques ont été utilisées pour connaître l'activité catalytique de ces groupements vis-à-vis d'une espèce en solution, comme la réaction entre les groupes viologènes et l'oxygène¹⁰³. Schlenoff et al¹⁰³ ont montré que des polyviologènes peuvent présenter des fonctions électrochromes, car ce type de polymère électroactif a une couleur relative à son état redox. Ils ont également montré que les propriétés électrochromes peuvent être contrôlées à façon, en sélectionnant les paramètres adéquats¹⁰⁹ (comme le type de PE redox utilisé).

D'autres PE présentent aussi cette caractéristique, comme le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT). Il se trouve qu'un bon compromis entre les différentes caractéristiques d'un matériau électrochrome est un assemblage entre le PEDOT et un polyviologène¹⁶¹.

Un des avantages de la technique LbL est que l'on peut assembler tout type d'espèces polychargées, ayant des propriétés électrochimiques intéressantes, et en particulier des polyoxométallates (POM), qui sont des clusters d'oxydes de métal. Ces oxydes ont été assemblés dans des multicouches, par Fendler et al¹⁶². Puis Möhwald et al ont optimisé leurs propriétés électrochromes en utilisant des composés à base d'euporium¹⁶³. En fonction de la couleur désirée, d'autres matériaux ont été fabriqués par autoassemblage LbL entre des PE et des POM à base de cérium¹²⁰, de cuivre et de fer¹²⁹ ou de cobalt¹²⁶ plus récemment.

Rusling a aussi développé un matériau ayant des propriétés électroluminescentes en autoassemblant des brins d'ADN avec un polyvinylpyridine ruthénium¹⁶⁴. Il s'avère que l'électroluminescence est directement obtenue par réaction catalytique du ruthénium avec des bases guanine de l'ADN. Grâce à cette caractéristique intéressante, ces matériaux peuvent trouver des applications dans la détection de l'ADN.

On peut cependant noter que cette fonctionnalité électrochrome est aussi liée à la catalyse, voire l'électrocatalyse par des composés présents dans ces assemblages.

Les propriétés catalytiques de certains composés, polymères ou particuliers, peuvent être mises à profit dans des assemblages LbL. En effet, en assemblant des PE redox,

dans la plupart des cas, avec d'autres espèces, on peut réaliser des films qui pourront catalyser certaines réactions chimiques et enzymatiques, dont on peut suivre l'évolution par électrochimie car certains des réactifs ou produits sont détectables à la surface d'une électrode. Anzaï et al ont construit des assemblages entre un polyallylamine modifié par un groupement ferrocène et du polyvinylsulfonate^{105,106}. Il a été montré, dans ces travaux, que ce type d'assemblage a la capacité de catalyser l'oxydation de l'acide ascorbique par voie électrochimique. Le suivi électrochimique de la construction de tels assemblages a pu démontrer que le mécanisme de transport électronique est fonction du nombre de couches. On a vu que dans des assemblages de PE, il y a une interpénétration des couches. Dans ces mêmes travaux, il a été remarqué que les chaînes de polymères contenant les groupements ferrocène peuvent pénétrer entre 3 et 4 couches d'un film interne isolant la surface d'électrode¹⁰⁶.

Des études sur un autoassemblage d'un polyvinylpyridine osmium avec des anions polytungstate^{138,140} ont été menées pour montrer les propriétés catalytiques de ces particules polyhétérométalliques vis-à-vis de la réduction du peroxyde d'hydrogène, de nitrite et d'ions bromate et de l'oxydation de l'acide ascorbique. Ici, ce n'est pas le PE redox qui catalyse ces réactions mais il est utilisé pour suivre la croissance du film et pour étudier le transport d'électrons au sein de ces assemblages. Ce suivi a confirmé la conservation de l'activité catalytique des anions polyhétérométalliques au sein de ces films.

De plus, ce type de PE électroactifs a été utilisé pour leurs propriétés electrocatalytiques car ces sondes sont utilisées en tant que médiateur artificiel dans des réactions enzymatiques mais aussi dans des réactions chimiques. Il existe bon nombre d'exemples utilisant cette caractéristique pour des applications de (bio)détection^{40,103,109,155}.

1.5.2 Autoassemblage de polyélectrolytes et de biomolécules

Parmi les biomolécules utilisées dans des films LbL, on trouve l'ADN, qui est utilisé dans des assemblages avec un polycation pour fabriquer un matériau pouvant créer un environnement biomimétique¹⁴¹. Mais dans la majorité des cas, des brins d'ADN sont utilisés comme polyanion dans des autoassemblages pour la détection d'espèces chimiques¹⁶⁵ ou biologiques¹³¹.

L'électrochimie est aussi utilisée dans des assemblages avec des protéines, comme l'hémoglobine pour la détection des nitrites¹⁶⁶ ou la myoglobine dont on peut suivre la construction car cette protéine contient un centre redox à base de fer¹⁶⁷.

La plupart des surfaces d'électrodes modifiées par des biomolécules impliquent des enzymes, dont l'application directe est la détection électrochimique des produits issus de la réaction enzymatique. L'adsorption des enzymes est réalisée à un pH adéquat, par rapport à leur point isoélectrique, pour lui conférer une charge positive ou négative. Il existe bon nombre d'exemples d'applications en biotechnologies, et en particulier dans le domaine des biocapteurs, où des architectures organisées d'enzymes sont utilisées. L'avantage de les utiliser dans des assemblages LbL est que l'on peut contrôler, à la fois la quantité d'enzyme immobilisée et la distribution spatiale des différents composants, en comparaison avec l'immobilisation de ces enzymes dans des hydrogels dont la structure ne peut être contrôlée à façon.

Le principe de fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique est présenté sur la figure 1.15. Dans l'exemple présenté, la forme active de l'enzyme est régénérée par un groupe redox dont le rôle est celui de relais d'électrons (médiateur) entre l'électrode et l'enzyme.

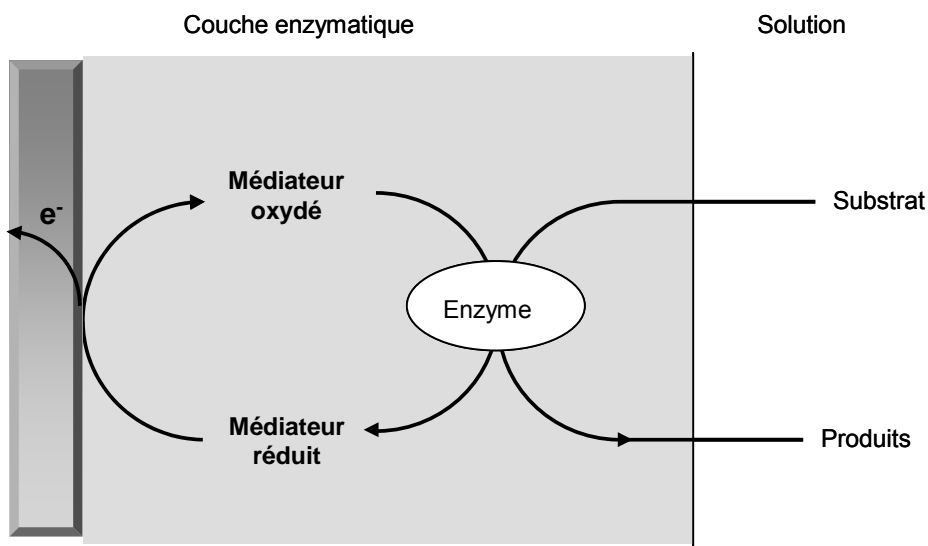


Figure n°1.15 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique avec médiation par une espèce redox

La détection ampérométrique du substrat de l'enzyme en solution est assurée par la mesure du courant d'oxydation du médiateur à l'état réduit.

L'évolution de la réponse en courant en fonction de la concentration en substrat en solution permet le tracé d'une courbe d'étalonnage dont la partie linéaire définit la sensibilité du biocapteur. Les performances analytiques^{40,171,173} du biocapteur dépendent de plusieurs paramètres, tels que l'accessibilité de l'enzyme au substrat (liée à la perméabilité du film), la rapidité du transfert d'électrons entre le médiateur redox et l'enzyme et le transfert d'électrons à l'interface électrode/film entre le médiateur redox et l'électrode.

La technique LbL se prête tout à fait à ce principe puisque l'on peut, dans un assemblage électrostatique, immobiliser des molécules qui peuvent réagir au contact d'un autre réactif, en conservant une activité non négligeable des enzymes immobilisées par rapport à d'autres techniques.

L'étude de chacune de ces étapes peut être réalisée par électrochimie. Ainsi, des études de perméabilité ont été réalisées dans ce sens pour comprendre comment se déroule le processus de diffusion au sein de ces assemblages^{71,171,173,174}.

Le premier exemple d'immobilisation d'enzyme dans un assemblage LbL appliqué à la construction d'un biocapteur, fut développé par Hodak et al⁴⁰. Il a été décrit, dans ces travaux, la médiation redox de la réaction enzymatique de la glucose oxydase (Gox) par un groupe ferrocène greffé sur le polycation immobilisant la Gox. Depuis, plusieurs enzymes ont été utilisées (Gox, cytochrome oxydase, fructose déshydrogénase, horeseradish peroxydase, alcool oxydase, lactate oxydase, soybean oxydase, polyphenol oxydase (PPO), cholestérol oxydase, cholestérol estérase, uricase, diaphorase, glucose-6-déshydrogénase, et catalase) et assemblées avec des PE redox^{75,76,148,155,157,168-173} ou non redox^{72,118,122,132,149,174-180}. En dehors d'études ampérométriques sur les performances des biocapteurs, ces articles traitent de la caractérisation de films enzymatiques par des mesures microgravimétriques et optiques mais peu décrivent des études cinétiques du processus électroenzymatique.

Cette médiation permet de travailler dans des gammes de potentiels plus facilement accessibles. Plusieurs études ont été réalisées dans ce sens. Calvo et al ont démontré l'activité catalytique des films de PE modifiés par ces centres redox avec la glucose oxydase (Gox)^{40,75}. Ces travaux ont montré qu'une grande proportion de Gox est électriquement reliée aux groupements redox et que l'activité de ces bioélectrodes augmente avec le nombre de couches déposées. La technique LbL permet de contrôler la quantité des espèces autoassemblées ainsi que leur activité par rapport à d'autres moyens d'immobiliser cette enzyme. Pishko et al ont confirmé ces observations avec

des assemblages entre un polyvinylpyridine osmium et la Gox ou la lactate oxydase^{157,159}. Popescu a même développé un modèle cinétique grâce aux mesures obtenues avec un film constitué de peroxydase et de polyvinylpyridine osmium pour comprendre comment se déroule le transfert électronique dans la réaction enzymatique mise en jeu¹⁷³.

1.5.3 Membranes permsélectives

Il faut noter que les études de perméabilité permettent de développer ces autoassemblages comme des membranes permsélectives.

La perméabilité d'un film peut être quantifiée par une étude électrochimique. Gough et Leypoldt¹⁸¹ ont étudié le transport de masse à travers un film modifiant la surface d'une électrode à disque tournant. Dans ce cas, l'expression du courant limite d'oxydation ou de réduction d'une espèce qui diffuse à travers la membrane ne suit plus la loi de Levich (relation (6)). L'expression de i_{lim} prend la forme de la relation de Koutecky-Levich (relation (7)). Il définit alors un paramètre, Pm , qui caractérise la perméabilité de la membrane (relation (8)).

$$\frac{1}{i_{lim}} = \frac{1}{nFA Pm C} + \frac{1}{0,69nFD^{2/3} \nu^{1/6} AC\omega^{1/2}} \quad (7)$$

$$Pm = \kappa \frac{D_f}{L} \quad (8)$$

Où n est le nombre d'électrons échangés lors du processus électrochimique mis en jeu, F , le nombre de Faraday, A , la surface géométrique de l'électrode, D , le coefficient de diffusion en solution de l'espèce redox mise en jeu, ν , la viscosité cinématique ($10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour un milieu aqueux), C , la concentration de l'espèce redox utilisée, ω , la vitesse de rotation de l'électrode tournante, i_{lim} , le courant limite mesuré sur le palier de la réaction électrochimique étudiée, Pm , la perméabilité du film adsorbé à l'électrode, κ , le coefficient de partage de l'espèce redox utilisée entre la solution et le film étudié, D_f , le coefficient de diffusion de l'espèce redox utilisée dans le film étudié et L , l'épaisseur du film étudié.

La diffusion d'une espèce à travers un film dépend de la nature du film : nature des espèces autoassemblées, conditions d'assemblage (pH, force ionique des solutions d'immersion, temps d'immersion), charge en surface, séchage, etc. Bruening et al^{182,183} ont montré que le contrôle de ces paramètres, influençant la perméabilité d'un film de

polyallylamine non modifié avec un polyallylamine chimiquement modifié, est important pour créer des membranes séparatrices d'ions. D'autres travaux avec plusieurs types de PE, de sondes redox et d'électrolytes décrivent que le choix de tous ces paramètres détermine la perméabilité des membranes de séparation^{117,184}.

Comme ces membranes sont sélectives à la perméation de certains ions, il est possible d'envisager de piéger et même concentrer ces ions dans des films autoassemblés, ce qui permettrait ensuite d'obtenir des propriétés de relargage contrôlé de ces espèces dans un autre milieu. Schaaf et al^{185,186} ont montré qu'il est possible d'immobiliser des ions ferrocyanure dans un film de polyacide glutamique ou de polystyrène sulfonate et de polyallylamine et de contrôler le relargage de ces ions dans une autre solution électrolytique.

Ces membranes sont aussi beaucoup utilisées dans le domaine du biomédical^{77,100,101,187-189}. Il a été montré qu'en ajustant la force ionique du milieu, il est possible de contrôler le mécanisme de croissance, qu'il soit linéaire ou exponentiel^{52,54,98-100,187}. Ainsi, avec des polymères chargés biocompatibles, il est possible, en contrôlant la force ionique et le pH du milieu et donc l'épaisseur des films, de réaliser des matériaux ayant des propriétés antimicrobiennes particulières¹⁰⁰.

1.6 Autoassemblage de polyélectrolytes et de nanoparticules

De nombreux travaux font référence à l'utilisation de nanoparticules. Il en existe de toute sorte : sphérique ou plane, organique ou inorganique. L'avantage d'intégrer des nanoparticules est qu'il est possible d'élargir le champ d'applications des autoassemblages électrostatiques grâce aux propriétés inhérentes à ces nanoparticules (NP) dans les domaines de l'optique, de l'électronique et des capteurs^{3,190-196}. Comme pour tout autre type d'autoassemblage, il est nécessaire de contrôler différents paramètres en vue de travailler dans des conditions optimales pour contrôler l'épaisseur de ces films contenant des NP¹⁹⁷. La technique LbL est particulièrement avantageuse pour cela et l'on peut ainsi construire des films nanostructurés stables¹⁹⁸. On a vu que le choix d'utiliser des PE dans ces autoassemblages permet une bonne cohésion des films obtenus mais aussi de recouvrir les irrégularités d'une surface. On a aussi remarqué que l'on n'obtient pas de stratification des matériaux avec uniquement des PE, dans des conditions normales d'utilisation (milieu tamponné, à force ionique constante, temps

d'adsorption maximal). Ceci provient de l'interpénétration des couches les unes dans les autres, due à un enchevêtrement des chaînes macromoléculaires. Ce phénomène peut conduire à une croissance non linéaire des films. On aurait pu penser que d'utiliser des NP pouvait mener à une stratification partielle de ces films, de part l'éloignement de deux couches de PE successives, séparées par une couche de NP d'une épaisseur souvent plus grande que celle d'un PE. Plusieurs travaux ont montré que, par des mesures spectroscopiques, il y a une dépendance linéaire de l'absorbance, à la longueur d'absorption caractéristique correspondante au type de NP utilisées, en fonction du nombre de couches^{4,156,199-203}. Ceci signifie que la quantité de NP adsorbées à chaque étape est constante. L'utilisation de NP permet d'avoir une croissance linéaire des films avec le nombre de couches, mêmes dans des milieux à force ionique élevée. Cette croissance, sur des substrats plans, a été observée pour différents types de NP : CdS²⁰⁴⁻²⁰⁶, CdSe^{15,207,208}, CdTe^{206,209}, PbS²¹⁰, TiO₂^{204,205,208,210-213}, ZrO₂²¹⁴, Ag^{204,215}, Au²¹⁶⁻²¹⁹, SiO₂^{220,221}, MoO₂²²², Polyoxometallates^{162,200}, HgTe²²³, Fe₃O₄^{197,224}, etc.

Les résultats observés par spectroscopie UV-Visible ont été confirmés par la mesure de l'épaisseur des films en fonction du nombre de couches, que ce soit par ellipsométrie²¹⁶ ou par microbalance à quartz^{221,225}. Dans la plupart des cas étudiés, l'incrément d'augmentation de l'épaisseur correspond à une monocouche que ce soit pour le PE ou pour les NP²²⁶⁻²²⁸ mais cela n'est pas toujours le cas. Par exemple, des couches de NP de HgTe correspondent à deux voire trois monocouches denses de ces NP²²³. Cette caractéristique a aussi été observée pour des NP d'or stabilisées par du citrate ainsi que pour des colloïdes de latex, quand un sel est ajouté à la dispersion colloïdale. Dans d'autres cas, l'épaisseur mesurée pour une couche de NP est inférieure à celle d'une monocouche dense. Ceci a été montré avec des NP d'yttrium-fer-grenat (YFG)^{35,229}. Au fur et à mesure de la croissance du film, des îlots se forment. Leur taille augmente avec le nombre de couches déposées. La croissance du film se déroule par expansion latérale. L'augmentation de la taille de ces îlots correspond à une augmentation de la quantité de NP. Or les mesures spectroscopiques nous indiquent une croissance linéaire. Il y a donc un effet de compensation qui réduit la quantité de particules adsorbées lors de la croissance du film. Cette compensation peut avoir lieu suivant différents mécanismes : (i) il y a une désorption partielle des particules précédemment adsorbées durant l'adsorption du PE²³⁰ ; (ii) la répulsion électrostatique augmente entre les composants de même charge²³¹⁻²³⁵ ; (iii) il existe une dépendance de la quantité de matière adsorbée avec la rugosité du film.

Pour comprendre pourquoi la superposition de ces mécanismes résulte en une augmentation linéaire, il est nécessaire d'étudier les processus moléculaires mis en jeu dans la technique LbL.

Récemment, quelques aperçus significatifs de ces processus d'autoassemblage LbL^{7,236-238} ont été rapportés. Majoritairement, il a été montré que ce sont les interactions secondaires qui sont responsables de ce type de phénomène. Il faut noter que ces interactions secondaires proviennent du stabilisant utilisé pour les solutions colloïdales de NP^{40,214,216,232,239-242}. La compréhension de ces interactions permet d'obtenir les propriétés désirées. Comme pour les PE, ces interactions secondaires peuvent être influencées par le pH et la force ionique du milieu dans lequel les NP se trouvent. Par exemple, de la même manière que pour un assemblage de PE, si on augmente la force ionique, l'effet d'écran de charges des NP augmente aussi, ce qui a pour conséquence d'augmenter la densité de NP dans chaque couche⁷⁴ mais pas d'éviter l'expansion latérale.

Un autre paramètre qui a une influence sur la densité d'adsorption de NP est leur forme. Pour une nanoparticule sphérique, la surface spécifique d'interaction avec le substrat est moins importante pour dans le cas de particules planes. Ainsi, il y a une augmentation de la densité de NP par couche, ce qui explique que des autoassemblages de particules planes ont de meilleures performances dans le domaine des matériaux semi-conducteurs car le transfert de charge est facilité. Outre la forme des NP, leur taille peut influencer leur adsorption. Akashi et al^{73,74} ont montré que, pour des nanosphères de polystyrène, plus leur taille est grande, plus le recouvrement de la surface est important.

En faisant varier ces paramètres (pH, force ionique, forme et taille des NP, stabilisant des colloïdes), on peut contrôler la structure des films obtenus, ce qui déterminera telle ou telle propriété du matériau ainsi construit.

La grande majorité des travaux consacrés à l'étude d'autoassemblage de PE et de NP a été réalisée par différentes méthodes autres que des méthodes électrochimiques, alors que l'utilisation de l'électrochimie permet de comprendre le mécanisme de transport de charge au sein d'un assemblage de PE et de NP conductrice électronique ou isolante. Or cela est nécessaire pour le développement de nouveaux transducteurs, pouvant trouver des applications dans les domaines de l'analyse (capteurs chimiques et biologiques), de l'optoélectronique, etc. C'est dans cette optique que nous avons construit de nouveaux matériaux d'électrodes, par autoassemblage LbL de PE et de NP.

1.7 Conclusion

Nous avons remarqué, dans ce chapitre, que la fonctionnalisation de la surface d'électrode est une étape importante pour l'amorçage d'un autoassemblage électrostatique couche par couche. Cette étape modifie les propriétés physiques et chimiques de la surface. Il est important de connaître ces effets pour obtenir une surface d'électrode modifiée de façon reproductible et comprendre les phénomènes de transport de charge et de matière dans les films adsorbés sur cette surface.

Il est également important de contrôler différents paramètres, comme le pH et la force ionique des solutions de polyélectrolytes, ainsi que la nature de ceux-ci car ils influencent la structure et donc les propriétés des assemblages obtenus car nous avons vu que ces informations sont reliées. De plus, en fonction de l'application visée, il est important de bien choisir les espèces à assembler.

Pour caractériser complètement un film autoassemblé, il est nécessaire d'employer plusieurs techniques complémentaires car les résultats donnés par ces différentes techniques permettent d'établir des relations entre la structure et les propriétés des matériaux construits. Parmi toutes ces techniques, l'électrochimie est un outil de caractérisation particulièrement intéressant grâce aux multiples informations qu'elle permet d'obtenir.

Références chapitre 1

- [1] Iler, R. K.; *J. Colloid Interf. Sci.* **1966**, *21*, 569-594.
- [2] Lee, H.; Kepley, L. J.; Hong, H. G.; Mallouk, T. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 618-620.
- [3] Decher, G.; Hong, J. D. *Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 1430-1434.
- [4] Decher, G. *Science (Washington, D. C.)* **1997**, *277*, 1232-1237.
- [5] Schlenoff, J. B.; Ly, H.; Li, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7626-7634.
- [6] Arys, X.; Jonas, A. M.; Laschewsky, A.; Legras, R. *Supramolecular Polymers* **2000**, 505-563.
- [7] Hammond, P. T. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *4*, 430-442.
- [8] Kotov, N. A. *Nanostruct. Mater.* **1999**, *12*, 789-796.
- [9] Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Macromolecules* **1999**, *32*, 8153-8160.
- [10] Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 3422-3426.
- [11] Lvov, Y. M.; Lu, Z.; Schenkman, J. B.; Zu, X.; Rusling, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4073-4080.
- [12] Chen, K. M.; Jiang, X.; Kimerling, L. C.; Hammond, P. T. *Langmuir* **2000**, *16*, 7825-7834.
- [13] Fulda, K.-U.; Kampes, A.; Krasemann, L.; Tieke, B. *Thin Solid Films* **1998**, *327-329*, 752-757.
- [14] Musick, M. D.; Pena, D. J.; Botsko, S. L.; McEvoy, T. M.; Richardson, J. N.; Natan, M. J. *Langmuir* **1999**, *15*, 844-850.
- [15] Cassagneau, T.; Mallouk, T. E.; Fendler, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7848-7859.
- [16] Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Lichtenfeld, H.; Knippel, E.; Knippel, M.; Budde, A.; Mohnwald, H. *Colloid Surface A* **1998**, *137*, 253-266.
- [17] Caruso, F.; Donath, E.; Mohnwald, H. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2011-2016.
- [18] Caruso, F.; Caruso, R. A.; Mohnwald, H. *Science (Washington, D. C.)* **1998**, *282*, 1111-1114.

- [19] Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Davis, S.; Lichtenfeld, H.; Caruso, F.; Popov, V. I.; Mohwald, H. *Polym. Advan. Technol.* **1998**, *9*, 759-767.
- [20] Voigt, A.; Lichtenfeld, H.; Sukhorukov, G. B.; Zastrow, H.; Donath, E.; Baeumler, H.; Moehwald, H. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38*, 4037-4043.
- [21] Caruso, F.; Schueler, C.; Kurth, D. G. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3394-3399.
- [22] Caruso, F.; Lichtenfeld, H.; Donath, E.; Moehwald, H. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2317-2328.
- [23] Kurth, D. G.; Caruso, F.; Schuler, C. *Chem. Commun. (Cambridge)* **1999**, 1579-1580.
- [24] Caruso, F.; Lichtenfeld, H.; Giersig, M.; Moehwald, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8523-8524.
- [25] Caruso, F.; Moehwald, H. *Langmuir* **1999**, *15*, 8276-8281.
- [26] Caruso, R. A.; Susha, A.; Caruso, F. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 400-409.
- [27] Rhodes, K. H.; Davis, S. A.; Caruso, F.; Zhang, B.; Mann, S. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 2832-2834.
- [28] Caruso, F.; Susha, A. S.; Giersig, M.; Mohwald, H. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **1999**, *11*, 950-953.
- [29] Caruso, F.; Spasova, M.; Susha, A.; Giersig, M.; Caruso, R. A. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 109-116.
- [30] Caruso, F.; Shi, X.; Caruso, R. A.; Susha, A. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **2001**, *13*, 740-744.
- [31] Gittins, D. I.; Susha, A. S.; Schoeler, B.; Caruso, F. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **2002**, *14*, 508-512.
- [32] Caruso, F.; Spasova, M.; Salgueirino-Maceira, V.; Liz-Marzan, L. M. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **2001**, *13*, 1090-1094.
- [33] Susha, A. S.; Caruso, F.; Rogach, A. L.; Sukhorukov, G. B.; Kornowski, A.; Mohwald, H.; Giersig, M.; Eychmuller, A.; Weller, H. *Colloid Surface A* **2000**, *163*, 39-44.
- [34] Rogach, A.; Susha, A.; Caruso, F.; Sukhorukov, G.; Kornowski, A.; Kershaw, S.; Mohwald, H.; Eychmuller, A.; Weller, H. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **2000**, *12*, 333-337.
- [35] Decher, G.; Schlenoff, J. B. *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, 2003.

- [36] Caruso, F.; Moehwald, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6039-6046.
- [37] Schuler, C.; Caruso, F. *Macromol. Rapid Comm.* **2000**, *21*, 750-753.
- [38] Caruso, F.; Fiedler, H.; Haage, K. *Colloid Surface A* **2000**, *169*, 287-293.
- [39] Lvov, Y.; Caruso, F. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4212-4217.
- [40] Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, K.; Bartlett, P. N. *Langmuir* **1997**, *13*, 2708-2716.
- [41] Wu, A.; Yoo, D.; Lee, J. K.; Rubner, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4883-4891.
- [42] Joly, S.; Kane, R.; Radzilowski, L.; Wang, T.; Wu, A.; Cohen, R. E.; Thomas, E. L.; Rubner, M. F. *Langmuir* **2000**, *16*, 1354-1359.
- [43] Wang, T. C.; Chen, B.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. *Langmuir* **2001**, *17*, 6610-6615.
- [44] Schlenoff, J. B.; Dubas, S. T. *Macromolecules* **2001**, *34*, 592-598.
- [45] Schmitt, J.; Gruenewald, T.; Decher, G.; Pershan, P. S.; Kjaer, K.; Loesche, M. *Macromolecules* **1993**, *26*, 7058-7063.
- [46] Tarabia, M.; Hong, H.; Davidov, D.; Kirstein, S.; Steitz, R.; Neumann, R.; Avny, Y. *J. Appl. Phys.* **1998**, *83*, 725-732.
- [47] McAloney, R. A.; Sinyor, M.; Dudnik, V.; Goh, M. C. *Langmuir* **2001**, *17*, 6655-6663.
- [48] Bertrand, P.; Jonas, A.; Laschewsky, A.; Legras, R. *Macromol. Rapid Comm.* **2000**, *21*, 319-348.
- [49] Lvov, Y.; Decher, G.; Moehwald, H. *Langmuir* **1993**, *9*, 481-486.
- [50] Decher, G.; Schmitt, J. *Prog. Coll. Pol. Sci.* **1992**, *89*, 160-164.
- [51] Caruso, F.; Rodda, E.; Furlong, D. N.; Niikura, K.; Okahata, Y. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2043-2049.
- [52] Huebsch, E.; Ball, V.; Senger, B.; Decher, G.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Langmuir* **2004**, *20*, 1980-1985.
- [53] Lavalle, P.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C. *Macromolecules* **2002**, *35*, 4458-4465.
- [54] Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Lavalle, P. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12531-12535.
- [55] Cady, W. G. *Piezoelectricity; an Introduction to the Theory and Applications of Electromechanical Phenomena in Crystals. Revised ed.* 1964.

- [56] Sauerbrey, G. *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206-222.
- [57] Webber, L. M.; Hlavay, J.; Guilbault, G. G. *Mikrochim. Acta* **1978**, *1*, 351-358.
- [58] Guilbault, G. G. *Anal. Proc.* **1982**, *19*, 68-70.
- [59] Guilbault, G. G. *Ion Sel. Electrode R.* **1980**, *2*, 3-16.
- [60] Hlavay, J.; Guilbault, G. G. *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 1890-1898.
- [61] Alder, J. F.; McCallum, J. J. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* **1983**, *108*, 1169-1189.
- [62] Nomura, T.; Hattori, O. *Anal. Chim. Acta* **1980**, *115*, 323-326.
- [63] Nomura, T.; Okuhara, M. *Anal. Chim. Acta* **1982**, *142*, 281-284.
- [64] Muratsugu, M.; Ohta, F.; Miya, Y.; Hosokawa, T.; Kurosawa, S.; Kamo, N.; Ikeda, H. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2933-2937.
- [65] Redepenning, J.; Schlesinger, T. K.; Mechalke, E. J.; Puleo, D. A.; Bizios, R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3378-3381.
- [66] Tjaernhage, T.; Puu, G. *Colloid Surface B* **1996**, *8*, 39-50.
- [67] Caruso, F.; Furlong, D. N.; Kingshott, P. J. *Colloid Interf. Sci.* **1997**, *186*, 129-140.
- [68] Steinem, C.; Janshoff, A.; Wegener, J.; Ulrich, W.-P.; Willenbrink, W.; Sieber, M.; Galla, H.-J. *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, *12*, 787-808.
- [69] Fawcett, N. C.; Craven, R. D.; Zhang, P.; Evans, J. A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2876-2880.
- [70] Okahata, Y.; Kawase, M.; Niikura, K.; Ohtake, F.; Furusawa, H.; Ebara, Y. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1288-1296.
- [71] Rusling, J. F.; Forster, R. J. *J. Colloid Interf. Sci.* **2003**, *262*, 1-15.
- [72] Ram, M. K.; Bertonecello, P.; Ding, H.; Paddeu, S.; Nicolini, C. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 849-856.
- [73] Serizawa, T.; Takeshita, H.; Akashi, M. *Langmuir* **1998**, *14*, 4088-4094.
- [74] Serizawa, T.; Kamimura, S.; Akashi, M. *Colloid Surface A* **2000**, *164*, 237-245.
- [75] Forzani, E. S.; Otero, M.; Perez, M. A.; Teijelo, M. L.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 4020-4029.
- [76] Calvo, E. J.; Etchenique, R.; Pietrasanta, L.; Wolosiuk, A.; Danilowicz, C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1161-1168.

- [77] Picart, C.; Lavalle, P.; Hubert, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C. *Langmuir* **2001**, *17*, 7414-7424.
- [78] Pardo-Yissar, V.; Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I. *Langmuir* **2001**, *17*, 1110-1118.
- [79] Zhou, X. C.; Huang, L. Q.; Li, S. F. Y. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 85-95.
- [80] Dante, S.; Advincula, R.; Frank, C. W.; Stroeve, P. *Langmuir* **1999**, *15*, 193-201.
- [81] Etchenique, R. A.; Calvo, E. J. *Electrochem. Commun.* **1999**, *1*, 167-170.
- [82] Orata, D.; Buttry, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3574-3581.
- [83] Vogt, B. D.; Lin, E. K.; Wu, W.-L.; White, C. C. *J. Phy. Chem. B* **2004**, *108*, 12685-12690.
- [84] Martin, S. J.; Granstaff, V. E.; Frye, G. C. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2272-2281.
- [85] Bruckenstein, S.; Michalski, M.; Fensore, A.; Li, Z.; Hillman, A. R. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1847-1852.
- [86] Rodahl, M.; Hook, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 3924-3930.
- [87] Rodahl, M.; Kasemo, B. *Rev. Sci. Instrum.* **1996**, *67*, 3238-3241.
- [88] Rodahl, M.; Hook, F.; Fredriksson, C.; Keller, C. A.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Voinova, M.; Kasemo, B. *Faraday Discuss.* **1997**, *107*, 229-246.
- [89] Fredriksson, C.; Kihlman, S.; Rodahl, M.; Kasemo, B. *Langmuir* **1998**, *14*, 248-251.
- [90] Vikinge, T. P.; Hansson, K. M.; Sandstrom, P.; Liedberg, B.; Lindahl, T. L.; Lundstrom, I.; Tengvall, P.; Hook, F. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 605-613.
- [91] Hook, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Langmuir* **1998**, *14*, 729-734.
- [92] Otzen, D. E.; Oliveberg, M.; Hook, F. *Colloid Surface B* **2003**, *29*, 67-73.
- [93] Zhdanov, V. P.; Keller, C. A.; Glasmaster, K.; Kasemo, B. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 900-909.

- [94] Plunkett, M. A.; Claesson, P. M.; Rutland, M. W. *Langmuir* **2002**, *18*, 1274-1280.
- [95] Stalgren, J. J. R.; Eriksson, J.; Boschkova, K. *J. Colloid Interf. Sci.* **2002**, *253*, 190-195.
- [96] Debreczeny, M.; Ball, V.; Boulmedais, F.; Szalontai, B.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12734-12739.
- [97] Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2004**, *20*, 4609-4613.
- [98] Lavallo, P.; Picart, C.; Mutterer, J.; Gergely, C.; Reiss, H.; Voegel, J.-C.; Senger, B.; Schaaf, P. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 635-648.
- [99] Boulmedais, F.; Ball, V.; Schwinte, P.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C. *Langmuir* **2003**, *19*, 440-445.
- [100] Richert, L.; Lavallo, P.; Payan, E.; Shu, X. Z.; Prestwich, G. D.; Stoltz, J.-F.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C. *Langmuir* **2004**, *20*, 448-458.
- [101] Thierry, B.; Faghihi, S.; Torab, L.; Pike, G. B.; Tabrizian, M. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **2005**, *17*, 826-830.
- [102] Thierry, B.; Kujawa, P.; Tkaczyk, C.; Winnik, F. M.; Bilodeau, L.; Tabrizian, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1626-1627.
- [103] Stepp, J.; Schlenoff, J. B. *J. Electrochem. Soc.* **1997**, *144*, L155-L157.
- [104] Calvo, E. J.; Wolosiuk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8490-8497.
- [105] Liu, A.; Anzai, J. *Langmuir* **2003**, *19*, 4043-4046.
- [106] Liu, A.; Kashiwagi, Y.; Anzai, J.-i. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1139-1142.
- [107] Hempenius, M. A.; Peter, M.; Robins, N. S.; Kooij, E. S.; Vancso, G. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 7629-7634.
- [108] DeLongchamp, D. M.; Kastantin, M.; Hammond, P. T. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1575-1586.
- [109] Schlenoff, J. B.; Laurent, D.; Ly, H.; Stepp, J. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **1998**, *10*, 347-349.
- [110] Ulman, A. *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **1996**, *96*, 1533-1554.
- [111] Finklea, H. O.; Robinson, L. R.; Blackburn, A.; Richter, B.; Allara, D.; Bright, T. *Langmuir* **1986**, *2*, 239-244.
- [112] Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 437-463.
- [113] Folkers, J. P.; Zerkowski, J. A.; Laibinis, P. E.; Seto, C. T.; Whitesides, G. M. *ACS Sym. Ser.* **1992**, *499*, 10-23.

- [114] Whitesides, G. M.; Ferguson, G. S. *Chemtracts: Organic Chemistry* **1988**, *1*, 171-187.
- [115] Shimazu, K.; Sato, Y.; Yagi, I.; Uosaki, K. *B. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 863-865.
- [116] Rmaile, H. H.; Farhat, T. R.; Schlenoff, J. B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14401-14406.
- [117] Rmaile, H. H.; Schlenoff, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6602-6603.
- [118] Hoshi, T.; Saiki, H.; Anzai, J.-i. *Talanta* **2003**, *61*, 363-368.
- [119] Li, D.; Jiang, Y.; Li, C.; Wu, Z.; Chen, X.; Li, Y. *Polymer* **1999**, *40*, 7065-7070.
- [120] Gao, G.; Xu, L.; Wang, W.; An, W.; Qiu, Y. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2024-2029.
- [121] Ram, M. K.; Adami, M.; Paddeu, S.; Nicolini, C. *Nanotechnology* **2000**, *11*, 112-119.
- [122] Shi, L.; Lu, Y.; Sun, J.; Zhang, J.; Sun, C.; Liu, J.; Shen, J. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1161-1167.
- [123] Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Cordeiro, M. R.; Constantino, C. J. L.; Balogh, D. T.; Zanatta, A. R.; Moreira, W. C.; Oliveira, O. N., Jr. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 3733-3737.
- [124] Paddon, C. A.; Marken, F. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 1249-1253.
- [125] Tokuhisa, H.; Hammond, P. T. *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13*, 831-839.
- [126] Feng, Y.; Peng, J.; Han, Z.; Ma, H. *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *286*, 589-595.
- [127] Wang, L.; Omomo, Y.; Sakai, N.; Fukuda, K.; Nakai, I.; Ebina, Y.; Takada, K.; Watanabe, M.; Sasaki, T. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2873-2878.
- [128] Wang, X.; Naka, K.; Itoh, H.; Uemura, T.; Chujo, Y. *Macromolecules* **2003**, *36*, 533-535.
- [129] Gao, G.; Xu, L.; Wang, W.; An, W.; Qiu, Y.; Wang, Z.; Wang, E. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8948-8953.
- [130] Wang, L.; Xiao, D.; Wang, E.; Xu, L. *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *285*, 435-442.
- [131] Lu, L.-P.; Wang, S.-Q.; Lin, X.-Q. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *519*, 161-166.

- [132] Sun, C.; Li, W.; Sun, Y.; Xi, Z.; Shen, J. *Electrochim. Acta* **1999**, *44*, 3401-3407.
- [133] Ferreyra, N.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 477-484.
- [134] Delamar, M.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5883-5884.
- [135] Liu, J.; Cheng, L.; Song, Y.; Liu, B.; Dong, S. *Langmuir* **2001**, *17*, 6747-6750.
- [136] Zhai, S.; Liu, J.; Jiang, J.; Dong, S. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1165-1170.
- [137] Zhai, S.; Chen, Y.; Wang, S.; Jiang, J.; Dong, S.; Li, J. *Talanta* **2004**, *63*, 927-931.
- [138] Zhai, S.; Gong, S.; Jiang, J.; Dong, S.; Li, J. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *486*, 85-92.
- [139] Zhang, M.; Yan, Y.; Gong, K.; Mao, L.; Guo, Z.; Chen, Y. *Langmuir* **2004**, *20*, 8781-8785.
- [140] Chen, X.; Jia, J.; Dong, S. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 608-612.
- [141] Luo, L.; Liu, J.; Wang, Z.; Yang, X.; Dong, S.; Wang, E. *Biophys. Chem.* **2001**, *94*, 11-22.
- [142] Bourdillon, C.; Demaille, C.; Gueris, J.; Moiroux, J.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12264-12269.
- [143] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* **2005**, *105*, 1103-1169.
- [144] Coche-Guerente, L.; Labbe, P.; Mengeaud, V. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3206-3218.
- [145] Ferreyra, N. F.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P.; Calvo, E. J.; Solis, V. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 3864-3874.
- [146] Calvo, E. J.; Danilowicz, C.; Forzani, E.; Wolosiuk, A.; Otero, M. *Compr. Anal. Chem.* **2003**, *39*, 327-376.
- [147] Calvo, E. J.; Forzani, E.; Otero, M. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *538-539*, 231-241.
- [148] Forzani, E. S.; Perez, M. A.; Teijelo, M. L.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 9867-9873.
- [149] Forzani, E. S.; Solis, V. M.; Calvo, E. J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5300-5307.

- [150] Turyan, I.; Mandler, D. *Isr. J. Chem.* **1997**, *37*, 225-233.
- [151] Hammond, P. T. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **2004**, *16*, 1271-1293.
- [152] Liu, A.; Anzai, J.-i. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 98-103.
- [153] Calvo, E. J.; Danilowicz, C.; Lagier, C. M.; Manrique, J.; Otero, M. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1219-1228.
- [154] Tognalli, N.; Fainstein, A.; Bonazzola, C.; Calvo, E. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 1905-1911.
- [155] Sun, Y.; Sun, J.; Zhang, X.; Sun, C.; Wang, Y.; Shen, J. *Thin Solid Films* **1998**, *327-329*, 730-733.
- [156] Sun, J. Q.; Sun, Y. P.; Zou, S.; Zhang, X.; Sun, C. Q.; Wang, Y.; Shen, J. *C. Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 840-844.
- [157] Sirkar, K.; Revzin, A.; Pishko, M. V. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2930-2936.
- [158] Bonazzola, C.; Calvo, E. J.; Nart, F. C. *Langmuir* **2003**, *19*, 5279-5286.
- [159] Pishko, M. V.; Revzin, A.; Simonian, A. L. *Sensors* **2002**, *2*, 79-90.
- [160] Zotti, G.; Zecchin, S.; Vercelli, B.; Berlin, A.; Grimoldi, S.; Bertoncetto, R.; Milanese, L. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *580*, 330-339.
- [161] DeLongchamp, D. M.; Hammond, P. T. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 224-232.
- [162] Moriguchi, I.; Fendler, J. H. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2205-2211.
- [163] Liu, S.; Kurth, D. G.; Mohwald, H.; Volkmer, D. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **2002**, *14*, 225-228.
- [164] Dennany, L.; Forster, R. J.; Rusling, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5213-5218.
- [165] Shang, L.; Liu, X.; Zhong, J.; Fan, C.; Suzuki, I.; Li, G. *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 296-297.
- [166] Wang, L.; Hu, N. *Bioelectrochemistry* **2001**, *53*, 205-212.
- [167] Ma, H.; Hu, N.; Rusling, J. F. *Langmuir* **2000**, *16*, 4969-4975.
- [168] Calvo, E. J.; Battaglini, F.; Danilowicz, C.; Wolosiuk, A.; Otero, M. *Faraday Discuss.* **2000**, *116*, 47-65.
- [169] Calvo, E. J.; Forzani, E. S.; Otero, M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3281-3289.
- [170] Narvaez, A.; Suarez, G.; Popescu, I. C.; Katakis, I.; Dominguez, E. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 43-52.

- [171] Hou, S.-F.; Yang, K.-S.; Fang, H.-Q.; Chen, H.-Y. *Talanta* **1998**, *47*, 561-567.
- [172] Lindholm-Sethson, B.; Gonzalez, J. C.; Puu, G. *Langmuir* **1998**, *14*, 6705-6708.
- [173] Rosca, V.; Catalin Popescu, I. *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 904-911.
- [174] Hoshi, T.; Saiki, H.; Kuwazawa, S.; Tsuchiya, C.; Chen, Q.; Anzai, J. I. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5310-5315.
- [175] Wei, X.; Zhang, M.; Gorski, W. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2060-2064.
- [176] Zheng, H.; Okada, H.; Nojima, S.; Suye, S.-i.; Hori, T. *Sci. Technol. Adv. Mat.* **2004**, *5*, 371-376.
- [177] Yu, A.; Caruso, F. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3031-3037.
- [178] Nguyen, Q. T.; Ping, Z.; Nguyen, T.; Rigal, P. *J. Membrane Sci.* **2003**, *213*, 85-95.
- [179] Trau, D.; Renneberg, R. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1491-1499.
- [180] Forzani, E. S.; Lopez Teijelo, M.; Nart, F.; Calvo, E. J.; Solis, V. M. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 869-879.
- [181] Gough, D. A.; Leypoldt, J. K. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 439-444.
- [182] Dai, J.; Jensen, A. W.; Mohanty, D. K.; Erndt, J.; Bruening, M. L. *Langmuir* **2001**, *17*, 931-937.
- [183] Harris, J. J.; Bruening, M. L. *Langmuir* **2000**, *16*, 2006-2013.
- [184] Farhat, T. R.; Schlenoff, J. B. *Langmuir* **2001**, *17*, 1184-1192.
- [185] Ball, V.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Langmuir* **2005**, *21*, 4129-4137.
- [186] Huebsch, E.; Fleith, G.; Fatisson, J.; Labbe, P.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Ball, V. *Langmuir* **2005**, *21*, 3664-3669.
- [187] Richert, L.; Lavallo, P.; Vautier, D.; Senger, B.; Stoltz, J. F.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1170-1178.
- [188] Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Silver, J.; Tabrizian, M. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1564-1571.
- [189] Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Tabrizian, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7494-7495.
- [190] Alivisatos, A. P. *Science (Washington, D. C.)* **1996**, *271*, 933-937.
- [191] Alivisatos, A. P. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13226-13239.
- [192] Klein, D. L.; Roth, R.; Lim, A. K. L.; Alivisatos, A. P.; McEuen, P. L. *Nature (London)* **1997**, *389*, 699-701.

- [193] Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science (Washington, D. C.)* **1998**, *281*, 2013-2016.
- [194] Bawendi, M. G. *Book of Abstracts, 212th ACS National Meeting, Orlando, FL, August 25-29 1996*, INOR-149.
- [195] Weller, H. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3*, 194-199.
- [196] Chan, W. C.; Nie, S. *Science* **1998**, *281*, 2016-2018.
- [197] Mamedov, A.; Ostrander, J.; Aliev, F.; Kotov, N. A. *Langmuir* **2000**, *16*, 3941-3949.
- [198] Mamedov, A. A.; Kotov, N. A. *Langmuir* **2000**, *16*, 5530-5533.
- [199] Ariga, K.; Lvov, Y.; Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2224-2231.
- [200] Caruso, F.; Kurth, D. G.; Volkmer, D.; Koop, M. J.; Mueller, A. *Langmuir* **1998**, *14*, 3462-3465.
- [201] Schutte, M.; Kurth, D. G.; Linford, M. R.; Colfen, H.; Mohwald, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2891-2893.
- [202] Ferreira, M.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **1995**, *28*, 7107-7114.
- [203] Kellogg, G. J.; Mayes, A. M.; Stockton, W. B.; Ferreira, M.; Rubner, M. F.; Satija, S. K. *Langmuir* **1996**, *12*, 5109-5113.
- [204] Kotov, N. A.; Dekany, I.; Fendler, J. H. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13065-13069.
- [205] Hao, E.; Qian, X.; Yang, B.; Wang, D.; Shen, J. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. A* **1999**, *337*, 181-184.
- [206] Lesser, C.; Gao, M.; Kirstein, S. *Mat. Sci. Eng. C-Biomim* **1999**, *C8-C9*, 159-162.
- [207] Gao, M.; Richter, B.; Kirstein, S.; Moehwald, H. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4096-4103.
- [208] Hao, E.; Lian, T. *Langmuir* **2000**, *16*, 7879-7881.
- [209] Gao, M.; Lesser, C.; Kirstein, S.; Mohwald, H.; Rogach, A. L.; Weller, H. *J. Appl. Phys.* **2000**, *87*, 2297-2302.
- [210] Sun, Y.; Hao, E.; Zhang, X.; Yang, B.; Shen, J.; Chi, L.; Fuchs, H. *Langmuir* **1997**, *13*, 5168-5174.
- [211] Hao, E.; Yang, B.; Ren, H.; Qian, X.; Xie, T.; Shen, J.; Li, D. *Mat. Sci. Eng. C-Biomim* **1999**, *C10*, 119-122.

- [212] Hao, E.; Yang, B.; Zhang, J.; Zhang, X.; Sun, J.; Shen, J. *J. Mater. Chem.* **1998**, *8*, 1327-1328.
- [213] Liu, Y.; Wang, A.; Claus, R. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1385-1388.
- [214] Rosidian, A.; Liu, Y.; Claus, R. O. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **1998**, *10*, 1087-1091.
- [215] Cassagneau, T.; Fendler, J. H. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 1789-1793.
- [216] Liu, Y.; Wang, Y.; Claus, R. O. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *298*, 315-319.
- [217] Schrof, W.; Rozouvan, S.; Van Keuren, E.; Horn, D.; Schmitt, J.; Decher, G. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **1998**, *10*, 338-341.
- [218] He, J.-A.; Valluzzi, R.; Yang, K.; Dolukhanyan, T.; Sung, C.; Kumar, J.; Tripathy, S. K.; Samuelson, L.; Balogh, L.; Tomalia, D. A. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3268-3274.
- [219] Hao, E.; Lian, T. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3392-3396.
- [220] Lvov, Y. M.; Rusling, J. F.; Thomsen, D. L.; Papadimitrakopoulos, F.; Kawakami, T.; Kunitake, T. *Chem. Commun. (Cambridge)* **1998**, 1229-1230.
- [221] Lvov, Y.; Ariga, K.; Onda, M.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *Langmuir* **1997**, *13*, 6195-6203.
- [222] Ichinose, I.; Tagawa, H.; Mizuki, S.; Lvov, Y.; Kunitake, T. *Langmuir* **1998**, *14*, 187-192.
- [223] Rogach, A. L.; Koktysh, D. S.; Harrison, M.; Kotov, N. A. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1526-1528.
- [224] Liu, Y.; Wang, A.; Claus, R. O. *Appl. Phys. Lett.* **1997**, *71*, 2265-2267.
- [225] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *Langmuir* **1996**, *12*, 3038-3044.
- [226] Tedeschi, C.; Moehwald, H.; Kirstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 954-960.
- [227] Fang, M.; Kim, C. H.; Saupe, G. B.; Kim, H.-N.; Waraksa, C. C.; Miwa, T.; Fujishima, A.; Mallouk, T. E. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 1526-1532.
- [228] Halaoui, L. I. *Langmuir* **2001**, *17*, 7130-7136.
- [229] Ostrander, J. W.; Mamedov, A. A.; Kotov, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1101-1110.
- [230] Tedeschi, C.; Caruso, F.; Moehwald, H.; Kirstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5841-5848.

- [231] Hartley, P. G.; Scales, P. J. *Langmuir* **1998**, *14*, 6948-6955.
- [232] Hoogeveen, N. G.; Stuart, M. A. C.; Fler, G. J. *J. Coll. Interface Sci.* **1996**, *182*, 146-157.
- [233] Sukhishvili, S. A.; Granick, S. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 6869-6878.
- [234] Sukhishvili, S. A.; Granick, S. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 6861-6868.
- [235] Wallin, T.; Linse, P. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 5089-5100.
- [236] Shiratori, S. S.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4213-4219.
- [237] Ladam, G.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Voegel, J.-C. *Langmuir* **2001**, *17*, 878-882.
- [238] Park, S. Y.; Barrett, C. J.; Rubner, M. F.; Mayes, A. M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3384-3388.
- [239] Hoogeveen, N. G.; Stuart, M. A. C.; Fler, G. J.; Boehmer, M. R. *Langmuir* **1996**, *12*, 3675-3681.
- [240] Lvov, Y.; Haas, H.; Decher, G.; Moehwald, H.; Kalachev, A. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 12835-12841.
- [241] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6117-6123.
- [242] Cooper, T. M.; Campbell, A. L.; Crane, R. L. *Langmuir* **1995**, *11*, 2713-2718.

CHAPITRE 2

Chapitre 2 : Modification de surface d'électrodes de carbone vitreux

2.1 Introduction

Dans ce chapitre, il sera discuté de la fonctionnalisation de surface d'électrode de carbone vitreux en vue de construire un autoassemblage électrostatique de polyélectrolytes et d'enzymes. L'adsorption de l'enzyme est réalisée à un pH pour lequel son enveloppe protéinique est globalement chargée négativement, c'est-à-dire à un pH supérieur à son point isoélectrique.

Notre étude a porté sur la caractérisation d'assemblages multicouches de chitosane quaternisé (polyélectrolyte cationique) et de polyphénol oxydase. Des mesures spectroscopiques et microgravimétriques nous ont permis de démontrer et de quantifier la croissance des assemblages. L'utilisation de techniques électrochimiques nous a permis d'obtenir des informations quant au transfert d'électrons et au transport de matière au sein de ces films et de caractériser l'activité électroenzymatique de telles bioélectrodes. Puis, en utilisant un modèle cinétique adéquat, une analyse théorique a été menée pour établir les relations structure – propriétés de ces films.

2.2 Choix des conditions pour l'assemblage électrostatique de polyélectrolytes et d'enzymes

2.2.1 Choix du substrat d'électrode

La construction d'un assemblage électrostatique multicouche sur une surface d'électrode nécessite la reproductibilité de la fonctionnalisation de cette surface par une monocouche chargée. De plus, cette monocouche, composée de groupes ioniques, ne doit pas inhiber le processus de transfert électronique.

La plupart des travaux consacrés au domaine des multicouches de polyélectrolytes a été réalisée en utilisant des surfaces d'or fonctionnalisées par un thiol. Ceci s'explique par le fait qu'en contrôlant la nature du thiol, on peut contrôler des propriétés de la surface de l'électrode d'or. Ainsi, on peut fonctionnaliser ces surfaces de façon reproductible¹. Cependant, les surfaces d'or modifiées par un thiol ont un domaine d'électroactivité relativement restreint. La modification d'une surface d'or par du 3-mercaptopropane

sulfonate (MPS) conduit à une passivation de l'électrode d'or pour certaines sondes redox. Dans le cas du catéchol, le transfert d'électrons est totalement bloqué, comme le montre la figure 2.1.

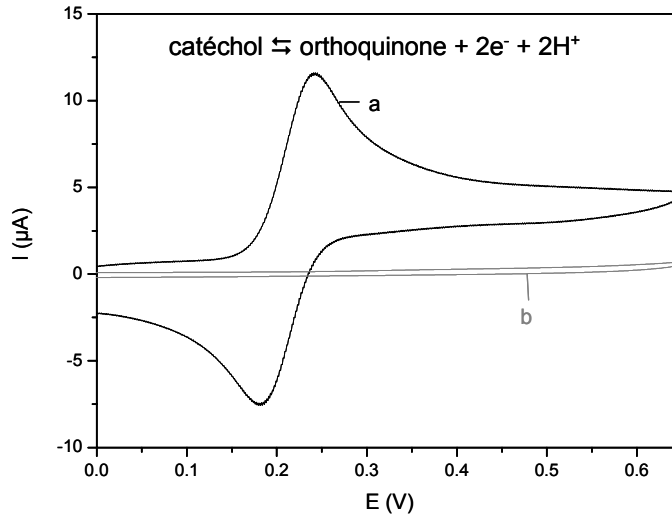


Figure n° 2.1 : Courbe de VC ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) enregistrée en présence de catéchol $4\cdot 10^{-4} \text{ M}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ à $\text{pH}=6,5$, avec une électrode d'or nu (a) et une électrode d'or modifiée par une monocouche de MPS (b)

L'ensemble des résultats concernant une telle modification de surface d'or sera détaillé dans le chapitre 3 de ce mémoire.

Donc, pour cette raison, nous avons choisi de travailler avec une surface de carbone vitreux, qui offre d'autres possibilités de fonctionnalisation de surface.

Plusieurs approches ont été utilisées, au laboratoire, pour fonctionnaliser la surface de carbone vitreux² (GC pour Glassy Carbon) par des charges négatives nécessaires à la construction des autoassemblages électrostatiques. Il a été démontré que l'adsorption directe de polyélectrolyte à la surface du carbone vitreux conduit à des assemblages peu reproductibles. Les deux méthodes mises en œuvre, pour fonctionnaliser, avec une bonne reproductibilité, le GC, inspirées de la littérature, sont schématisées sur la figure 2.2.

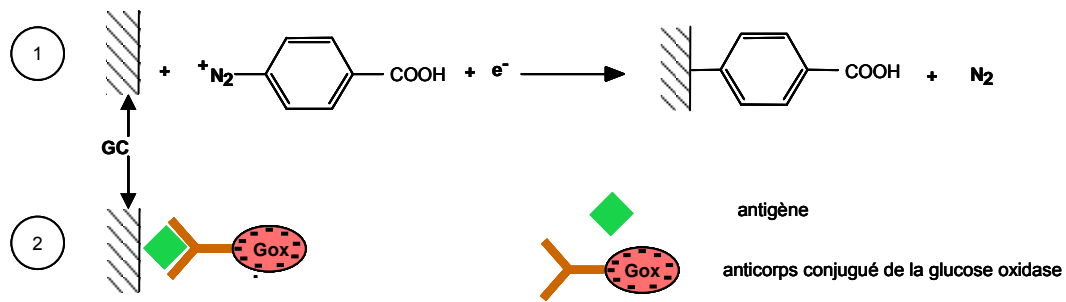


Figure n°2.2 : Schéma de deux méthodes possibles pour fonctionnaliser une surface d'électrode de carbone vitreux (GC)

La première méthode (1) utilisée s'inspire des travaux de Pinson et al³ et met en jeu le greffage covalent d'un radical d'acide 4-phenylacétique à la surface du carbone vitreux. Ce radical est formé par la réduction électrochimique du sel de diazonium correspondant, en solution dans l'acétonitrile. Le transfert de l'électrode ainsi modifiée dans une solution aqueuse à un pH supérieur au pKa de l'acide 4-phenylacétique conduit à l'obtention d'une monocouche anionique (schéma 1 de la figure 2.2). La seconde approche utilisée pour greffer des charges négatives en surface du carbone vitreux a été développée par Bourdillon et al⁴. Elle est basée sur des réactions d'affinité qui conduisent à la fixation d'une monocouche de glucose oxydase en surface du carbone vitreux (schéma 2 de la figure 2.2). Ces deux fonctionnalisations permettent d'avoir une charge négative en surface.

La première couche d'enzyme a été adsorbée à la surface d'un assemblage de trois couches de polyélectrolytes $\text{PE}^+/\text{PE}^-/\text{PE}^+$, sur une sous-couche anionique. Nous avons nommé cet assemblage « film précurseur ». Caruso et al⁵ ont en effet démontré que la croissance régulière des assemblages électrostatiques était obtenue après adsorption de trois ou quatre couches de polyélectrolytes afin d'atténuer l'influence de l'état de surface du substrat. En effet, des rugosités de surface différentes peuvent induire des modifications dans la structure de l'assemblage des premières couches. Dans le cas des expériences que nous avons réalisées, nous avons appliqué un protocole de polissage des surfaces de carbone vitreux (se reporter à la partie expérimentale) qui permet de limiter des variations de rugosité de surface d'une électrode à l'autre. En revanche, l'intercalation d'un film précurseur entre la première couche d'enzyme et la surface de carbone vitreux permet également d'éloigner la protéine de la surface. Il est bien connu que les protéines s'adsorbent fortement sur les surfaces solides en perdant leur conformation et donc leur activité catalytique. En adsorbant la première couche

d'enzyme sur le film précurseur, on diminue ainsi les interactions entre la protéine et la surface.

Une comparaison des deux méthodes de fonctionnalisation de GC (1) et (2) a été menée et la fonctionnalisation par une couche immunologique conduit à des films plus performants vis-à-vis de l'oxydation du glucose.

Nous avons donc opté pour cette solution qui paraît la plus performante dans le cas de la construction d'assemblages avec la polyphénol oxydase (PPO). Aussi, nous avons modifié des surfaces de GC par une monocouche immunologique, un film précurseur, puis un assemblage multicouche de chitosane quaternisé (CHI^+) et de PPO. Nous avons déterminé la structure de tels assemblages par des mesures spectroscopiques et microgravimétriques, et les propriétés enzymatiques par des mesures électrochimiques afin d'établir des relations structure – propriétés de tels assemblages.

2.2.2 Le chitosane

Le chitosane, polyélectrolyte naturel, a été choisi pour ses propriétés de biocompatibilité. Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine, polysaccharide naturel extrait de la carapace de crustacés. Lvov et al⁶ ont montré que l'assemblage LbL de chitosane cationique et de polyanions était un très bon moyen d'utiliser cette technique pour préparer des surfaces moléculaires biocompatibles. Puis d'autres exemples d'assemblages de chitosane et de polyanions ont été construits pour fabriquer des surfaces biologiquement actives^{7,8} ou pour immobiliser des protéines⁹⁻¹¹.

Pour que le chitosane (schéma 2.1) soit chargé positivement, il faut protoner les fonctions amine et donc travailler à pH acide. Or ces conditions ne sont pas favorables à l'enzyme qui risque d'être dénaturée. Donc, dans le but de lui conférer une charge positive permanente et éviter de travailler à pH acide, le chitosane a été chimiquement modifié par quaternisation des groupes amines.

Sur le schéma 2.1, DA, représente le degré d'acétylation du chitosane (DA=0,12) et DS représente le degré de substitution du chitosane quaternisé utilisé (DS=0,4).

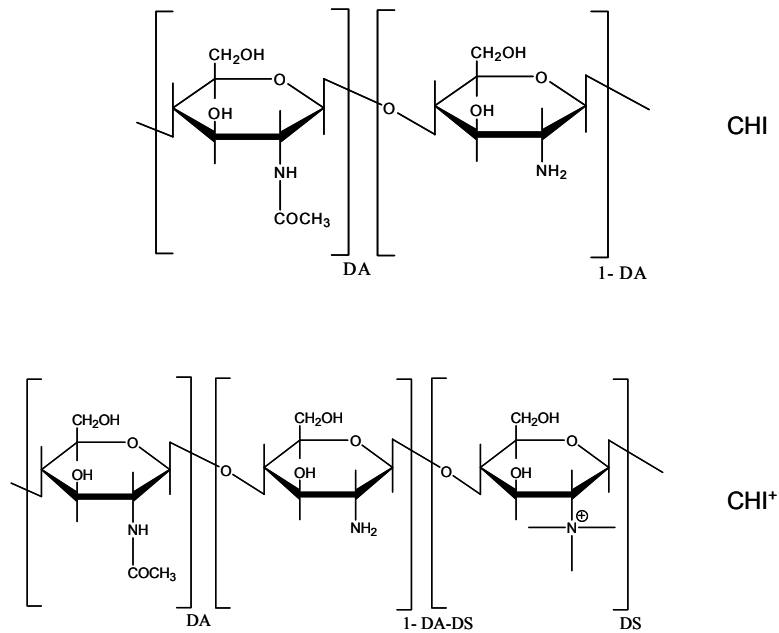


Schéma n°2.1 : Formules chimiques semi-développées du chitosane, CHI et du chitosane quaternisé CHI⁺, synthétisé selon la méthode décrite par Rinaudo et al¹²

2.2.3 La polyphénol oxydase

La polyphénol oxydase est une métalloenzyme contenant un site actif à 2 atomes de cuivre et possédant une masse molaire de 128 kDa. Nous avons travaillé à un pH de 6,5, qui se trouve au dessus du point isoélectrique (pI=4,3) de cette enzyme, lui conférant ainsi une charge négative, et qui correspond également au pH optimum de travail de cette enzyme.

La PPO catalyse, en présence d'oxygène, l'orthohydroxylation de monophénols en catéchols (activité de monophénolase) qui, à leur tour, s'oxydent en orthoquinone (o-quinone) (activité de catécholase). Dans le cas où l'enzyme est immobilisée à la surface d'une électrode pour la construction d'un biocapteur, l'étape de transduction est basée sur l'électroréduction de l'o-quinone enzymatiquement générée (voir schéma 2.2). Ce dispositif enzymatique offre l'avantage du recyclage électroenzymatique du catéchol qui conduit à une amplification du signal.

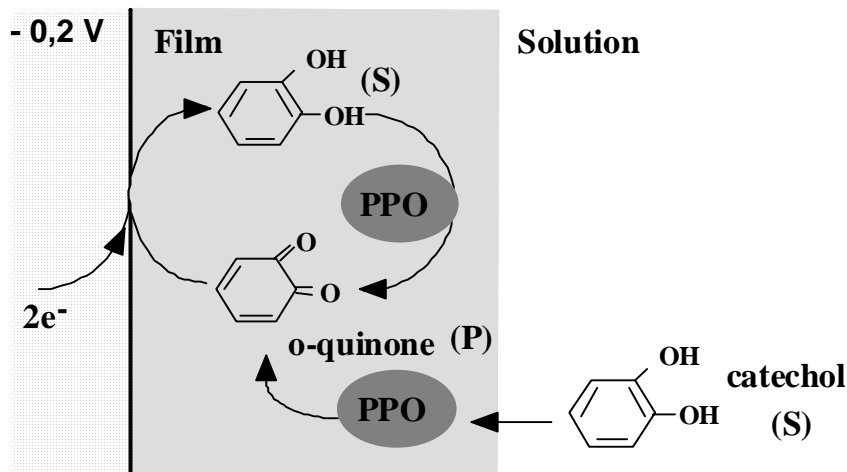


Schéma n°2.2.: Représentation du fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique à catéchol, à base de PPO

Ce système présente aussi un intérêt pour approfondir l'étude du processus électroenzymatique puisque le catéchol et l'orthoquinone sont des espèces électroactives. On pourra donc détecter à la surface de l'électrode non seulement le produit de la réaction enzymatique mais également le substrat.

2.3 Assemblages électrostatiques multicouches de chitosane quaternisé et de polyphénol oxydase

2.3.1 Etudes structurales d'un film multicouche de PPO et de chitosane.

2.3.1.1 Etude spectroscopique de la croissance du film

La construction du film a été effectuée sur les parois d'une cuve de quartz, préalablement activée et négativement chargée (voir partie expérimentale). Une couche de CHI^+ est adsorbée, par interactions électrostatiques, en mettant en contact la surface de quartz avec une solution de CHI^+ à 2 mg.mL^{-1} dans le tampon phosphate (TP) $0,05 \text{ M}$ à $\text{pH}=6,5$. Après rinçage avec la solution de TP, la surface de quartz est successivement mise en contact avec des solutions de PSS^- , puis de CHI^+ , conduisant ainsi à la formation d'un assemblage Quartz/ CHI^+ / PSS^- / CHI^+ . Ce film est alors utilisé comme plateforme cationique pour la construction du film enzymatique $(\text{PPO}/\text{CHI}^+)_n$. La construction de l'assemblage est suivie pas à pas par l'enregistrement d'un spectre

d'absorption en présence de TP. La croissance du film est basée sur l'augmentation de l'absorbance de la bande d'absorption caractéristique de l'enzyme à cuivre et centrée sur 278 nm¹³.

Les spectres d'absorption pour différents nombres de couches déposées sur la surface de quartz de la cuve, sont représentés sur la figure 2.3A.

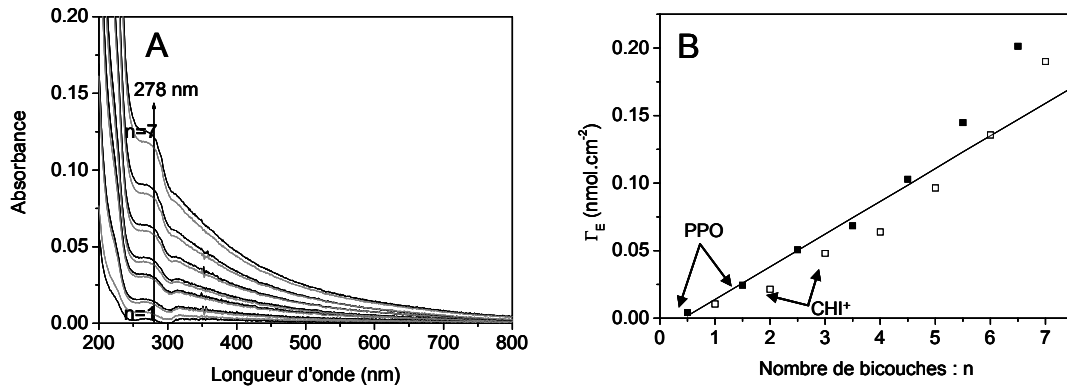


Figure n°2.3 :

Spectres d'absorption UV-Visible (A), dans le tampon phosphate 0,05 M à pH=6,5, pour un film de Quartz/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/(PPO/CHI⁺)_n, adsorbé sur les parois d'une cuve de quartz de 0,1 cm de trajet optique (les traits en noir sont les spectres d'absorption des films dont la dernière couche est de la PPO et les traits gris sont caractéristiques des films dont la couche externe est du CHI⁺) et évolution de la concentration surfacique de PPO (B) en fonction du nombre de bicouches, n, de (PPO/CHI⁺)_n pour n allant de 1 à 7. Pour n demi-entier, ■, l'assemblage se termine par une couche de PPO et pour n entier, □, la dernière couche est constituée de CHI⁺.

Le CHI⁺ n'absorbe pas dans le domaine de longueur d'onde exploré. En revanche, le polystyrène sulfonate (PSS⁻) a une bande d'absorption, peu intense, centrée sur 292 nm. Sur la figure 2.3B, on a soustrait l'absorbance du film précurseur de CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺ aux spectres de CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/(PPO/CHI⁺)_n. En utilisant le coefficient d'extinction molaire de la PPO, 2,39 mL.mg⁻¹.cm⁻¹ à 278 nm¹⁴, il est possible, à partir de la loi de Lambert-Beer, d'en déduire la concentration surfacique en enzyme, Γ_E (en mol.cm⁻²) :

$$\Gamma_E = \frac{n_E}{S} = \frac{A \cdot 10^{-3}}{2 \varepsilon_{278} M_{PPO}} \quad (\text{pour une paroi de cuve}) \quad (1)$$

La figure 2.3B présente l'évolution de la concentration surfacique en PPO, Γ_{PPO}, en fonction du nombre de couches.

On peut noter une légère diminution de l'absorbance lors de l'adsorption d'une couche supplémentaire de chitosane, ce qui pourrait s'expliquer par un relargage partiel de molécules de PPO vers la solution. Cette observation a déjà été notée par Lvov et al¹⁵ qui a étudié différents assemblages de protéines et de polyélectrolytes. Dans notre cas, une moyenne de 6% de PPO est relarguée, sur 7 couches de PPO assemblées, ce qui tend à montrer que le processus de désorption est plutôt faible et lent. Sur le graphe 2.3B, on remarque que la croissance du film est linéaire jusqu'à 5 bicouches de (PPO/CHI⁺), puis, au-delà, on commence à s'écarter de la linéarité. La croissance non-linéaire d'assemblages LbL a été démontrée et modélisée¹⁶ pour un grand nombre de couches. Ce mode de croissance est expliqué par la diffusion d'un polyélectrolyte à l'intérieur du film lorsque l'assemblage est mis au contact de la solution de polyélectrolyte et par la diffusion du PE vers l'interface film/solution.

Nous avons calculé une quantité de PPO adsorbée moyenne sur 5 bicouches de 0,024 nmol.cm⁻², ce qui correspond à une masse de 3072 ng.cm⁻².

2.3.1.2 Etude microgravimétrique

La croissance du film a été étudiée *in situ* par microbalance à quartz avec suivi de la dissipation d'énergie (QCM-D). Nous avons suivi l'évolution des signaux de fréquences normalisées par le nombre de l'harmonique, $\Delta F_x/x$, pour 3 harmoniques : $x=3, 5$ et 7 soit respectivement 15, 25 et 35 MHz. L'évolution des dissipations d'énergie correspondantes, ΔD_x , est suivie en même temps.

Le fondamental à 5 MHz n'est pas représenté sur la figure 2.4. Les mesures effectuées sur la fréquence fondamentale doivent être interprétées avec précaution car elles sont sensibles à la façon dont le quartz a été monté dans la cellule de mesure de la QCM-D.

La figure 2.4 présente l'évolution de la fréquence et de la dissipation d'énergie pour un assemblage CHI⁺/PPO/CHI⁺ sur une surface Au/MPS/CHI⁺/PSS⁻. On peut déjà noter que le saut total de dissipation pour cet assemblage est important, 200.10^{-6} , ce qui traduit la viscoélasticité de ce film. On peut déjà émettre une première explication à ce phénomène : le chitosane est connu pour être très hydrophile, on peut donc penser que chaque couche de CHI⁺ est hydratée (car la QCM-D détecte aussi l'eau présente dans les couches déposées), relativement épaisse et donc très peu rigide.

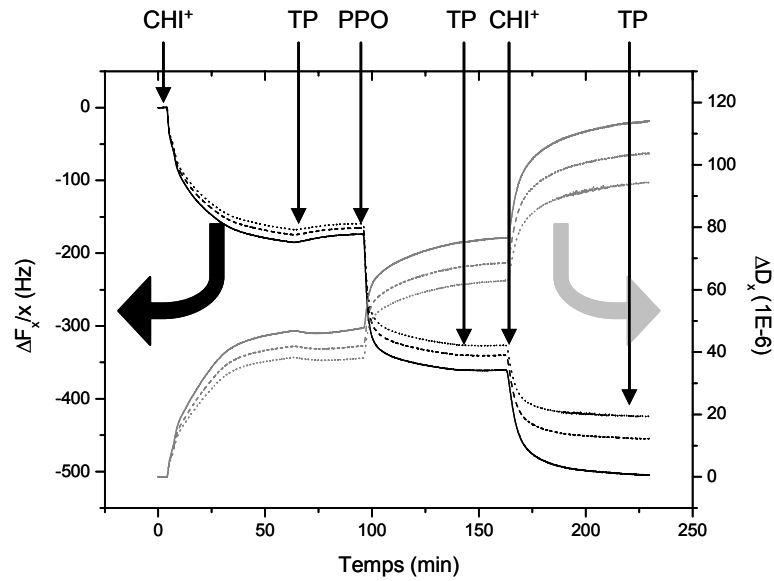


Figure n° 2.4 : Evolution de $\Delta F_x/x$ (échelle de gauche), et ΔD_x (échelle de droite) pour $x=3, 5$ et 7 , en fonction du temps, pour un assemblage $CHI^+/PPO/CHI^+$, réalisé en milieu tampon phosphate $0,05 M$ à $pH=6,5$, adsorbé sur $Au/MPS/CHI^+/PSS$.

La figure 2.5 présente l'évolution de $\Delta F_x/x$ (A) et ΔD_x (B) en fonction de la couche adsorbée depuis le film précurseur. On notera que $\Delta F_x/x$ n'est pas indépendant de l'harmonique étudiée, x . De plus, les valeurs de ΔD_x mesurées sont élevées, de l'ordre de $500 \cdot 10^{-6}$ pour la dernière couche de l'assemblage. Ces résultats confirment que l'on ne pourra pas utiliser l'équation de Sauerbrey, qui ne s'applique que dans le cas de films rigides.

Nous avons donc utilisé le modèle développé par Voinova¹⁷, qui prend en compte la viscoélasticité, ici non négligeable, du film et qui établit une relation entre les paramètres viscoélastiques du film (viscosité, densité, épaisseur, module élastique) et les variations de fréquence et de dissipation.

Ainsi, on a pu extraire la masse surfacique de chaque couche ainsi que son épaisseur, en supposant que la densité du film est de 1 g.cm^{-3} , comme l'ont fait Picart et al¹⁸ pour des assemblages de chitosane, acide hyaluronique et poly-L-lysine. Cette hypothèse se justifie par le fait que le chitosane est un polymère naturel qui s'hydrate très facilement. On peut donc supposer que les assemblages $(PPO/CHI^+)_n$ possèdent une densité proche de celle de l'eau.

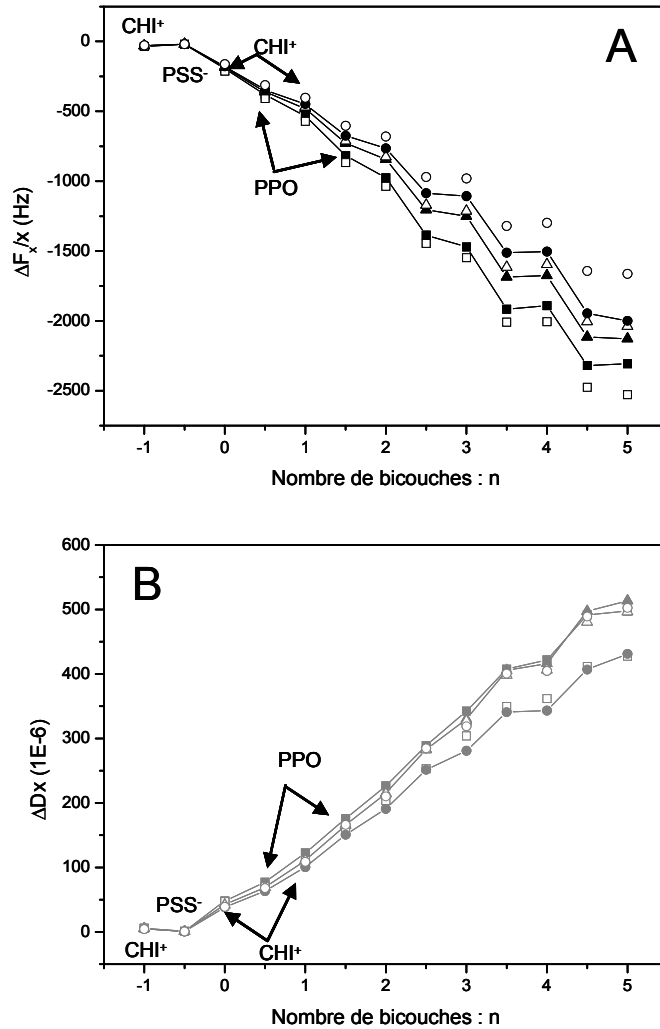


Figure n° 2.5 :

Graphes récapitulatifs de $\Delta F_x/x$ (A) et ΔD_x (B) (pour $x=3$ (●), 5 (▲) et 7 (■)) à chaque palier de tampon en fonction du nombre de bicouches de $(PPO/CHI^+)_n$ construites sur $Au/MPS/CHI^+/PSS^-/CHI^+$. Si n est demi-entier, on a une couche de PPO en dernière couche et si n est entier, c'est une couche de CHI^+ qui termine l'assemblage. Les points expérimentaux apparaissent pleins et reliés, alors que les points modélisés sont vides et non reliés.

On a pu noter que la première couche de CHI^+ a une masse de 850 ng.cm^{-2} alors que la deuxième couche a une masse de 7670 ng.cm^{-2} . Cette différence importante peut être attribuée à la forte influence du substrat Au/MPS sur la quantité de CHI^+ adsorbé sur la première couche. L'adsorption de la couche de PSS^- s'accompagne par ailleurs d'une réaugmentation des fréquences et d'une diminution du facteur de dissipation, qui conduisent à calculer une épaisseur de $4,2 \text{ nm}$ au lieu de $8,5 \text{ nm}$ pour la première couche de CHI^+ . Le film devient moins épais et moins viscoélastique. La couche de

PSS⁻ vient compresser celle de CHI⁺, ce qui s'accompagne de l'expulsion de molécules d'eau et d'anions présents dans la première couche de CHI⁺.

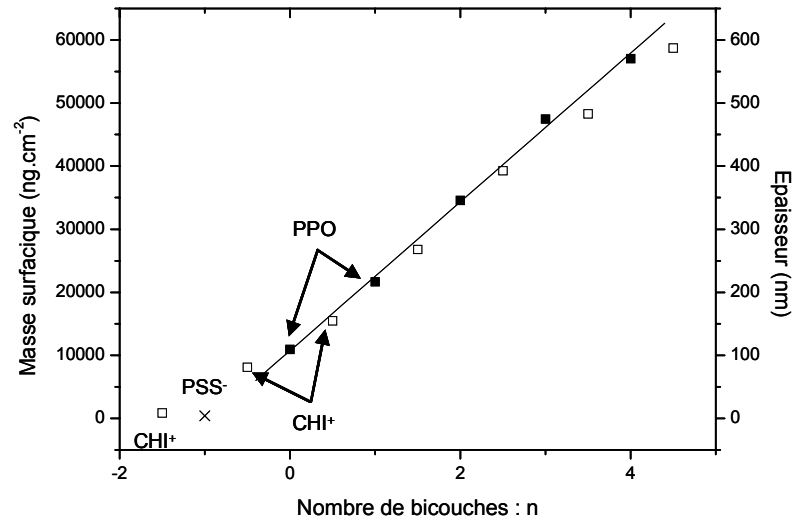


Figure n° 2.6 : Evolution de la masse surfacique (à gauche) et de l'épaisseur (à droite) calculées par modélisation en fonction du nombre de bicouches (PPO/CHI⁺) assemblées sur Au/MPS/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺. Si n est demi-entier (■), la couche externe est une couche de PPO et si n est entier (□), c'est une couche de CHI⁺ qui termine l'assemblage

La figure 2.6 représente l'évolution de la masse surfacique et de l'épaisseur du film en fonction du nombre de couches déposées. Etant donné que l'on a un film épais et très dissipatif, comme le montrent les valeurs de la figure 2.5B (environ $500 \cdot 10^{-6}$), l'amortissement de l'onde électroacoustique est tel que l'appareil ne peut plus analyser correctement le signal mesuré, même en excitant le quartz à son intensité maximale. C'est pour cette raison que nous n'avons pas pu analyser plus de 5 bicouches de (PPO/CHI⁺) sur un film précurseur Au/MPS/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺.

On observe une croissance régulière du film, comme par les mesures de spectroscopie UV-Visible, jusqu'à 5 bicouches de (PPO/CHI⁺). Par QCM-D, nous avons mesuré une masse de PPO adsorbée moyenne de 11800 ng.cm^{-2} par bicouche. La différence de masse surfacique calculée entre les deux méthodes s'explique par le fait qu'en QCM-D, la masse surfacique mesurée tient compte de l'eau et des anions incorporés dans le film. Ce type de film contient donc environ 74% $((1-3072/11800) \cdot 100)$ d'eau et d'anions. Ce

résultat permet de justifier l'hypothèse sur la densité du film que nous avons utilisé pour le calcul des épaisseurs.

Ceci peut être expliqué par l'hydrophilie importante du CHI^+ , qui rend possible l'incorporation progressive d'eau et d'anions. Cette structure va être perméable et permettre la diffusion d'autres espèces, comme le substrat de l'enzyme, ainsi que rendre l'environnement de l'enzyme favorable à son activité, qui a été déterminée par électrochimie.

2.3.2 Réponse électrochimique d'une électrode enzymatique à base de polyphénol oxydase

Nous avons réalisé les mêmes assemblages que précédemment sur des surfaces d'électrodes de carbone vitreux. Les assemblages, que nous avons caractérisés d'un point de vue structural, ont été construits sur des surfaces différentes (du quartz pour les mesures spectroscopiques, de l'or modifié par une monocouche de MPS pour les mesures de QCM-D). Il sera néanmoins possible de confronter les résultats obtenus par chacune des méthodes car le film précurseur permet de s'affranchir du type de surface utilisée. De plus, ce film précurseur a aussi l'avantage d'éloigner l'enzyme de la surface de l'électrode car il est connu que si l'enzyme est trop proche de la surface de l'électrode, ceci peut induire sa dénaturation.

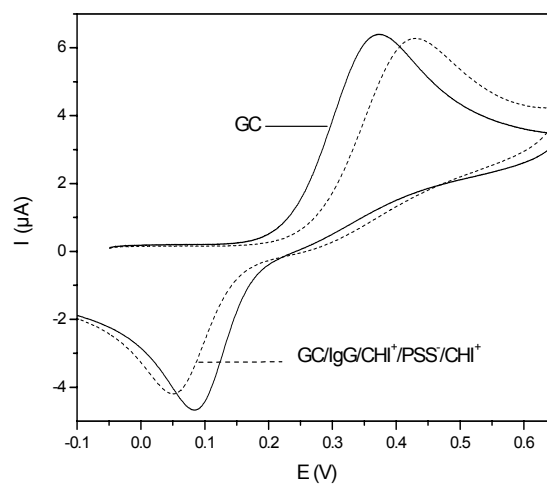


Figure n 2.7 : Courbe de VC ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) du catéchol $2\cdot 10^{-4} \text{ M}$ en tampon phosphate $0,05 \text{ M}$ à $\text{pH}=6,5$ sur GC (trait continu) et GC/IgG/CHI⁺/PSS/CHI⁺ (trait pointillé)

Nous avons pu observer que la réponse voltampérométrique du catéchol est sensiblement la même sur GC que sur GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺ (figure 2.7). Ce résultat peut être attribué à la perméabilité importante du film.

Ainsi, il a été décidé d'analyser la réponse ampérométrique du biocapteur à -0,2 V (correspondant au plateau de courant de réduction de l'o-quinone¹⁹). Le paramètre caractéristique d'un biocapteur est sa sensibilité. On définit la sensibilité comme étant le rapport de la densité de courant sur la concentration en substrat de l'enzyme. Cette étude a été réalisée avec le substrat catéchol, sur des électrodes à disque tournant. Sur cinq électrodes différentes, la sensibilité de GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/PPO/CHI⁺ a été, par exemple, mesurée en traçant la courbe d'étalonnage de la densité de courant en fonction de la concentration du substrat (voir figure 2.8).

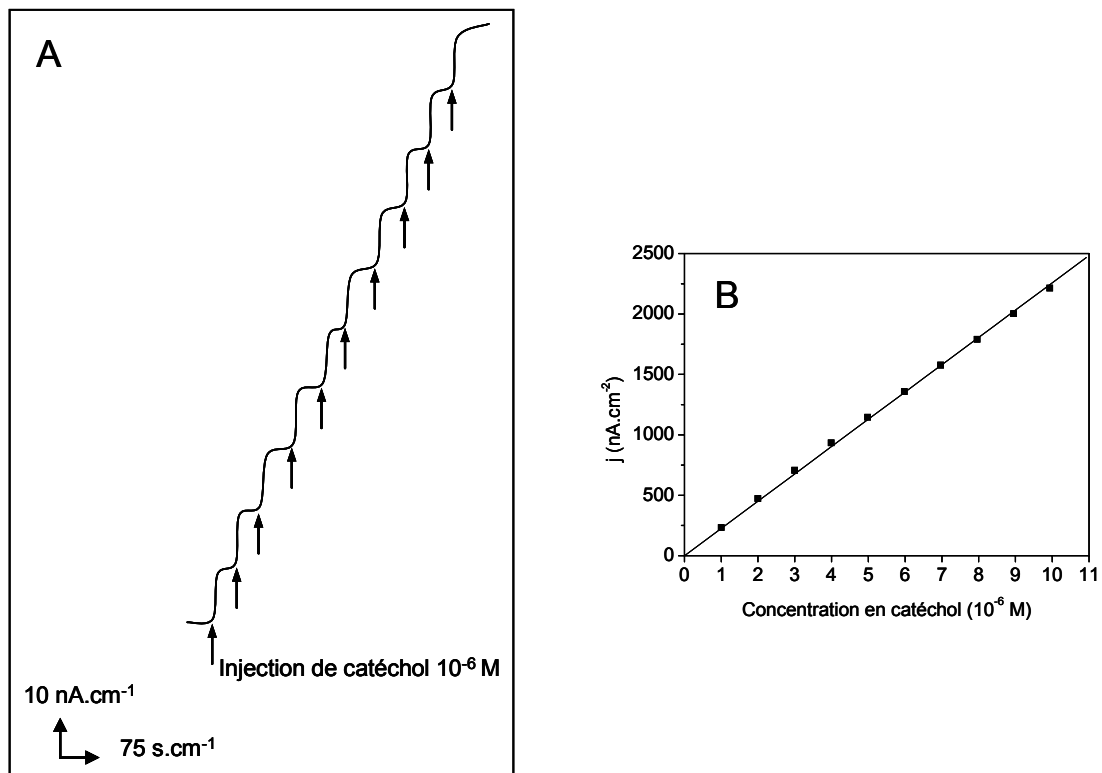


Figure n°2.8 : Exemples d'une courbe de réponse du biocapteur ampérométrique à -0,2 V en fonction du temps à 1250 tours.min⁻¹ (A) et d'une courbe d'étalonnage correspondante de la densité de courant en fonction de la concentration en catéchol pour une électrode GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/PPO/CHI⁺ dans du tampon phosphate 0,05 M à pH=6,5

La figure 2.8A présente un exemple de courbe d'ampérométrie à potentiel contrôlé. A chaque ajout de catéchol, on observe une augmentation de l'intensité mesurée et un temps de réponse très court pour l'obtention d'un courant stable. Chacun de ces ajouts induit le même saut de courant. Ceci nous indique, qu'à ces concentrations, on se trouve dans le domaine linéaire de variation de la réponse de la bioélectrode en fonction de la concentration en substrat. A partir de cette courbe de la figure 2.8A, on trace la droite d'étalonnage de la figure 2.8B. La pente de cette droite nous donne directement la sensibilité du biocapteur étudié ($360 \pm 80 \text{ A.mol}^{-1}.\text{cm}$). En ajoutant une couche supplémentaire de chitosane, on n'observe pas de changement significatif de la sensibilité. On peut relier ce résultat aux données obtenues par UV-Visible qui indiquaient une perte de seulement de 6% de PPO lors de l'ajout d'une couche de CHI^+ sur chaque couche de PPO.

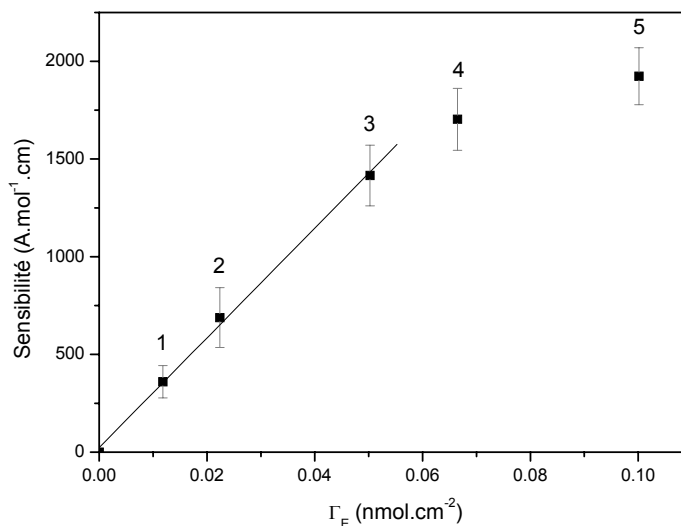


Figure n°2.9 : Evolution de la sensibilité du biocapteur $\text{GC/IgG/CHI}^+/\text{PSS}/\text{CHI}^+/(PPO/\text{CHI}^+)_n$ en fonction de la concentration surfacique en PPO, mesurées par spectroscopie UV-Visible (les chiffres correspondent au nombre, n , de couches de PPO)

Nous avons mesuré l'évolution de la sensibilité pour des bioélectrodes en fonction du nombre de couches de PPO. Les expériences ont été réalisées pour chaque couche sur plusieurs électrodes, les barres d'erreur représentent les écarts de sensibilité mesurés. En utilisant les concentrations surfaciques obtenues par spectroscopie UV-Visible, nous avons tracé l'évolution de la sensibilité au catéchol en fonction de la concentration

surfacique Γ_{PPO} (figure 2.9). On observe une augmentation linéaire de la sensibilité du biocapteur pour les trois premières couches avec une pente de $3 \pm 0,07 \cdot 10^{13} \text{ A} \cdot \text{mol}^{-2} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $r=0,998$, puis la sensibilité atteint un plateau. Cette évolution peut être corrélée avec les résultats théoriques précédemment obtenus²⁰. Il a été montré, dans ces travaux, que l'épaisseur du film a une influence sur l'activité enzymatique de la bioélectrode étudiée. En particulier, si l'épaisseur du film enzymatique atteint une certaine valeur, la réponse cathodique du biocapteur devient indépendante de l'épaisseur du film et atteint un maximum.

Il faut tout de même remarquer la sensibilité élevée obtenue pour cinq couches de PPO, $1924 \text{ A} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}$. Ce niveau de sensibilité doit être corrélé à la faible quantité de PPO déposée sur l'électrode, $12350 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$. La surface de l'électrode étant de $0,0707 \text{ cm}^2$, on a donc une masse de $0,873 \mu\text{g}$ de PPO immobilisée dans ces cinq bicouches. Dans de précédents travaux¹⁹, une quantité de $6,2 \mu\text{g}$ de PPO avait été immobilisée dans un hydrogel d'argile, ayant une sensibilité de $4320 \text{ A} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}$. Dans cet hydrogel, l'enzyme a été immobilisée dans une matrice de laponite et d'octamère d'organosilasesquioxane (agent expanseur des feuillets de laponite)¹⁹. On peut donc conclure que le biocapteur constitué de cinq bicouches de CHI^+ et de PPO est trois fois plus actif que le biocapteur pour lequel la PPO a été immobilisée dans un hydrogel de laponite. Ce résultat est attribué aux propriétés de biocompatibilité du chitosane qui offre un environnement plus favorable à l'enzyme que la laponite. Dans un film autoassemblé de chitosane, la PPO adopte une conformation plus favorable à son activité et les sites actifs de l'enzyme sont ainsi plus accessibles, que dans le cas où la PPO est immobilisée de façon massive.

La molécule de PPO, supposée sphérique, occupe un volume de 219 nm^3 , correspondant donc à une aire de projection de $67,8 \text{ nm}^2$ ¹⁹. La saturation d'une monocouche d'un disque de 3 mm de diamètre correspond à une quantité d'enzyme de $1,7310^{-13} \text{ mol}$. Or, le nombre de moles de PPO correspondant à chaque dépôt varie entre $7,5 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$ pour la première couche à $23,1 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$ pour la cinquième, d'après les résultats obtenus par UV-Visible. On en conclut que chaque couche de PPO contient un nombre équivalent de monocouche dense de PPO compris entre 4,3 et 13,3. D'autres études⁶ ont montré que pour un assemblage de glucose oxydase, la quantité d'enzyme adsorbée à chaque étape, est de 1 à 10 fois la valeur contenue dans une monocouche dense de glucose oxydase. Pour compléter et comprendre le fonctionnement d'un tel biocapteur, nous

avons développé une analyse théorique complète du système électroenzymatique de cet assemblage LbL pour de faibles concentrations en catéchol.

2.3.3 Traitement théorique du système enzymatique et établissement des relations structure – propriétés

L'optimisation de stratégies d'élaboration des biocapteurs nécessite la connaissance de caractéristiques fondamentales telles que l'activité spécifique ou l'accessibilité de l'enzyme immobilisée, la perméabilité de la couche sensible ou l'efficacité d'un transfert d'électron. Ces caractéristiques peuvent être quantifiées grâce à l'analyse électrochimique du système électroenzymatique sur la base d'un modèle cinétique adéquat. Nous présentons dans ce paragraphe le modèle théorique du système électroenzymatique PPO – catéchol. Ce modèle est en fait l'adaptation d'un autre précédemment publié^{20,21} qui prend en compte deux films séparés, un film interne d'épaisseur L_1 , qui correspond au film précurseur et un film externe, d'épaisseur L_2 , qui équivaut au film enzymatique multicouche $(PPO/CHI^+)_n$ (voir schéma 2.3).

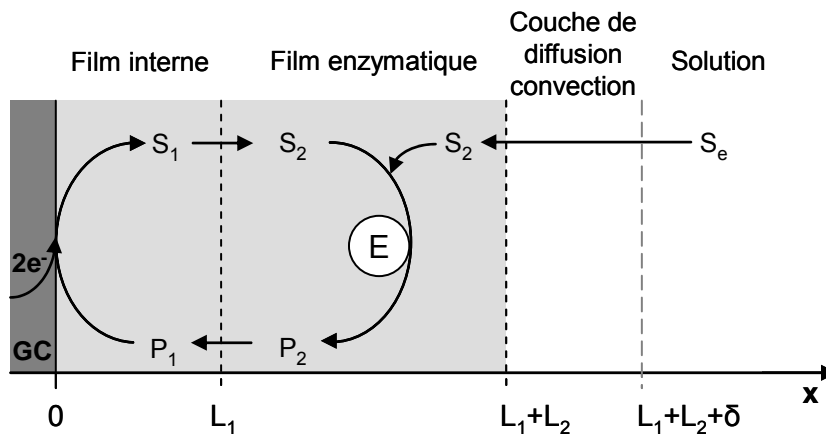


Schéma n°2.3 : Représentation schématique d'une électrode tournante modifiée par un film interne inactif (d'épaisseur L_1) et une couche externe enzymatique (d'épaisseur L_2) et principe de fonctionnement d'une bioélectrode en présence de catéchol (S). P est le produit, l'orthoquinone. E représente l'activité de catécholase de la PPO.

Ce modèle a été conçu pour un système fonctionnant en régime stationnaire lorsque le film est assemblé à la surface d'une électrode tournante, ce qui permet de contrôler

l'épaisseur de la couche de diffusion-convection, δ , qui est directement reliée à la vitesse de rotation de l'électrode, ω .

$$\delta = 1.61D^{1/3}\nu^{1/6}\omega^{-1/2} \quad (3)$$

Où D est le coefficient de diffusion de l'espèce en solution, ν , la viscosité cinématique ($10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour un milieu aqueux).

En utilisant la même méthode, il est possible d'extraire une expression analytique théorique de la sensibilité du biocapteur vis-à-vis du catéchol (S).

Dans la suite, les indices 1, 2 et e seront utilisés pour les paramètres cinétiques ou les concentrations des substrats correspondant au film interne IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺, au film enzymatique (PPO/CHI⁺)_n et à la solution d'électrolyte, respectivement.

Dans notre modèle, nous avons, au départ, postulé que la sensibilité du biocapteur dépend de plusieurs paramètres :

- le potentiel appliqué, E
- la vitesse de rotation de l'électrode, ω
- les processus de transport de masse, caractérisés par les perméabilités P_{m1} et P_{m2} . Le transport de masse en solution a été quantifié par le coefficient de diffusion D_e pour le catéchol et l'orthoquinone.
- l'activité enzymatique du film externe qui est caractérisée par le paramètre θ (défini ci-après), en présence de catéchol.

Les différentes étapes, menant à la réponse de l'électrode, en présence de catéchol, sont les mêmes que publiées précédemment^{20,21}. La vitesse de réaction enzymatique s'exprime selon l'équation suivante :

$$V_c = \frac{k[E][S]}{K + [S]} \quad (4)$$

Où [E] représente la concentration totale en enzyme active (catécholase E), et k et K ont leurs significations générales (k est la constante de vitesse de l'étape enzymatique limitante dans le formalisme de Michaelis – Menten ; K est la constante apparente de Michaelis – Menten pour l'activité de catécholase). On se place dans des conditions expérimentales pour lesquelles le transfert d'électrons à l'interface électrode/film interne est rapide. La diffusion de S₁ et de P₁ dans le film interne a lieu avec un même coefficient de diffusion D_{f1} . Il en est de même dans le cas du film enzymatique, avec un coefficient de diffusion D_{f2} .

Le processus électroenzymatique du système PPO – catéchol est défini par un mécanisme CE'.

Etape de réaction enzymatique C :



V_C représente la vitesse enzymatique de la formation de l'o-quinone (P) à partir du catéchol (S). Dans le cas du système électroenzymatique PPO – catéchol, P et S sont présents dans les films interne et externe et uniquement S est présent dans la solution.

Etape de transfert d'électron E' :



Comme le système redox catéchol/orthoquinone n'est pas nernstien, la cinétique de transfert d'électrons doit être prise en compte. K_r et K_o représentent les constantes cinétiques de demi-équations aller et retour de la réaction redox (6).

$$K_r = k^\circ \exp\left[-\alpha_r \frac{nF}{RT}(E - E^\circ)\right] \quad (7)$$

$$K_o = k^\circ \exp\left[\alpha_o \frac{nF}{RT}(E - E^\circ)\right] \quad (8)$$

Où k° est la constante standard du transfert d'électrons, α_r et α_o les coefficients de symétrie et E° le potentiel standard du système redox S/P.

Par conséquent, la vitesse globale de transfert d'électrons, $V_{E'}$, s'écrit selon la relation suivante :

$$V_{E'} = K_r [P_1]_{x=0} - K_o [S_1]_{x=0} = -D_{f1} \left(\frac{\partial [P_1]}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (9)$$

Comme le catéchol est électrochimiquement régénéré dans l'étape E', il peut entrer de nouveau dans une étape enzymatique C, ce qui a pour conséquence d'amplifier le signal ampérométrique.

En réalisant les mêmes approximations que celles reportées dans les travaux précédents^{20,21}, la vitesse V_C est considérée comme étant du premier ordre par rapport à [E] (la quantité totale d'enzyme active accessible) et par rapport à la concentration du substrat, [S]. Ces approximations sont possibles dans la mesure où les électrodes sont généralement utilisées pour détecter des concentrations en substrat inférieures à 10^{-5} mol.L⁻¹. Ceci nous permet d'écrire les équations décrivant les concentrations de S et P dans la couche enzymatique à l'état stationnaire.

Dans la couche enzymatique d'épaisseur L_2 :

$$\frac{\partial^2 [S_2]_x}{\partial x^2} - \frac{[S_2]_x}{(\Lambda)^2} = 0 \quad (10)$$

$$\frac{\partial^2 [P_2]_x}{\partial x^2} - \frac{[P_2]_x}{(\Lambda)^2} = 0 \quad (11)$$

Où Λ est la longueur de réaction vis-à-vis du catéchol (ou longueur caractéristique du transport de matière dans le film couplé à la réaction enzymatique).

$$\Lambda = \left(\frac{D_{f2} K}{k[E]} \right)^{1/2} \quad (12)$$

Dans le film interne d'épaisseur L_1 :

$$\frac{\partial^2 [S_1]_x}{\partial x^2} = 0 \quad (13)$$

$$\frac{\partial^2 [P_1]_x}{\partial x^2} = 0 \quad (14)$$

Dans la solution :

$$\frac{\partial^2 [S_e]_x}{\partial x^2} = 0 \quad (15)$$

$$\frac{\partial^2 [P_e]_x}{\partial x^2} = 0 \quad (16)$$

La résolution des équations différentielles, établies pour la combinaison du processus de diffusion-convection et des réactions biochimiques dans le cas du système électroenzymatique PPO – catéchol, permet d'exprimer les profils de concentration de S et de P à une distance x de l'électrode et en fonction des paramètres Pm_1 , Pm_2 , θ , D_e , E et ω .

$$Pm_1 = \frac{\kappa_1 D_{f1}}{L_1} \quad (17)$$

$$Pm_2 = \frac{\kappa_2 D_{f2}}{L_2} \quad (18)$$

Où Pm_1 et Pm_2 sont les perméabilités des films interne, d'épaisseur L_1 , et externe, d'épaisseur L_2 , respectivement.

Le modèle est élaboré avec des coefficients de partage κ_1 pour S_1 et P_1 dans le film interne et κ_2 pour S_2 et P_2 dans le film enzymatique.

$$\theta = \frac{L_2}{\Lambda} \quad (19)$$

θ compare la vitesse de réaction enzymatique par rapport au catéchol avec la diffusion de ce substrat. Donc si θ est grand, l'activité de catécholase est élevée. Il a été montré²⁰ que lorsque θ atteint un valeur de 5 ou plus, la sensibilité du biocapteur, qui est reliée à l'activité de catécholase, devient indépendante de l'épaisseur du film, résultat que nous avons observé (voir figure 2.9).

2.3.3.1 Système PPO - Catéchol

Les densités de courant j_f peuvent être facilement obtenues par l'expression suivante :

$$j_f = 2F(J_{P_1})_{x=0} = -2F(J_{S_1})_{x=0} \quad (20)$$

Où $(J_{P_1})_{x=0}$ est le flux d'orthoquinone, produite par la réaction enzymatique, arrivant à la surface de l'électrode et $(J_{S_1})_{x=0}$ est le flux de catéchol formé par la réduction électrochimique de l'orthoquinone à l'électrode.

Les expressions de $(J_{P_1})_{x=0}$ et de $(J_{S_1})_{x=0}$ peuvent être exprimées selon la première loi de Fick :

$$(J_{P_1})_{x=0} = -D_{f1} \left(\frac{\partial [P_1]}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (21)$$

$$(J_{S_1})_{x=0} = -D_{f1} \left(\frac{\partial [S_1]}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (22)$$

L'expression analytique de la densité de courant limite, correspondant à la réduction de l'o-quinone est obtenue en faisant tendre la constante cinétique de la demi-réaction de réduction (étape E, équation (6)) vers l'infini :

$$\lim_{K_r \rightarrow \infty} j_f = j_{fcat,red} \quad (23)$$

Dans le cas où l'enzyme immobilisée est inactive, le catéchol peut être oxydé directement à la surface de l'électrode. L'expression théorique de la densité de courant limite d'oxydation du catéchol est obtenue par la relation (24).

$$\lim_{\substack{K_o \rightarrow \infty \\ \Lambda \rightarrow \infty}} j_f = j_{fcat,ox}^{IE} \quad (24)$$

La densité de courant limite théorique correspondant à l'oxydation du catéchol sur une électrode modifiée par le film précurseur d'épaisseur L_1 est déterminée par la relation (25).

$$\lim_{Pm_2 \rightarrow \infty} j^{IE}_{fcat,ox} = j^{L_1}_{fcat,ox} \quad (25)$$

Les expressions analytiques des densités de courant (26), (27) et (28) ont été obtenues au moyen du logiciel de calcul formel Mathematica.

$$j^{L_1}_{fcat,ox} = \frac{2FPm_1D_e[S]_{\infty}}{D_e + Pm_1\delta} \quad (26)$$

$$j^{IE}_{cat,ox} = \frac{2FPm_1Pm_2D_e\kappa_2[S]_{\infty}}{D_ePm_2 + D_ePm_1\kappa_2 + Pm_1Pm_2\delta\kappa_2} \quad (27)$$

$$j_{fcat,red} = \frac{4FPm_1Pm_2\theta\kappa_2 \sinh\left(\frac{\theta}{2}\right) \left(Pm_2\delta \cosh\left(\frac{\theta}{2}\right) + D_e \sinh\left(\frac{\theta}{2}\right) \right) [S]_{\infty}}{Pm_2\theta(D_e + Pm_1\delta\kappa_2) \cosh \theta + (Pm_2^2\delta\theta^2 + D_ePm_1\kappa_2) \sinh \theta} \quad (28)$$

Où δ est l'épaisseur de la couche de diffusion – convection donnée par la relation (3).

Les sensibilités correspondantes $S_{cat,red}$, $S^{IE}_{cat,ox}$ et $S^{L_1}_{cat,ox}$ du biocapteur vis-à-vis du catéchol dérivent des équations (29) à (31) respectivement.

$$S^{L_1}_{cat,ox} = \frac{j^{L_1}_{fcat,ox}}{[S]_{\infty}} \quad (29)$$

$$S^{IE}_{cat,ox} = \frac{j^{IE}_{fcat,ox}}{[S]_{\infty}} \quad (30)$$

$$S_{cat,red} = \frac{j_{fcat,red}}{[S]_{\infty}} \quad (31)$$

A partir des points expérimentaux que nous avons obtenu, nous avons réalisé l'ajustement paramétrique de ces relations grâce au logiciel Mathematica.

2.3.3.2 Analyse cinétique de la bioélectrode à base de PPO

La validation expérimentale du modèle théorique a été réalisée avec un film enzymatique composé de cinq bicouches de (PPO/CHI⁺) adsorbé sur une surface

d'électrode tournante GC : IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/(PPO/CHI⁺)₅. La réponse ampérométrique du biocapteur correspondant, a été mesurée vis-à-vis du catéchol, ce qui nous a permis d'extraire les paramètres cinétiques (D_e , Pm_1 , Pm_2 et θ) (voir tableau 2.2).

Les mesures ampérométriques ont été enregistrées en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode, dans les conditions où l'on peut appliquer le modèle : électrolytes saturés en air (dans le cas des mesures réalisées en présence d'enzyme active) ou saturés en diazote (dans le cas des mesures réalisées en présence d'enzyme inactive), concentration des substrats inférieures à $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Tableau n°2.1 : Valeurs de paramètres cinétiques calculés sous différentes conditions, à partir des expressions théoriques correspondantes

| Assemblage | Substrat | Potentiel appliqué | O ₂ | Sensibilité | Equation utilisée | Paramètre cinétique |
|---|----------|--------------------|----------------|--------------------|-------------------|---|
| GC/IgG/CHI ⁺ /PSS ⁻ /CHI ⁺ | catechol | 0,65V | Oui | $S_{cat,ox}^{L_1}$ | 29 | $D_e = (1,13 \pm 0,08) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ $Pm_1 = 0,015 \pm 0,002 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ |
| GC/IgG/CHI ⁺ /PSS ⁻ /CHI ⁺ /(PPO/CHI ⁺) ₅ | catechol | 0,65V | Non | $S_{cat,ox}^{IE}$ | 30 | $Pm_2 = 0,030 \pm 0,009 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ |
| | catechol | -0,2V | Oui | $S_{cat,red}$ | 31 | $\theta = 1,38 \pm 0,5$ |

La détermination des paramètres cinétiques caractéristiques du système électroenzymatique PPO – catéchol a été réalisée en trois étapes successives et pour différentes concentrations en substrat. L'analyse cinétique relative à l'oxydation directe du catéchol en l'absence d'oxygène (mesure de la densité de courant sur le palier d'oxydation du catéchol à 0,65 V) à la surface de l'électrode modifiée par le film précurseur d'épaisseur L_1 (GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺) nous a conduit à extraire la valeur de la perméabilité du film précurseur, Pm_1 . Cette détermination est réalisée en comparant les valeurs expérimentales mesurées aux valeurs théoriques obtenues par

l'expression (29). L'identification paramétrique est effectuée grâce à la fonction « NonLinearRegress » du logiciel Mathematica.

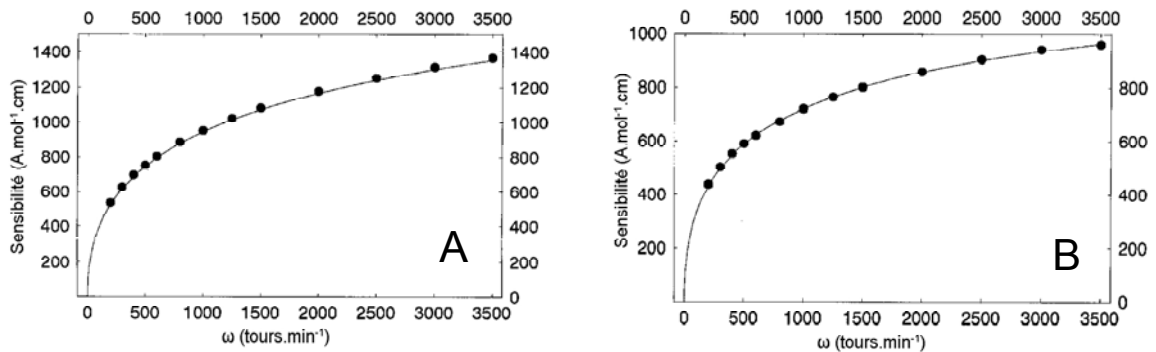


Figure n°2.10 : Evolution de la sensibilité de GC//IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺ (A) et GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/(PPO/CHI⁺)₅ (B), vis-à-vis du catéchol (1 μM), mesurées à 0,65 V en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode, dans le tampon phosphate 0,05 M pH=6,5, désoxygéné dans le cas B. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, tandis que les courbes résultent des calculs théoriques.

La figure 2.10A montre l'évolution de la sensibilité au catéchol en oxydation sur GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺ en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode. On remarque que la courbe théorique (relation (29)) est en très bon accord avec les valeurs expérimentales. L'ajustement paramétrique nous conduit à extraire la valeur du coefficient de diffusion du catéchol dans l'électrolyte, D_e , et la valeur de la perméabilité du film précurseur, Pm_1 , (tableau 2.2). L'étude de l'oxydation directe du catéchol sur GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/(PPO/CHI⁺)₅ en l'absence d'oxygène (enzyme inactive) nous permet d'extraire la perméabilité du film enzymatique Pm_2 . La figure 2.10B représente l'évolution de la sensibilité au catéchol en oxydation sur une telle électrode en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode. Là encore, le graphe montre une bonne corrélation entre les données expérimentales et la valeur théorique $S_{cat,ox}^{IE}$. En remplaçant les paramètres D_e et Pm_1 dans l'expression (30), l'ajustement paramétrique nous conduit à extraire la valeur de Pm_2 (tableau 2.2). On a calculé $Pm_2=0,03 \pm 0,009$ cm.s⁻¹. Puis D_{P2} ($1,52.10^{-6}$ cm².s⁻¹) a été déterminé en utilisant la valeur de Pm_2 et l'épaisseur L_2 ($0,506$ μm selon les résultats microgravimétriques, en supposant que la densité du film est de 1 g.cm⁻³). Ce résultat suggère que le processus de diffusion dans le film enzymatique est diminué de seulement un ordre de grandeur en comparaison avec la solution d'électrolyte. Cette grande perméabilité confirme que le film est très

hydraté et valide l'hypothèse de densité pour les calculs issus de la QCM-D. De plus, cette valeur élevée de D_{r2} peut être reliée à la grande sensibilité de la bioélectrode.

L'analyse cinétique de la réponse ampérométrique de l'électrode GC/IgG/CHI⁺/PSS⁻/CHI⁺/(PPO/CHI⁺)₅ au catéchol en présence d'enzyme active à -0,2 V (potentiel de réduction de l'o-quinone, produit de la réaction enzymatique) a permis d'extraire le paramètre caractéristique de l'activité catalytique de l'enzyme immobilisée : θ .

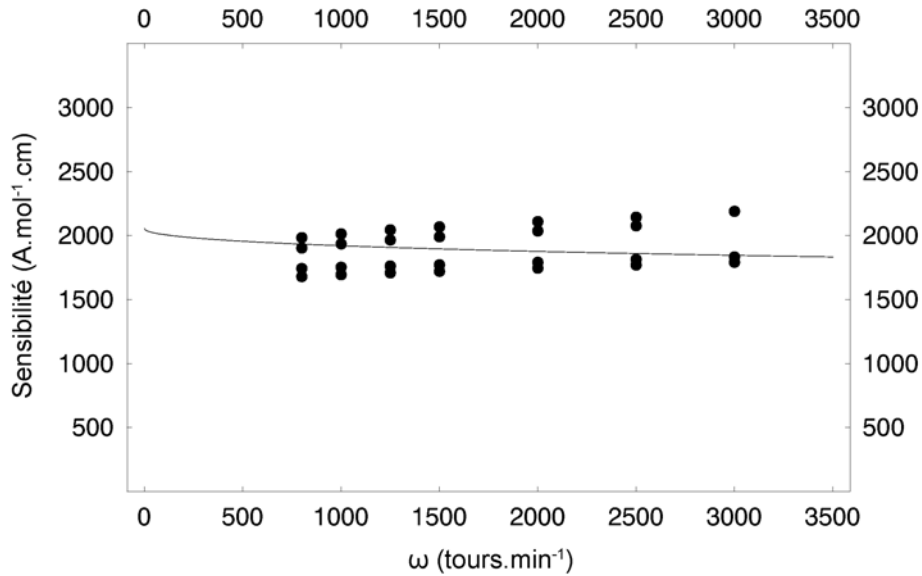


Figure n°2.11 : Sensibilité de GC/IgG/CHI⁺/PPS⁻/CHI⁺/(PPO/CHI⁺)₅ vis-à-vis du catéchol (1, 2 et 3.10⁻⁶ M), dans le tampon phosphate 0,05 M pH=6,5, saturé en air. Les points correspondent aux valeurs expérimentales, tandis que les courbes résultent des calculs théoriques.

La figure 2.11 compare les valeurs expérimentales de la sensibilité au catéchol en réduction aux valeurs théoriques correspondant à la fonction $S_{\text{cat,red}}$ (relation (31)).

Le traitement des courants mesurés au potentiel d'oxydation du catéchol, en l'absence d'oxygène, (0,65 V) en fonction de la vitesse de rotation, nous permet de calculer les perméabilités des films interne et enzymatique, P_{m1} et P_{m2} , ainsi que le coefficient de diffusion D_e du catéchol, grâce au tracé des courbes des expressions (29) et (30). Alors qu'en travaillant au potentiel de réduction de l'o-quinone (-0,2 V), l'exploitation des résultats obtenus nous donnent accès à θ , via le tracé des courbes de l'expression $S_{\text{cat,red}}$ (31). θ a été calculé à 1,38 à partir du modèle, ce qui signifie que la longueur de

réaction vis-à-vis du catéchol est inférieure à l'épaisseur du film. Ce résultat montre que la réaction enzymatique est particulièrement efficace.

Par ailleurs, on peut déduire des expressions (12), (18) et (19), une relation théorique entre θ , Pm_2 et la concentration surfacique en enzyme Γ_E :

$$\theta^2 Pm_2 = \frac{k}{K} \Gamma_E \quad (32)$$

Où k est la constante de vitesse limitante de la réaction enzymatique PPO – catéchol et K la constante de Michaelis pour le substrat catéchol. Cette expression théorique montre qu'il existe une relation de proportionnalité entre $\theta^2 Pm_2$ et Γ_E . Des analyses cinétiques réalisées sur plusieurs électrodes en fonction du nombre de couches de PPO (entre 1 et 5) ont permis d'extraire les valeurs du produit $\theta^2 Pm_2$ pour différentes valeurs de Γ_E . Γ_E a, par ailleurs, été déterminée à partir de l'analyse spectroscopique. La figure 2.12 montre que l'évolution du produit $\theta^2 Pm_2$ en fonction de Γ_E suit une variation linéaire.

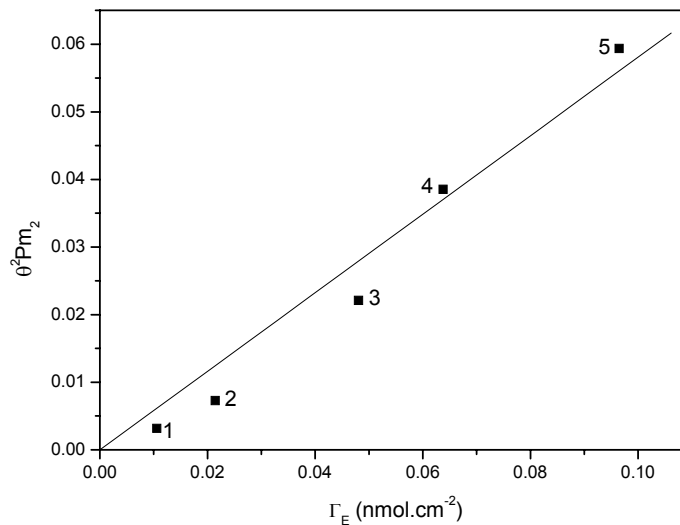


Figure 2.12 : Evolution de $\theta^2 Pm_2$ (obtenu par analyse cinétique) en fonction de la concentration surfacique totale de PPO déterminée par les mesures spectroscopiques (les chiffres correspondents au nombre, n , de couches de PPO)

La pente de cette droite est égale à $5,8 \pm 0,3.10^8 \text{ mol}^{-1}.\text{cm}^3.\text{s}^{-1}$, avec un coefficient de corrélation de 0,9966. D'après la relation (32), cette pente correspond au rapport

apparent de $\frac{k}{K}$ (de PPO immobilisée dans le film). Ce rapport correspond à 50 % de $\frac{k}{K}$ déterminé en phase homogène²¹ ($1,15 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, k et K sont déterminés par des mesures spectroscopiques (en présence d'enzyme en solution) en suivant un protocole bien établi²¹). Cela montre que l'immobilisation de la PPO dans un assemblage multicouche avec CHI^+ , préserve l'activité enzymatique de 50%.

2.4 Conclusion

Dans ce travail, nous avons pu remarquer que des mesures spectroscopiques et microgravimétriques, par QCM-D, sont complémentaires et nous apportent des informations pour décrire complètement la structure d'autoassemblages électrostatiques multicouches de polyphénol oxydase et de chitosane quaternisé. Puis, en combinant ces observations, avec les résultats des études électrochimiques, cela nous a permis d'évaluer le système enzymatique avec une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et l'analyse théorique de ces systèmes.

Nous avons montré que le temps de réponse d'un tel biocapteur est court et que la sensibilité du biocapteur est élevée. Ces résultats sont dus à la grande perméabilité du film déposé à l'électrode et la biocompatibilité du chitosane qui offre un environnement favorable à l'activité enzymatique de la PPO.

L'utilisation de chitosane pour immobiliser la polyphénol oxydase dans un autoassemblage électrostatique permet donc de construire un biocapteur ayant de bonnes performances.

Références chapitre 2

- [1] Ulman, A. *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **1996**, *96*, 1533-1554.
- [2] Ferreyra, N.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 477-484.
- [3] Bourdillon, C.; Delamar, M.; Demaille, C.; Hitmi, R.; Moiroux, J.; Pinson, J. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *336*, 113-123.
- [4] Bourdillon, C.; Demaille, C.; Gueris, J.; Moiroux, J.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12264-12269.
- [5] Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 3422-3426.
- [6] Lvov, Y.; Onda, M.; Ariga, K.; Kunitake, T. *J. Biomat. Sci-Polym. Ed.* **1998**, *9*, 345-355.
- [7] Serizawa, T.; Yamaguchi, M.; Akashi, M. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8656-8658.
- [8] Serizawa, T.; Yamaguchi, M.; Akashi, M. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 724-731.
- [9] Zheng, H.; Okada, H.; Nojima, S.; Suye, S.-i.; Hori, T. *Sci. Technol. Adv. Mat.* **2004**, *5*, 371-376.
- [10] Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Silver, J.; Tabrizian, M. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1564-1571.
- [11] Constantine, C. A.; Gattas-Asfura, K. M.; Mello, S. V.; Crespo, G.; Rastogi, V.; Cheng, T.-C.; DeFrank, J. J.; Leblanc, R. M. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13762-13764.
- [12] Pham le, D.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Desbrieres, J. *Carbohydr. Polym.* **1994**, *24*, 209-214.
- [13] Kertesz, D.; Zito, R. *Bioch. Bioph. Acta* **1965**, *96*, 447-462.
- [14] Forzani, E. S.; Lopez Teijelo, M.; Nart, F.; Calvo, E. J.; Solis, V. M. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 869-879.
- [15] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6117-6123.
- [16] Richert, L.; Lavalle, P.; Payan, E.; Shu, X. Z.; Prestwich, G. D.; Stoltz, J.-F.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C. *Langmuir* **2004**, *20*, 448-458.

- [17] Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. *Phys. Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
- [18] Picart, C.; Lavalle, P.; Hubert, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C. *Langmuir* **2001**, *17*, 7414-7424.
- [19] Coche-Guerente, L.; Desprez, V.; Labbe, P.; Therias, S. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *470*, 61-69.
- [20] Coche-Guerente, L.; Desprez, V.; Diard, J. P.; Labbe, P. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *470*, 53-60.
- [21] Coche-Guerente, L.; Labbe, P.; Mengeaud, V. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3206-3218.

CHAPITRE 3

Chapitre 3 : Modification de surface d'électrodes d'or

3.1 Introduction

Ce chapitre traite de la fonctionnalisation de surfaces d'électrodes d'or et de la caractérisation structurale d'une monocouche d'un thiol, le 3-mercaptopropanesulfonate (MPS), autoassemblé sur ces surfaces. Cette fonctionnalisation est une étape indispensable car elle permet de conférer des charges, négatives dans ce cas, à la surface, ce qui permet ensuite de pouvoir construire un assemblage électrostatique couche par couche. Cette étape doit être reproductible pour caractériser les assemblages ultérieurs avec plus de certitude. Sur cette monocouche de MPS, nous avons réalisé des mesures gravimétriques pour déterminer la masse de MPS adsorbée et pour compléter les études électrochimiques qui vont nous permettre d'avoir des informations sur la structure de cette monocouche et sur ses propriétés remarquables vis-à-vis de différentes espèces redox en solution.

Comme les surfaces d'or fonctionnalisées par des monocouches autoassemblées (SAM) de MPS ou plus généralement de thiols ω -fonctionnalisés, sont souvent utilisées comme transducteurs ampérométriques, il nous est apparu intéressant de comprendre ce comportement particulier en vue d'utiliser ces surfaces comme substrat pour des assemblages multicouches électrostatiques de polyélectrolytes et de biomolécules.

D'un point de vue général, les SAM sont un moyen de contrôler la nature chimique de l'interface métal/solution. Ils offrent la possibilité de combiner une architecture bien définie, de part la longueur de chaîne, la fonction terminale et la facilité de préparation et d'analyse quantitative.

Il a été reconnu que des trous ou pinholes^[1], et autres défauts peuvent exister dans ces monocouches et plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude de ces défauts¹⁻⁸. La plupart de ces études structurales ont été réalisées avec des alcanethiols ou des ω -hydroxythiols, dont les longueurs de chaîne varient entre 2 et 18 unités méthylènes, par différentes techniques électrochimiques, et en utilisant des sondes redox à sphère externe, comme le ferrocène méthanol (FcMeOH)^{2,7}, l'hexacyanoferrate (Fe(CN)₆³⁻)^{2,6,9}, le rutheniumhexaamine, ou l'octacyanomolybdate¹⁰. Ceci permet de comprendre le transfert électronique avec ce type de surfaces modifiées.

[1] Le mot pinhole en anglais signifie le chas d'une aiguille. Nous avons décidé de continuer à utiliser le mot anglais pour désigner ce type de défauts.

Le comportement électrochimique de ces sondes dépend beaucoup du recouvrement surfacique, θ , de la surface d'or par la monocouche de thiol, comme du désordre structural de la monocouche. Pour des monocouches de thiols à longues chaînes alkyles, souvent sans pinholes ($\theta \sim 1$), les voltampérogrammes obtenus donnent des réponses où le transfert de masse n'apparaît pas, au lieu de pics que l'on peut observer sur électrode nue. Dans ces conditions, le processus de transfert de charge s'effectue par effet tunnel à travers d'épaisse couches bien organisées ou dans des sites désorganisés où la monocouche est plus fine. Ces sites correspondent à des défauts structuraux où aucune molécule de thiol n'est adsorbée mais où des molécules adjacentes se replient. Dans ces conditions, la constante standard de vitesse du transfert d'électron, k , pour l'électrode modifiée est reliée à k° , la constante standard de vitesse sur électrode nue, par :

$$k = k^\circ \exp[-\beta d] \quad (1)$$

Où d est l'épaisseur de la monocouche autoassemblée et β la constante de transfert d'électron par effet tunnel. Des valeurs de β de 1,05 et 0,9 par unité méthylène ont été obtenues pour des électrodes d'or modifiées par des alcanethiols¹¹ et des ω -hydroxythiols⁹.

Nous avons montré, dans les paragraphes suivants, que la densité de recouvrement de monocouches de mercaptoalcanesulfonate varie entre 35 et 60% d'une monocouche dense. Il y a au moins deux organisations moléculaires possibles (figure 3.1).

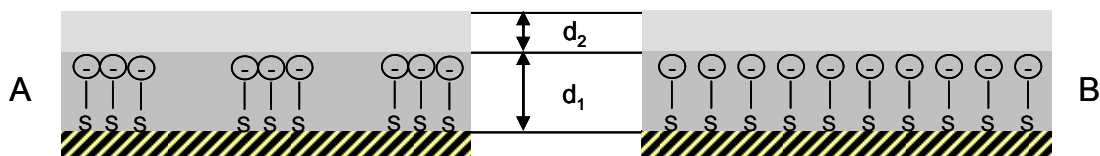


Figure n°3.1 : Représentations schématiques (A) et (B) des structures possibles de l'organisation moléculaire de la monocouche de MPS sur la surface d'or. d_1 correspond à la longueur de la molécule MPS étendue et d_2 à l'épaisseur de la couche d'électrolyte associée

Dans la structure A, des domaines plus ou moins denses sont séparés par des défauts ou des pinholes dont la taille est plus grande que la taille moléculaire du MPS. Dans la structure B, la monocouche de MPS recouvre la surface d'or de manière non compacte, homogène et sans défauts.

Ainsi, trois processus principaux peuvent être considérés pour rendre compte du transfert électronique entre l'or et une espèce redox en solution, sur des électrodes modifiées par du MPS (figure 3.2).

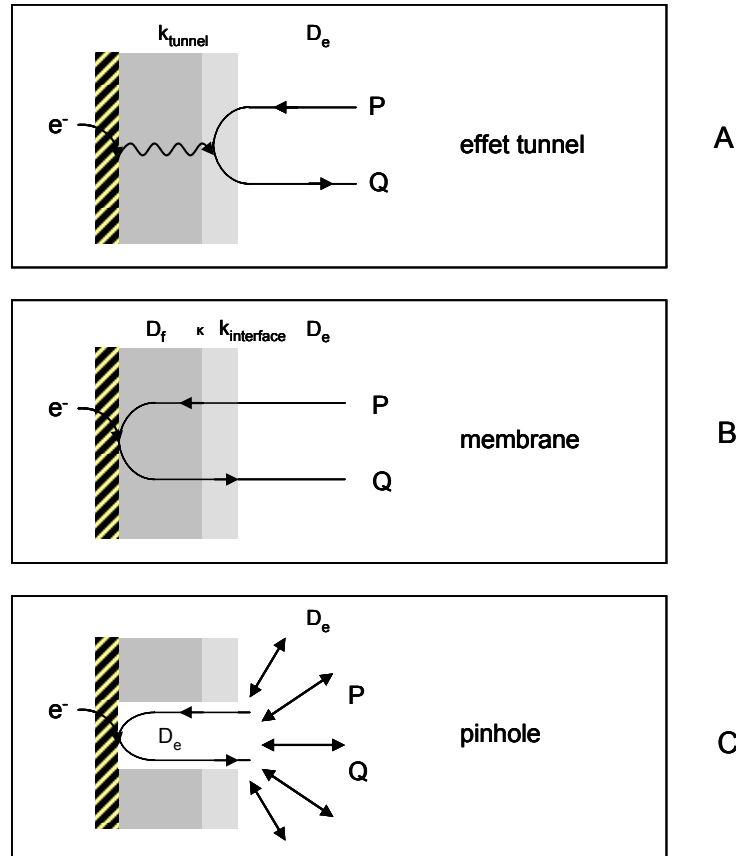


Figure n°3.2 : Représentation schématique de différents modèles décrivant le processus de transfert électronique à travers la couche de MPS (P/Q correspond à un système redox en solution)

A : transfert d'électrons par effet tunnel à travers des domaines sans défaut de la monocouche de MPS, avec une constante de vitesse, k_{tunnel} .

B : perméation des espèces redox dans la monocouche, suivie d'une diffusion dans la couche et du transfert électronique à l'électrode, ce qui correspond à un modèle de membrane. Ce processus cinétique est contrôlé par le coefficient de partage, κ , entre la solution et la membrane, le coefficient de diffusion, D_f , dans la membrane et la cinétique de transport de matière à l'interface film/solution, d'une constante de vitesse $k_{\text{interface}}$.

C : diffusion des espèces redox à travers les sites de défauts jusqu'à l'électrode, où a lieu le transfert électronique, suivant un modèle de pinhole.

Nous avons réalisé des mesures par microgravimétrie et par différentes techniques électrochimiques pour quantifier la structure de la monocouche de MPS et les processus de transfert électronique à travers cette monocouche.

La compréhension du comportement électrochimique particulier de cette monocouche de MPS va ensuite permettre la construction d'un assemblage entre un polyélectrolyte, le chitosane CHI^+ , et une enzyme, la glucose oxydase, Gox, en vue d'une application dans le domaine de la biodétection. Des études par spectroscopie UV-Visible et par microgravimétrie ont été menées pour obtenir des informations sur la structure de tels films autoassemblés. Les résultats obtenus permettront de comprendre le comportement électrochimique et électroenzymatique d'un tel biocapteur.

3.2 Greffage de thiol sur une surface d'électrode d'or

3.2.1 Analyse microgravimétrique de la monocouche de thiol

Pour travailler dans les mêmes conditions que pour l'électrochimie, les cristaux de quartz utilisés sont recouverts d'or et sont traités par une solution Piranha durant 2 minutes. Ce traitement a pour but de nettoyer la surface d'or de tout composé organique. Mais ce traitement n'a pas d'influence sur la rugosité de la surface.

En effet, des images prises par AFM (figure 3.3) nous montrent que la rugosité des surfaces reste la même avec ou sans traitement. De plus, l'analyse de profil de surface de ces échantillons (traités ou non) montre que la surface d'or est très lisse et que l'on peut considérer que la rugosité est de 1, résultat que l'on prendra en compte pour les mesures que l'on va effectuer par microgravimétrie.

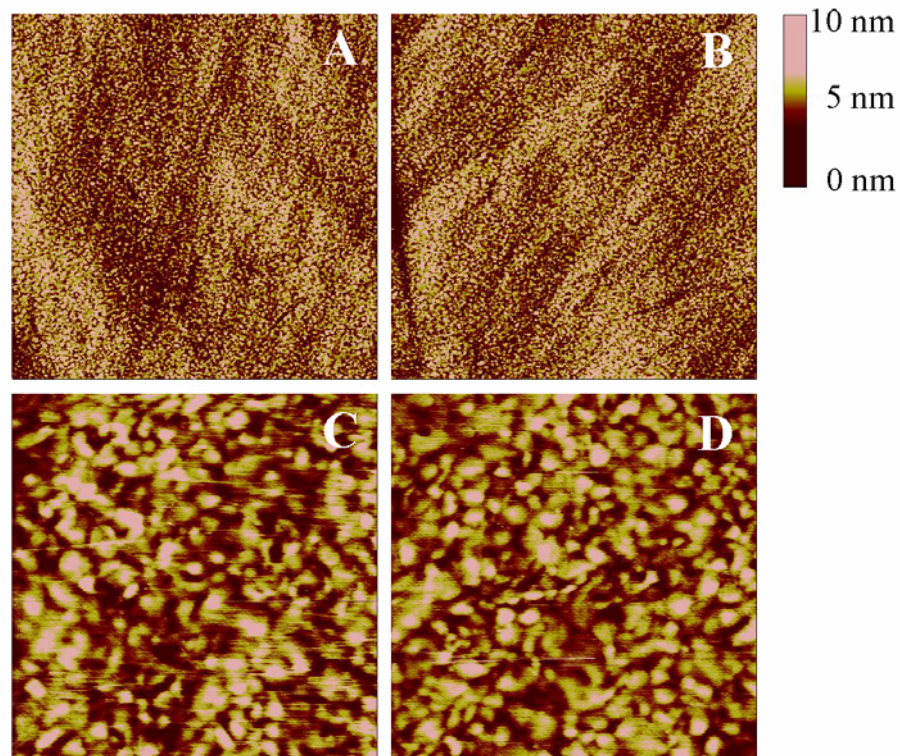


Figure n°3.3 : Images de microscopie à force atomique (AFM) en mode hauteur d'un cristal de quartz recouvert d'or avant (A et C) et après (B et D) un traitement de 2 minutes par une solution Piranha. Les dimensions des images sont de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ pour A et B et $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ pour C et D. La variation maximale en Z est de 10 nm pour chaque image. Les valeurs de rugosité moyenne sont de 0,896, 0,885, 0,902 et 0,806 nm pour A, B, C et D respectivement.

Ainsi, nous avons pu réaliser des mesures microgravimétriques par QCM-D pour déterminer les conditions optimales de la formation de la monocouche autoassemblée de MPS sur or, ainsi que ses propriétés structurales.

L'adsorption de MPS sur des surfaces d'or a déjà été décrite par Calvo et al^{12,13} dans les mêmes conditions expérimentales. Des mesures microgravimétriques ont montré que la couche de MPS, rigide, correspondait à une augmentation de masse de $174 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. Par ellipsométrie, l'épaisseur de cette couche serait comprise entre 1,3 et 2 nm (suivant la longueur d'onde incidente de lumière utilisée)¹².

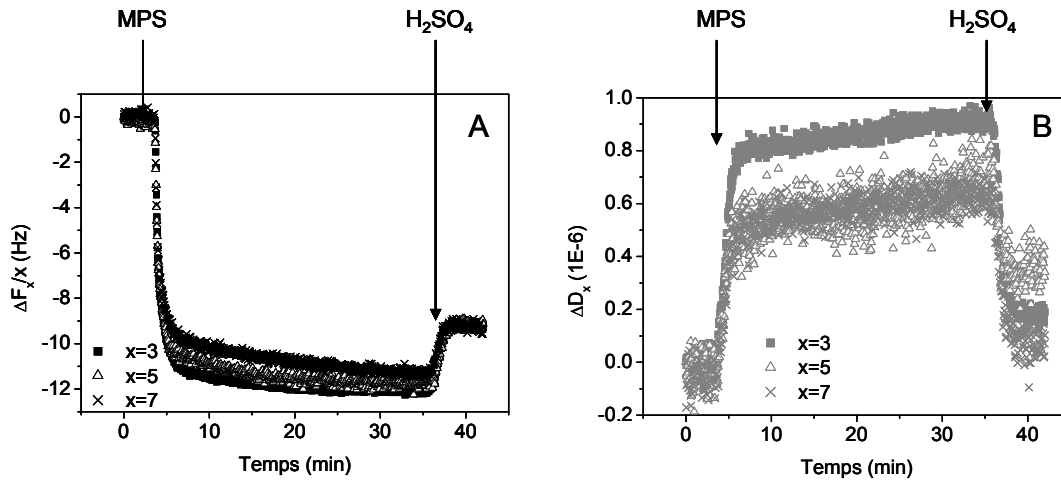


Figure n°3.4 : Mesures par QCM-D du greffage de MPS sur un cristal de quartz recouvert d'or. Evolution de $\Delta F_x/x$ (A) et ΔD_x (B) pour $x=3$ (●), 5(+), et 7(x) en fonction du temps

La figure 3.4 décrit le greffage typique de MPS sur un quartz recouvert d'une surface d'or dans une solution 16 mM d'acide sulfurique, sous un flux de $50 \mu L \cdot min^{-1}$. Les sauts de fréquences ont été normalisés par rapport au nombre de l'harmonique, $\Delta F_x/x$ (figure 3.4A). En injectant, une solution de MPS 20 mM, on observe une diminution rapide de la fréquence de résonance durant la première minute, suivie d'une diminution plus lente pendant les 30 minutes suivantes, ce qui indique que le MPS se greffe à la surface de l'or. En même temps, on remarque que la dissipation d'énergie, ΔD_x , reste inférieure à 10^{-6} (figure 3.4B), signifiant que la couche de MPS est rigide. En rinçant le quartz modifié par de l'électrolyte pur, la dissipation revient à environ zéro, tandis que le saut de fréquence atteint une valeur de 5,4 Hz, indépendamment de l'harmonique étudiée. Ces résultats montrent que la monocouche de MPS est rigide, ce qui nous autorise à utiliser la relation de Sauerbrey. Ainsi, on a calculé une masse surfacique de $166 ng \cdot cm^{-2}$ pour l'adsorption de MPS, ce qui concorde bien avec les résultats obtenus par Calvo¹⁴. Or, on ne peut pas directement déduire la masse surfacique propre aux molécules de MPS adsorbées par des mesures de QCM-D, car cette couche est aussi composée d'eau et d'ions qui contribuent à l'augmentation de la masse.

Il a été rapporté que le recouvrement d'une monocouche dense hexagonale parfaite d'un thiol¹⁵ est de $7,76 \cdot 10^{-10} mol \cdot cm^{-2}$, ce qui correspond à une augmentation de masse de $121 ng \cdot cm^{-2}$. Or, comme cela sera démontré par la suite dans ce chapitre, le

recouvrement de la surface par le MPS est de 60% d'une monocouche dense, ce qui correspond à $4,6 \cdot 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ et donc à $72,6 \text{ ng.cm}^{-2}$.

La longueur d'une molécule de MPS étendue peut être estimée à 0,75 nm. En supposant que l'espace entre les molécules de MPS soit rempli d'eau et que cet espace corresponde à 40% du recouvrement surfacique, on en déduit alors que la masse d'eau est de 30 ng.cm^{-2} . Or les mesures de QCM-D nous donnent une masse de 166 ng.cm^{-2} . Cela montre que la QCM-D est capable de détecter non seulement la couche de MPS mais aussi une couche additionnelle d'eau, qui correspond à une masse de $63,4 \text{ ng.cm}^{-2}$ et à une épaisseur de 0,64 nm. Cela n'est pas surprenant car le MPS est négativement chargé, ce qui favorise les interactions avec les contre-ions hydratés présents dans l'électrolyte et des molécules d'eau. Cette surcouche d'ions et d'eau, rigidement associée à la monocouche de MPS, va sans doute influencer la diffusion d'espèces au sein de cette couche et aussi d'autres processus comme le transfert d'électrons. On peut aussi noter que l'épaisseur totale de la couche de MPS hydratée est de 1,4 nm, ce qui est en bon accord avec l'épaisseur ellipsométrique, mesurée et rapportée dans la littérature¹².

3.2.2 Analyse électrochimique de la monocouche de thiol sur une surface d'électrode d'or

3.2.2.1 Préparation des surfaces d'électrodes d'or

Tout au long de l'étude électrochimique, nous avons utilisé des surfaces d'or polycristallin. Ces surfaces contiennent un grand nombre de grains de différents types, rendant ainsi difficile la description cristallographique non uniforme de ces surfaces.

Cependant, des études ont été réalisées¹⁶ pour montrer que la surface d'or polycristallin consiste en un certain arrangement des trois plus simples plans d'indices (100), (110) et (111), interagissant avec l'eau et des anions.

Les électrodes utilisées sont préalablement polies mécaniquement, puis rincées pendant quelques minutes par une solution Piranha puis par de l'eau, avant de subir une restructuration dans de l'acide sulfurique 0,5 M, permettant le décapage de la surface. En effet, cette restructuration détruit les oxydes d'or en surface (qui ne permettent pas l'adsorption de thiols) par électrochimie. Cette activation de l'électrode consiste en un cyclage, mille fois, entre 0,2 et 1,6 V à 10 V.s^{-1} . Un balayage par voltampérométrie

cyclique (VC) à $0,1 \text{ V.s}^{-1}$ entre 0,2 V et 1,5 V (avant le début de dégagement d'oxygène par oxydation de l'eau sur l'électrode à 1,7 V) est effectué pour connaître l'état de surface de l'électrode avant (courbe a de la figure 3.5) et après (courbe b de la figure 3.5) l'activation. Il est possible de conclure que l'électrode est satisfaisante quand on obtient le type de voltampérogramme cyclique (courbe b) présenté dans la figure 3.5.

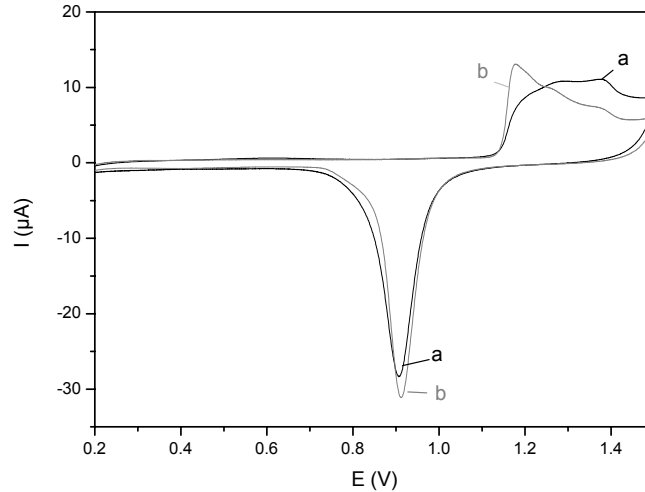


Figure n°3.5 : Courbes de voltampérométrie cyclique (VC) ($0,1 \text{ V.s}^{-1}$) obtenues avant (a) et après (b) la restructuration, par voie électrochimique, d'une électrode d'or (diamètre 2mm) dans H_2SO_4 0,5 M

Les trois pics d'oxydation que l'on voit sur la figure 3.5 (courbe b), lors du balayage aller, après cyclage dans l'acide, correspondent aux transferts successifs de trois électrons pour oxyder l'or. La forme de ces trois pics est censée signaler l'accomplissement d'une monocouche d'oxyde d'or. Lors du balayage retour, un pic cathodique intense est observé vers 0,89 V, indiquant la réduction de la monocouche d'oxyde formé. La surface de ce pic correspond à la quantité d'électricité nécessaire pour réduire cette couche d'oxyde, nous permettant donc de vérifier l'état de surface et de connaître la surface réelle de l'électrode utilisée.

$$\tau_{\text{rugosité}} = \frac{A_{\text{réelle}}}{A_{\text{géométrique}}} \quad (2)$$

Où $A_{\text{réelle}}$ et $A_{\text{géométrique}}$ sont les surfaces réelle et géométrique, respectivement, de l'électrode.

$$A_{\text{géométrique}} = \Pi.r^2 = 0,0314 \text{ cm}^2 \quad (3)$$

$$A_{\text{réelle}} = \frac{Q_{\text{exp}}}{Q_{\text{th}}} \quad (4)$$

Où Q_{exp} et Q_{th} sont les quantités de charge expérimentale et théorique par unité de surface respectivement.

D'après les travaux de Vela¹⁷, la quantité de charge théorique est de $420 \mu\text{C}.\text{cm}^{-2}$, qui correspond à l'adsorption d'une monocouche d'atomes d'oxygène suite à l'oxydation de l'or.

Donc,

$$\tau_{\text{rugosité}} = \frac{Q_{\text{exp}}}{Q_{\text{th}}} * \frac{1}{\Pi.r^2} \quad (5)$$

Ce taux de rugosité est ensuite pris en considération lors des futures mesures de façon à normaliser les résultats obtenus.

Puis, on procède à l'adsorption de la monocouche de MPS, qui ne peut avoir lieu que sur une surface d'or et non d'oxyde.

3.2.2.2 Détermination électrochimique du recouvrement de la surface d'or par la monocouche de thiol

Même en l'absence de réaction électrochimique, on observe un courant, que l'on nomme courant capacitif, puisqu'il traduit le comportement électrique de l'interface électrode/électrolyte, où se produit une accumulation de charges de part et d'autre de l'interface, à la manière d'un condensateur chargé. L'accumulation de charges électriques de chaque côté de l'interface est la conséquence de l'existence, dans les deux phases, de porteurs de charges mobiles.

Si l'épaisseur de la couche chargée à la surface de l'électrode peut être considérée comme très faible ($< 0,1 \text{ \AA}$), celle de la couche de solution, dans laquelle la distribution ionique n'est pas électriquement neutre, est, en raison de la taille des ions, bien plus importante. De plus, cette distribution est complexe car les ions, selon leur nature et la présence de molécules polaires de solvant, auront un comportement différent. En l'absence d'interaction spécifique forte avec la surface d'électrode (adsorption spécifique), les ions ont seulement la possibilité de s'approcher de la surface de l'électrode que jusqu'à une distance de l'ordre de quelques \AA , leurs centres venant se

placer sur une surface parallèle à celle de l'électrode, que l'on appelle plan de Helmholtz. La couche de Helmholtz, comprise entre la surface et ce plan, contient donc seulement des molécules de solvant orientées par le champ électrique, correspondant au diélectrique d'un condensateur. Si tous les ions restaient localisés dans ce plan, on aurait donc l'équivalent d'un condensateur de plaques parallèles, caractérisé par la capacité C_{dc} .

$$C_{dc} = \frac{dQ}{d\phi} \quad (6)$$

Or la variation de potentiel électrique ($d\phi$) est une fonction linéaire de la distance par rapport à l'électrode. Alors :

$$C_{dc} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 S}{d} \quad (7)$$

Où ϵ_r est la permittivité relative à la couche de Helmholtz et ϵ_0 , celle du vide ($\epsilon_0=8,85.10^{-4}$ F.cm⁻¹). Donc, plus l'épaisseur de la double couche, d , sera petite (ce qui signifie que les ions pourront s'approcher plus près de la surface de l'électrode), plus la capacité sera grande, ce qui est le cas pour une électrode nue. Cependant, si on modifie cette électrode par une monocouche de thiol par exemple, on va donc modifier cette épaisseur et la capacité. Ainsi, on obtiendra des informations sur le recouvrement de la surface par la monocouche. Dans le cas du MPS, on a une charge négative en surface, ce qui induira des effets de répulsion entre les groupements sulfonates et les anions présents en solution. De ce fait, plus le recouvrement par la monocouche de MPS est grand, plus d sera grande et donc C petite.

On a :

$$I = I_c + I_f = \frac{dQ}{dt} \quad (8)$$

Où I_c est le courant capacitif et I_f , le courant faradique. En l'absence de courant faradique :

$$I = I_c = \frac{dQ}{dt} = C_{dc} \frac{dE}{dt} = C_{dc} v \quad (9)$$

Avec v , la vitesse de balayage. En traçant, la valeur de I_c (voir figure 3.6B pour la mesure) en fonction de la vitesse de balayage, on obtient la capacité de double couche, qui est la pente la droite obtenue.

Nous avons donc comparé la réponse électrochimique par VC, d'une électrode d'or nu et d'une électrode d'or modifiée par une monocouche autoassemblée de MPS (figure

3.6A), dans du tampon phosphate 0,1 M à pH=6,5. Nous avons ensuite fait varier la vitesse de balayage et, comme on pouvait s'y attendre, la variation du courant capacitif est proportionnelle à la vitesse de balayage (figure 3.6B).

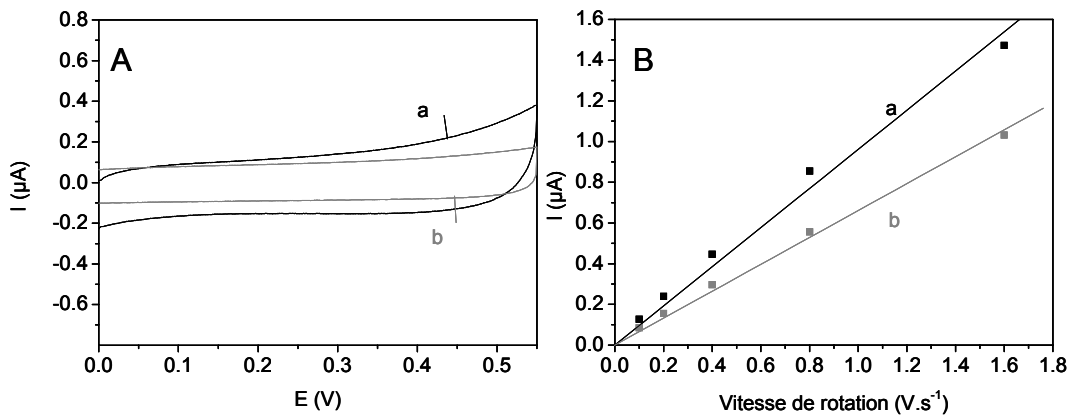


Figure n°3.6 : Courbes de VC ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) dans le tampon phosphate 0,1 M pH=6,5 (A) et variation de l'intensité du courant capacitif à 0,2 V en fonction de la vitesse de balayage (B), avec des électrodes Au (a) et Au/MPS (b)

Pour une électrode nue, nous avons obtenu une capacité de $1,10 \mu\text{F}$, ce qui correspond à $15 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$, en prenant en compte la rugosité de l'électrode, estimée à 2,36.

Une capacité de $20,4 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été mesurée en tampon phosphate 0,1 M pour une électrode d'or, formée par vaporisation sur un substrat en verre¹⁸. Avec une rugosité d'environ 1,3, cela donne $16 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$, ce qui est en bon accord avec nos mesures.

Quant à une électrode modifiée par une SAM de MPS, on a obtenu une capacité de $8,7 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$, valeur comparable à $9,7 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ ¹⁹, qui a été obtenue en tampon phosphate 0,1 M pour une surface d'or modifiée par une SAM de mercaptobutanesulfonate (MBS). Cependant, une surface d'or modifiée par du MBS (dont la longueur est comparable à celle du MPS) donne une capacité de $3 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ dans NaF²⁰, par rapport à $22 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour une électrode d'or nu dans 0,1 M NaF. Si on remplace NaF par NaCl ou NaClO₄, on obtient une plus grande capacité pour Au/MBS. Ceci a été interprété par le fait que les anions fluorures très hydratés sont incapables de pénétrer la couche de MBS malgré sa structure ouverte, comme cela a été démontré, jusqu'à l'or, alors que les ions chlorures, voire les ions perchlorates, le pourraient. A partir de ces résultats et de ces observations, on peut penser que la monocouche de MPS a une structure relativement ouverte, étant donné que sa capacité dans le tampon phosphate 0,1 M est seulement

deux fois moindre que pour l'or nu. Tout comme la présence d'une grande quantité de défauts et de pinholes dans cette couche pourrait expliquer la grande capacité de cette surface.

Par désorption du thiol par réduction électrochimique^{21,22} dans NaOH 0,5 M dans l'eau, il est possible de mesurer la concentration surfacique de cette monocouche de MPS.

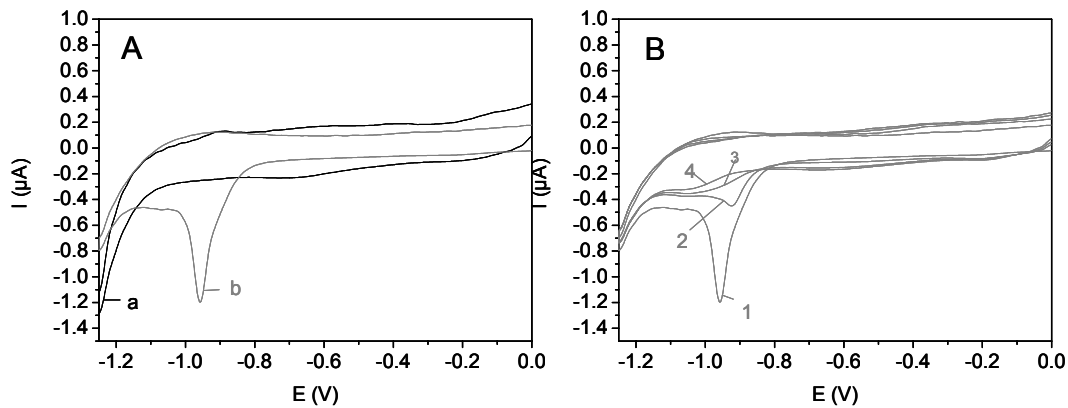
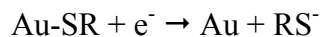


Figure n°3.7 : A : Courbes de VC ($0,02 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) dans NaOH 0,5 M dans H_2O sur Au (a) et Au/MPS (b)
B : quatre courbes de VC successives sur Au/MPS dans les mêmes conditions que A

L'électrode d'or nu ne présente qu'un courant capacitif (courbe a de la figure 3.7A). Quant à Au/MPS, on obtient pour le premier cycle (courbe b de la figure 3.7A), un courant capacitif, de plus faible intensité que pour Au, ce qui reste en accord avec ce que l'on a précédemment observé dans le tampon phosphate, jusqu'à $-0,6 \text{ V}$. Puis, on observe une vague cathodique à $E_{pc} = -0,959 \text{ V}$ avec deux épaulements de plus faible intensité à $-0,92 \text{ V}$ et $-1,04 \text{ V}$. Ces pics cathodiques correspondent à la désorption par réduction du thiol suivant un processus précédemment décrit^{21,22} :



La présence de plusieurs pics cathodiques a déjà été observée et attribuée²¹ à la chimisorption de la monocouche à différents sites d'adsorption. En particulier, la présence de deux vagues a été montrée pour de l'or cristallin (111). L'intensité des 2 pics a été reliée à la proportion relative de sites « terrasse » et de sites « step ». Dans notre cas, or polycristallin, les molécules vont s'adsorber aux sites (100), (110) et (111) avec différentes énergies et donc vont se désorber à différents potentiels, comme les expériences le montrent.

Durant le balayage retour du premier cycle, on remarque une vague anodique de faible intensité, qui correspond à la réadsorption de MPS désorbé durant le balayage cathodique²³.

Les balayages successifs (figure 3.7B) montrent une diminution progressive des vagues cathodiques, qui sont une conséquence de la diffusion en solution des molécules de MPS désorbées. On a donc mesuré la charge du premier pic cathodique, après correction de la ligne de base, ce qui nous a donné une valeur de $44,5 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$, en tenant compte de la rugosité de l'électrode. Cette charge correspond à une concentration surfacique de $4,6\cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ et une aire moléculaire de MPS de 36 \AA^2 . Pour une monocouche dense d'alcanethiol¹⁵, la concentration surfacique est de $7,76\cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, qui correspond à une aire moléculaire de $21,4 \text{ \AA}^2$. D'un point de vue moléculaire, cela signifie que le recouvrement de la surface d'or par des atomes de soufre est de 60% ($21,4/36$). S'il n'y a ni défauts, ni pinholes, on peut dire que la monocouche de MPS n'est pas dense, même si on considère que cette densité surfacique est contrôlée par les groupements sulfonates dont l'aire moléculaire peut être estimée à $28,1 \text{ \AA}^2$ ²³. Cette faible densité est en accord avec les résultats obtenus par Fawcett et al²³.

Pour avoir plus d'informations sur la structure de cette monocouche, la réponse électrochimique par VC de trois sondes redox a été étudiée.

3.2.2.3 Utilisation de sondes redox en solution

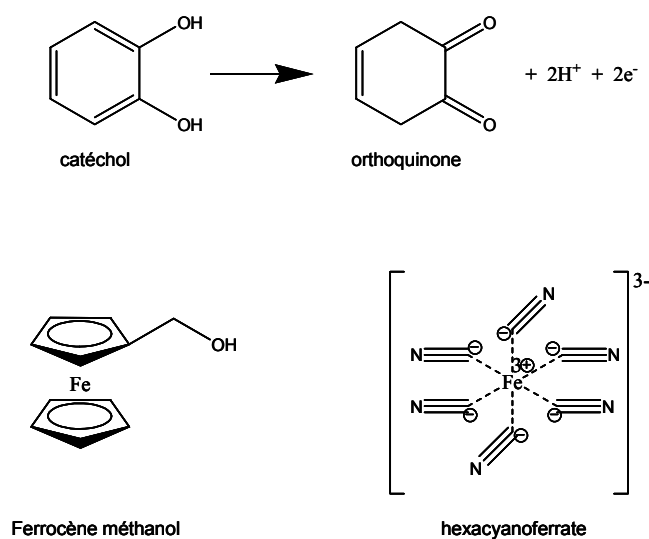


Schéma n°3.1 : Formules chimiques des sondes redox utilisées pour caractériser le transfert électronique sur une électrode d'or modifiée par une monocouche autoassemblée de MPS

Le catéchol a été choisi comme molécule hydrophile qui s'oxyde en orthoquinone via un transfert de 2 électrons et de 2 protons. Le ferrocène-méthanol (FcMeOH) et le ferrocyanure ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) mettent en jeu des processus redox monoélectroniques à sphère externe. FcMeOH est neutre et relativement hydrophobe, alors que $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est hydrophile et négativement chargé. Nous avons aussi vérifié que la réponse électrochimique d'un composé redox hydrophile et cationique, comme le $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ est la même sur Au que sur Au/MPS, ce qui indique que la couche de MPS est perméable au ruthénium hexaamine, résultat en accord avec les résultats obtenus avec le MDS (acide mercaptodécane-sulfonique)²⁴.

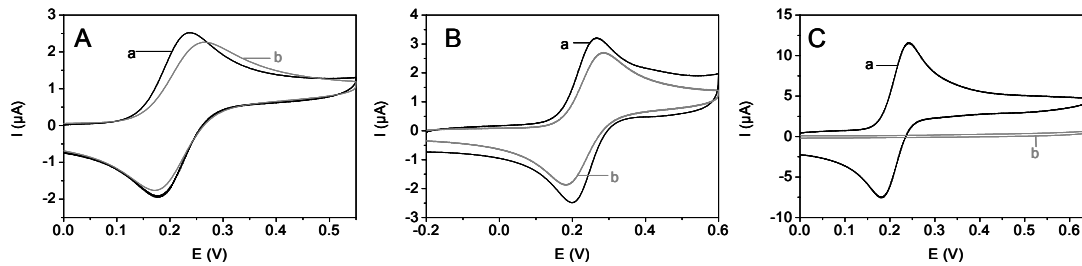


Figure n° 3.8 : Courbes de VC ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) sur Au (a) et Au/MPS (b) dans
A : $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ FcMeOH en tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ $\text{pH}=6,5$
B : $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ $\text{pH}=6,5$
C : $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Catéchol en tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ $\text{pH}=6,5$

Comme le montre la figure 3.8, les VC des FcMeOH et $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ sont très légèrement perturbées par la présence de la monocouche de MPS, alors que la réponse est totalement inhibée dans le cas du catéchol. Le fait que l'électrochimie du catéchol sur Au/MPS est très ralentie indique que la monocouche de MPS ne comporte pas de pinhole et qu'elle est répartie de manière relativement homogène sur toute la surface d'or.

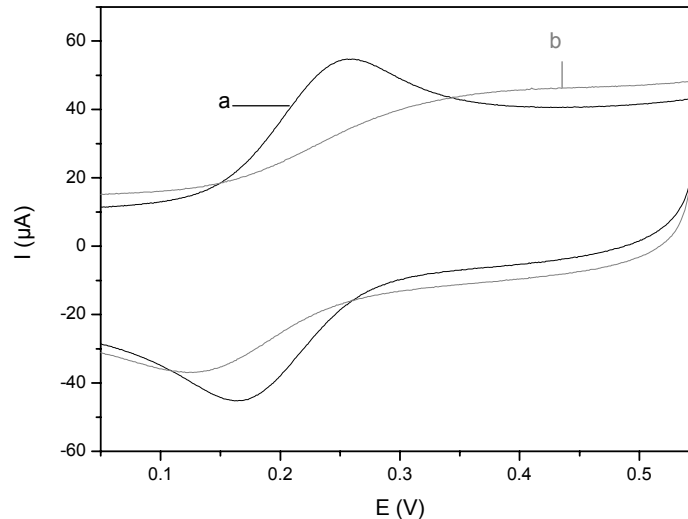


Figure n°3.9 : Courbes de VC du FcMeOH 4.10^{-4} M (25 V.s $^{-1}$) enregistrées sur des électrodes Au (a) et Au/MPS (b) dans le tampon phosphate $0,1$ M à pH=6,5

La figure 3.9 nous montre que, pour des vitesses de balayage plus grandes que celle de la figure 3.8, la différence entre Au et Au/MPS est plus importante, indiquant que le transfert électronique vis-à-vis du FcMeOH est plus lent sur Au/MPS que sur or nu. Pour comprendre le comportement remarquable de cette monocouche de MPS sur Au, et pour interpréter les observations expérimentales, nous avons réalisé une étude cinétique détaillée avec ces différentes sondes redox, sur la base de modèles structuraux décrivant les propriétés des SAM.

3.2.2.4 Cas du catéchol

Un des modèles indique que la couche de MPS n'est pas parfaite et donc que les pinholes, dont la taille est plus grande que la taille moléculaire des sondes redox utilisées, existent uniquement là où le transfert électronique a lieu. Le recouvrement surfacique de MPS peut être quantifié par le paramètre θ . Et donc, $(1 - \theta)$ correspond au pourcentage de pinholes. En admettant que tout le courant passe par les points où l'électrode est nue, il a été montré²⁵ que pour un grand recouvrement ($\theta \sim 1$), la diminution de la constante de transfert de charge apparente est reliée à θ et est donnée par l'expression suivante :

$$k_{Au/MPS}^{\circ} = (1 - \theta)k_{Au}^{\circ} \quad (10)$$

Où k°_{Au} et $k^{\circ}_{Au/MPS}$ sont les constantes de transfert de charge, mesurées sur Au et sur Au/MPS respectivement.

La figure 3.10 présente le mécanisme de réduction de l'orthoquinone (Q) en catéchol (QH_2), mettant en jeu le transfert de deux protons et de deux électrons, soit quatre étapes élémentaires. Pour passer de l'orthoquinone au catéchol, il y a six chemins possibles, six mécanismes, faisant intervenir neuf espèces possibles. Ce processus peut être schématisé par un schéma carré²⁶, comme le montre la figure 3.10.

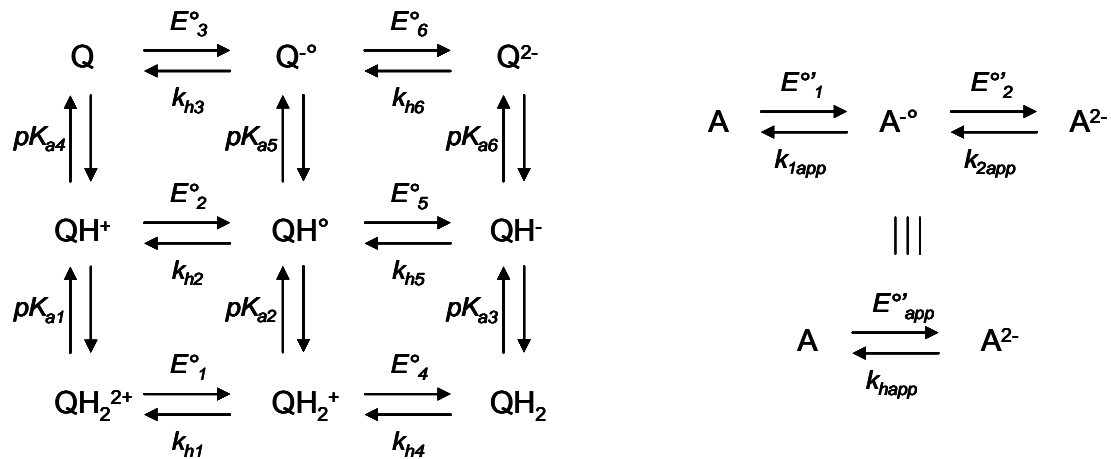


Figure n°3.10 : Schéma carré CECE de réaction du système redox entre le catéchol (QH_2) et l'orthoquinone (Q) et simplification en mécanisme EE puis E

Par le modèle décrit par Laviron²⁷, le système électrochimique orthoquinone/catéchol complexe peut être simplifié en deux étapes apparentes de transfert d'électrons E_1E_2 , avec des potentiels d'équilibre redox standard apparent $E^{\circ\prime}_1$ et $E^{\circ\prime}_2$, et des constantes de transfert k°_{1app} et k°_{2app} (coefficient de symétrie $\alpha=0.5$). Dans ce modèle, ce mécanisme peut encore être simplifié en une seule étape de transfert direct de deux électrons, avec une constante de vitesse de transfert d'électrons k_{app} et un potentiel standard $E^{\circ\prime}_{app}$ avec $E^{\circ\prime}_{app} = 0,5 (E^{\circ\prime}_1 + E^{\circ\prime}_2)$. Selon ces conditions, ce processus est donc cinétiquement contrôlé par une des deux étapes E_1 ou E_2 . Nous avons utilisé ce modèle pour caractériser l'électrochimie du catéchol sur or nu et sur or modifié par une SAM de MPS et pour déterminer les constantes de vitesses de transfert électronique apparentes sur ces surfaces.

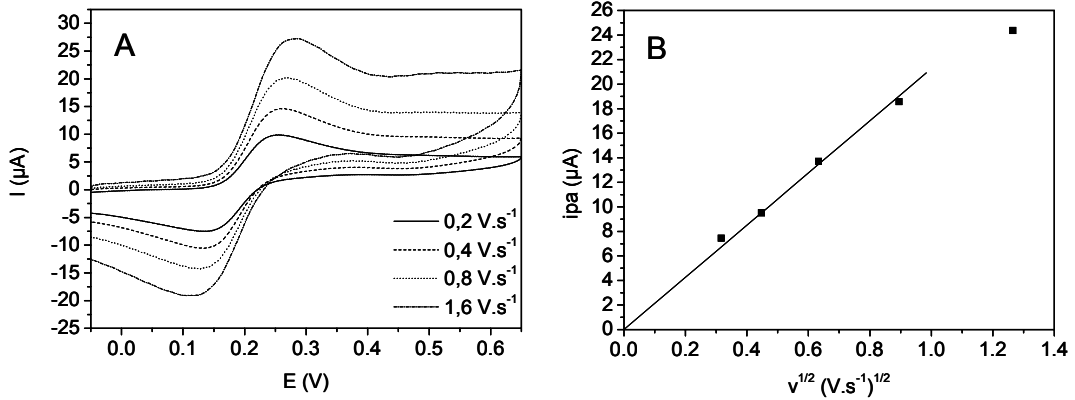


Figure n°3.11 : Courbes de VC sur une électrode d'or nu en présence de catéchol 4.10^{-4} M dans le tampon phosphate 0,1 M à pH=6,5 à différentes vitesses de balayage (A) et variation du courant faradique anodique de l'oxydation du catéchol i_{pa} (mesuré sur les courbes en (A)) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage $v^{1/2}$ (B)

A $0,1 \text{ V.s}^{-1}$, le voltampérogramme du catéchol sur électrode d'or nu fait apparaître un pic d'oxydation à $E_{pa}=0,243 \text{ V}$ et un pic de réduction à $E_{pc}=0,144 \text{ V}$. Donc, on peut mesurer $\Delta E_p=E_{pa}-E_{pc}=0,099 \text{ V}$. En augmentant la vitesse de balayage, les courants anodique et cathodique augmentent de façon proportionnelle à $v^{1/2}$, tandis que E_{pa} , E_{pc} et ΔE_p augmentent. Cependant $E_{1/2}=\frac{1}{2}(E_{pa}+E_{pc})$ reste constant et égal à $0,196 \text{ V}$.

A grande vitesse de balayage, l'oxydation du catéchol n'aurait lieu que suivant un processus d'échange direct irréversible de deux électrons avec $E^\circ=0,196 \text{ V}$. La constante de vitesse limitante de transfert d'électron $k^\circ_{Au}(\text{catéchol})$ a donc été déterminée selon la relation (10), valable pour un système irréversible²⁸, avec $n=2$:

$$i_p = 0,227nFACk^\circ \exp\left[\alpha_{app} n \frac{F}{RT}(E_p - E^\circ)\right] \quad (10)$$

En traçant la courbe $\ln i_{pa}=f(E_{pa}-E^\circ)$, on obtient une droite ($r=0,984$). En calculant la pente de cette droite et l'ordonnée à l'origine, on peut déterminer $k^\circ_{Au}(\text{catéchol})=3,4.10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ et $\alpha_{app}=0,37$.

Si le premier transfert équivalent d'électron est rapide, le processus global est contrôlé par le deuxième équivalent de transfert d'électrons, ce qui correspond à la partie droite du schéma carré de la figure 3.10. Il a été démontré²⁷ que, dans ce cas, le coefficient de transfert anodique apparent est de 0,25. Mais si le processus global d'échange est contrôlé par le premier transfert équivalent d'électron (partie gauche du schéma), alors ce coefficient est de 0,75. Or nous avons obtenu un α_{app} de 0,37, ce qui est plus proche

de 0,25 que de 0,75. On peut donc dire que l'oxydation du catéchol est contrôlée par les réactions de la partie droite du schéma de réaction. Moiroux et al ont pu faire la même observation quant à l'oxydation de l'ubiquinone réduite²⁹.

La figure 3.8C indique que le transfert électronique, lors de l'oxydation du catéchol, est considérablement ralenti par la présence du MPS, par rapport à celui obtenu sur l'électrode d'or nu. Nous avons réalisé des mesures par voltampérométrie à balayage linéaire sur le système Au/MPS à différentes vitesses de balayage en présence de catéchol à 0,4 mM dans le tampon phosphate à 0,1 M à pH=6,5. Sur les courbes que nous avons obtenues, nous avons soustrait le courant capacitif, mesuré en l'absence de catéchol, au courant total mesuré dans le même tampon. Le résultat de cette différence nous donne le courant faradique, dont la variation en fonction du potentiel, est représenté sur la figure 3.12 pour les différentes vitesses de balayage étudiées.

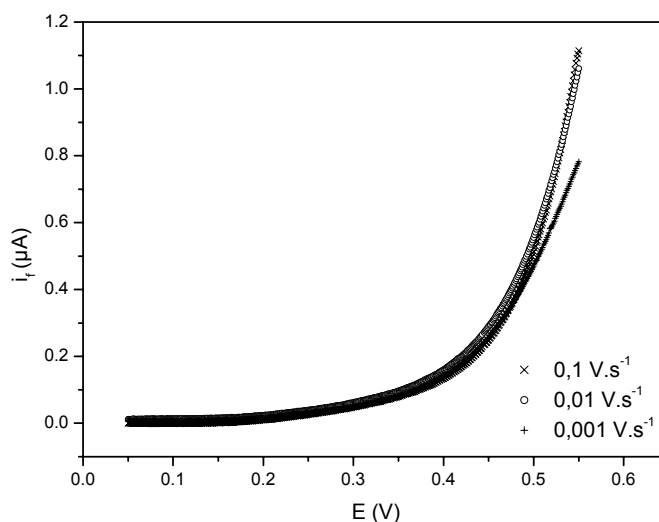


Figure n°3.12 : Variation du courant faradique, i_f , en fonction du potentiel, E , en présence de catéchol à 4.10^{-4} M dans le tampon phosphate $0,1\text{M}$ à $\text{pH}=6,5$, à différentes vitesses de balayage, $0,1(\bullet)$, $0,01(+)$ et $0,001 \text{ V.s}^{-1}(\times)$, pour une électrode d'or modifiée par du MPS

A faible vitesse de balayage, on laisse le temps aux molécules redox de diffuser depuis la solution jusqu'à la surface de l'électrode, l'étape de diffusion n'est donc pas limitante. A grande vitesse de balayage, les espèces redox sont très vite oxydées et l'interface film/solution n'est pas renouvelée assez rapidement. Dans ce cas, le processus électrochimique est limité par la diffusion. On remarque, d'après la figure

3.12, que la réponse électrochimique du catéchol sur Au/MPS ne varie pas avec la vitesse de balayage. Le transport de matière ne constitue pas l'étape limitante, le processus électrochimique du système redox catéchol/orthoquinone est seulement limité par la cinétique de l'étape de transfert de charge. Il est donc possible d'utiliser la relation de Butler-Volmer (12) pour décrire la variation du courant faradique, i_f , en fonction de la surtension ($E - E^\circ$) appliquée.

$$k = k^\circ \exp\left(\alpha_{app} \frac{nF}{RT} (E - E^\circ)\right) \quad (12)$$

La mesure de i_f à différents potentiels donne accès à k , selon la relation (13) :

$$i_f = nFAk[\text{catéchol}] \quad (13)$$

Les tracés de $\log k = f(E - E^\circ)$, avec $E^\circ = 0,196$ V pour les différentes vitesses de balayage de la figure 3.12, donnent des droites, nommées droites de Tafel, représentées sur la figure 3.13. L'exploitation de ces droites permet d'avoir accès à k° et α_{app} , grâce à la relation (14) issue de la relation (12).

$$\log k = \log k^\circ + \left(\alpha_{app} \frac{F}{RT} (E - E^\circ)\right) \quad (14)$$

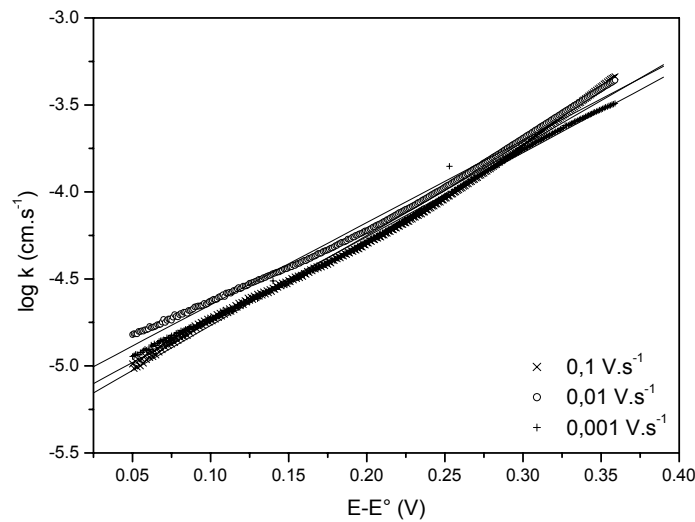


Figure n°3.13 : Tracé des droites de Tafel ($\log k = f(E - E^\circ)$) pour une électrode d'or modifiée par du MPS en présence de catéchol $4 \cdot 10^{-4}$ M dans du tampon phosphate 0,1M à pH=6,5, à différentes vitesses de balayage de 0,1 (●), 0,01 (+) et 0,001 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (×)

Les droites de la figure 3.13 ont été tracées avec d'excellents coefficients de corrélation (0,9989, 0,9965 et 0,9963 pour 0,001, 0,01 et 0,1 V.s⁻¹ respectivement). D'après la relation (14), l'ordonnée à l'origine de la droite de Tafel, permet d'accéder à la valeur de k° . Par extrapolation, nous avons mesuré des ordonnées à l'origine de -5,22, -5,12 et -5,28 pour des vitesses de balayage de 0,001, 0,01 et 0,1 V.s⁻¹ respectivement. En moyennant les valeurs calculées, une constante de vitesse $k^\circ_{\text{Au/MPS}}(\text{catéchol})$ a été mesurée à $6,3 \cdot 10^{-6}$ cm.s⁻¹. Avec le modèle de pinholes, on peut ainsi calculer une valeur de $\theta=0,9981$, d'après l'équation (10). Cette grande valeur de θ indique que la monocouche de MPS représente un recouvrement surfacique quasi parfait. Dans ce modèle, nous avons supposé que le transfert d'électron avait uniquement lieu aux pinholes, dont la taille est *a priori* plus grande ou égale à la taille moléculaire des sondes redox, et aux défauts de la couche de MPS, là où les sondes redox peuvent diffuser. On a aussi supposé que le transfert électronique était inefficace sur une surface recouverte de MPS.

En fait, le transfert électronique peut aussi avoir lieu sur une telle surface par des effets tunnel à travers la couche de MPS, avec une constante de vitesse k°_{tunnel} . Miller et al^{9,10} ont étudié des effets tunnel sur des électrodes recouvertes de ω -hydroxythiol en utilisant des systèmes monoélectroniques à sphère externe. Ils montrent que la constante de vitesse du transfert électronique diminue de façon exponentielle avec la longueur de chaîne de l'alcanethiol avec un facteur de 0,9 par unité méthylène.

$$k^\circ_{\text{tunnel}} = k^\circ_{\text{Au}} \exp[-0,9n_{\text{Me}}] \quad (15)$$

Bien que le système redox catéchol/orthoquinone ne suive pas un processus monoélectronique à sphère externe, la valeur hypothétique de la constante d'effet tunnel a été estimée en supposant que l'électrooxydation du catéchol se produit uniquement par effet tunnel à travers la couche de MPS ($k^\circ_{\text{Au/MPS}} = k^\circ_{\text{tunnel}}$). En prenant en compte une longueur de chaîne de 4 pour le MPS, la relation (15) permet de calculer une plus grande valeur de la constante de tunnel, 1,58 au lieu de 0,9 dans le cas d' ω -hydroxythiol. Ceci concorde avec le fait que l'électrochimie du catéchol est fortement ralentie par la couche de MPS. En comparant cette valeur à celles obtenues pour des systèmes redox monoélectroniques à sphère externe, cela expliquerait aussi que l'oxydation du catéchol est plus complexe et qu'elle implique le transfert séquentiel de 2 électrons et de 2 protons. D'un autre côté, l'oxydation du catéchol peut aussi avoir lieu par un processus de perméation à travers la monocouche de MPS, agissant comme

une membrane. Comme l'oxydation du catéchol sur Au/MPS donne un courant faible, cela peut être la conséquence de plusieurs étapes limitantes.

(i) un coefficient de partage, κ , non favorable, ce qui paraît peu probable du fait du caractère très hydrophile de la couche de MPS

(ii) un coefficient de diffusion faible, ce qui est tout aussi peu probable car la couche de MPS n'est pas dense.

(iii) une haute barrière cinétique pour traverser l'interface MPS/solution et donc une constante de vitesse $k_{\text{interface}}$ faible. Cette étape paraît être l'étape limitante du processus global de perméation. Comme la couche de MPS a une épaisseur de 1,4 nm, il est difficile de dire si le transfert d'électrons se produit par perméation des espèces redox ou par effet tunnel ou par les deux.

3.2.2.5 Cas du ferrocène méthanol et de l'hexacyanoferrate

Le comportement que nous venons de décrire concerne le catéchol mais nous avons vu que l'on obtient un comportement bien différent dans le cas du FcMeOH et de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, dont l'électrochimie est peu perturbée par la présence de MPS sur l'électrode d'or (figure 3.8). Pour mieux comprendre ces phénomènes, nous avons réalisé une étude par voltampérométrie cyclique avec ces deux sondes redox en fonction de la vitesse de balayage (de 0,1 à 25 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$). FcMeOH et $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ se comportent comme des systèmes redox quasi réversibles sur Au et Au/MPS. Les analyses des voltampérogrammes sont regroupées dans le tableau 3.1.

Les valeurs des constantes de vitesse mesurées sur or nu sont en bon accord avec celles données dans la littérature. En supposant que le recouvrement surfacique de MPS ne dépende pas de la nature de la sonde redox, on peut remarquer que les valeurs expérimentales de $k_{\text{Au/MPS}}^{\circ}(\text{FcMeOH})$ et $k_{\text{Au/MPS}}^{\circ}(\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$ ne sont pas en faveur d'un transfert d'électrons ayant lieu uniquement aux pinholes dans la couche de MPS.

Tableau n°3.1 : *Caractéristiques électrochimiques des surfaces Au et Au/MPS, calculées à partir des équations (9) pour les capacités de double couche, C, et (10) pour toutes les constantes sauf pour $k^{\circ}_{Au/MPS}$ qui a été déterminée d'après l'équation (14)*

| Electrolyte | Au | Au/MPS |
|--|---|--|
| Tampon Phosphate 0,1 M, pH=6,5 | $C_{Au} = 15,0 \mu F cm^{-2}$ | $C_{Au/MPS} = 8,7 \mu F cm^{-2}$ |
| Catéchol 0,4 mM dans Tampon Phosphate 0,1 M, pH=6,5 | $k^{\circ}_{Au}(\text{catéchol})=3,4 \times 10^{-3} cm.s^{-1}$ coefficient de symétrie=0,37 $E^{\circ}=0,196 V$ | $k^{\circ}_{Au/MPS}(\text{catéchol})=6,3 \times 10^{-6} cm.s^{-1}$ constante de tunnel=1,58 |
| FcMeOH 0,4 mM dans Tampon Phosphate 0,1 M, pH=6,5 | $k^{\circ}_{Au}(\text{FcMeOH})=0,16 cm.s^{-1}$ $E^{\circ}=0,207 V$ | $k^{\circ}_{Au/MPS}(\text{FcMeOH})=6,9 \times 10^{-3} cm.s^{-1}$ constante de tunnel=0,79 |
| $Fe(CN)_6^{3-}$ 0,4 mM dans Tampon Phosphate 0,1 M, pH=6,5 | $k^{\circ}_{Au}[Fe(CN)_6^{3-}]=0,04 cm.s^{-1}$ $E^{\circ}=0,231 V$ | $k^{\circ}_{Au-MPS}[Fe(CN)_6^{3-}]=4,4 \times 10^{-3} cm.s^{-1}$ constante de tunnel=0,55 |

Dans le cas du FcMeOH, par exemple, $(1-\theta)k^{\circ}_{Au}(\text{FcMeOH})$ est 25 fois inférieur à $k^{\circ}_{Au/MPS}(\text{FcMeOH})$. Donc, comme le processus de pinhole ne contribue que faiblement, le transfert d'électrons pour FcMeOH se produit par effet tunnel ou par perméation des espèces redox à travers la partie sans pinhole de la couche de MPS, qui représente un recouvrement surfacique θ de 0,9981. Il a été reconnu que des surfaces modifiées par des mercaptoalcanesulfonates agissent comme une barrière cinétique envers des composés organiques à cause de leur grande hydrophilie²⁴. Or, le FcMeOH, du fait de sa neutralité et de sa faible solubilité en solution aqueuse par rapport au catéchol, peut être considéré comme hydrophobe. Donc, la diffusion de FcMeOH à travers la couche de MPS devrait être lente. Ainsi, on peut considérer que dans ce cas, le transfert électronique a lieu par effet tunnel essentiellement. En utilisant la modèle de Miller, on mesure une constante de tunnel de 0,78, qui est comparable avec les valeurs de 0,9 et 1,1 pour des ω -hydroxythiol et des alcanethiol respectivement, dans le cas de systèmes redox monoélectroniques à sphère externe.

On peut tenir le même raisonnement dans le cas de $Fe(CN)_6^{3-}$ car on peut s'attendre à ce que la diffusion de ce composé, très négativement chargé, à travers la couche de MPS, soit aussi lente à cause de phénomènes de répulsion électrostatique avec les

groupements sulfonates du MPS. On peut donc calculer la constante de vitesse par effet tunnel correspondante $k_{\text{tunnel}}=0,55$.

Bien que la détermination des constantes de tunnel comporte quelques incertitudes, la grande tendance est que ces constantes sont plus élevées dans le cas de molécules hydrophobes que dans le cas de molécules plus hydrophiles. Ce qui signifie que l'effet tunnel est moins efficace pour FcMeOH que dans le cas de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Comme nos mesures ont été réalisées à force ionique élevée, il y a un effet d'écran des charges des groupements sulfonates de la monocouche de MPS, ce qui a pour conséquence de diminuer la répulsion électrostatique de ces groupements avec les anions. Comme l'anion hexacyanoferrate est hydrophile, la distance de répulsion électrostatique entre les groupements sulfonates et cet anion devient plus courte à force ionique élevée que dans le cas du FcMeOH.

Il a été montré que la monocouche de MPS n'est pas perméable au catéchol et que le transfert électronique du système catéchol/orthoquinone est fortement ralenti. Etant donné que le produit issu de la réaction enzymatique de la polyphénol oxydase avec le catéchol, est l'orthoquinone, il sera donc très difficile de détecter cette espèce. Par conséquent, la construction d'un assemblage électrostatique de polyphénol oxydase avec un polyélectrolyte, sur une SAM de MPS, ne peut être envisagée pour des applications de biodétection. Cependant, l'électrochimie du FcMeOH n'est pas, ou presque pas, modifiée par la présence de MPS sur or. Donc, si on immobilise la glucose oxydase (Gox) dans un autoassemblage avec un polyélectrolyte, comme le chitosane, pour ses propriétés biocompatibles, on pourra utiliser le FcMeOH comme médiateur redox de l'enzyme et cet assemblage pourra être utilisé dans la biodétection.

3.3 Immobilisation de glucose oxydase dans un autoassemblage électrostatique multicouche avec le chitosane quaternisé

La glucose oxydase (Gox) est l'enzyme la plus utilisée dans le domaine de la biodétection du glucose. Il est bien connu que cette enzyme modèle catalyse l'oxydation du β -D-glucose en D-gluconolactone et eau oxygénée. L'eau oxygénée peut être détectée directement à la surface de l'électrode mais pour cela, il est nécessaire d'appliquer un potentiel relativement élevé pour l'oxyder. De plus, l'eau oxygénée a

l'inconvénient de pouvoir réagir avec la glucose oxydase en provoquant sa dénaturation. Pour pallier ce problème, certains médiateurs redox sont utilisés, comme des composés à base de ferrocène.

Pour éviter de travailler à pH acide, où le chitosane est protoné, nous avons choisi de travailler avec un chitosane chimiquement modifié (CHI^+) (voir chapitre 2, paragraphe 2.3), lui conférant une charge positive permanente. Les études, présentées ci-après, ont pour but de déterminer la structure d'un assemblage entre le chitosane quaternisé (CHI^+) et la glucose oxydase, par des méthodes spectroscopiques, microgravimétriques et électrochimiques.

3.3.1 Analyse spectroscopique

Pour pouvoir suivre la construction de l'assemblage $(\text{CHI}^+/\text{Gox})_n$ par spectroscopie UV-Visible, il est nécessaire de connaître les caractéristiques spectroscopiques de la Gox pour déterminer la quantité de Gox immobilisée dans le film couche après couche.

Le site actif de la Gox comporte deux unités flavines (FAD) de 80 kDa chacune. D'après la figure 3.14, le spectre UV-Visible de la solution d'enzyme présente deux bandes d'absorption caractéristique de la flavine (FAD (forme oxydée) et FADH_2 (forme réduite)) dans le domaine du Visible : 380 nm et 450 nm. Le coefficient d'extinction molaire de la flavine FAD à 450 nm est égale à $1,41 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et on peut définir un coefficient d'extinction molaire différentiel ϵ_{diff} ($=\epsilon_{\text{FAD}} - \epsilon_{\text{FADH}_2}$) de $1,31 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ³⁰. La bande caractéristique à 450 nm permet d'accéder à la quantité d'enzyme active. Le spectre présente également une bande caractéristique à 277 nm d'intensité relative plus élevée que celle des bandes à 450 nm et à 380 nm. Cette bande à 277 nm est caractéristique de la protéine. Son coefficient d'extinction molaire a été déterminé par la mesure d'absorbance d'une solution d'enzyme purifiée et grâce à un test de Biuret³¹. Il est possible de déterminer le pourcentage de protéine dans un lot d'enzyme. Selon la loi de Lambert-Beer ($A = \epsilon l C$), on obtient $\epsilon_{277} = 2,65 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cependant, ce coefficient correspond à l'absorption de lumière pour la quantité totale de protéine.

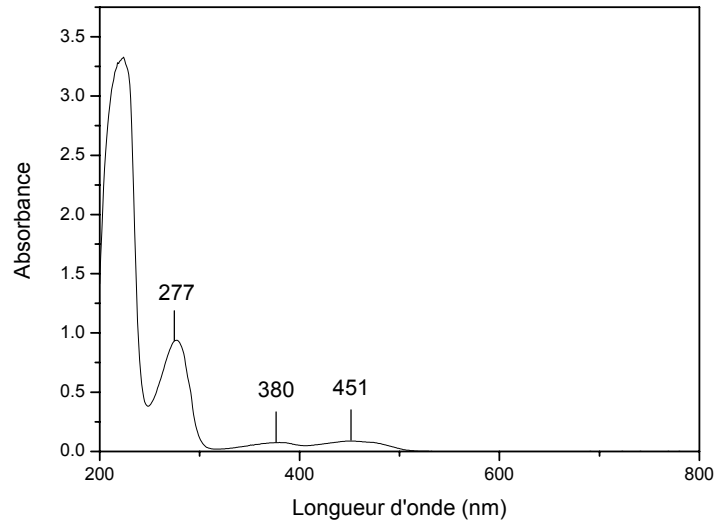


Figure n°3.14 : Spectre d'absorption d'une solution de Gox à 1 mg.mL^{-1} , dans du tampon acétate de force ionique $0,1 \text{ M}$ et de $\text{pH}=5,5$, en absence de glucose, dans une cuve de 1 cm de trajet optique

La détermination de la quantité d'enzyme active est réalisée par un test d'activité enzymatique basé sur la variation d'absorbance à 450 nm .

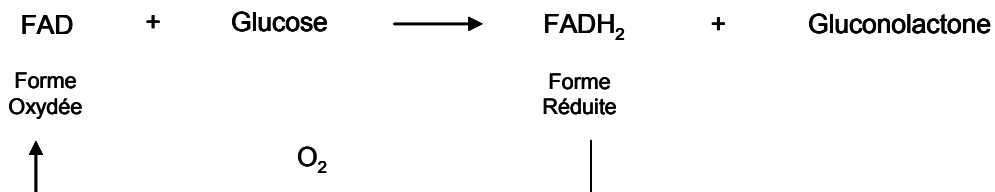


Figure n°3.15 : Schéma réactionnel simplifié du cycle enzymatique de la Gox

La figure 3.15 nous montre la réaction d'oxydation du glucose par le groupe FAD. La forme active de l'enzyme (FAD) est régénérée par la présence d'oxygène qui va oxyder la forme FADH_2 du co-enzyme de la Gox. Dans une cuve de quartz hermétiquement fermée, on ajoute une quantité connue de glucose, suffisante et en excès pour réduire tous les groupements FAD en FADH_2 jusqu'à consommation totale de l'oxygène présent dans le milieu. La forme réduite de la flavine possède les mêmes bandes d'absorption que sa forme oxydée, avec un coefficient d'extinction plus faible. De la mesure de la diminution d'absorbance à 450 nm (ΔA), on en déduit la concentration en enzyme active $[\text{Gox}]_a$.

$$A_{450} = A_{FAD} + A_{FADH_2} = \varepsilon_{FAD} l [FAD] + \varepsilon_{FADH_2} l [FADH_2]$$

$$\Delta A = A_{FAD} - A_{FADH_2} = (\varepsilon_{FAD} - \varepsilon_{FADH_2}) [FAD]_a$$

$$[Gox]_a = \frac{[FAD]_a}{2} = \frac{\Delta A}{2\varepsilon_{diff}} \quad (\text{pour } l=1\text{cm}) \quad (\text{pour une paroi de cuve})$$

Ce lot d'enzyme contient 90% de protéine d'après la méthode Biuret. Ce pourcentage sera pris en compte pour mesurer la concentration de Gox par spectroscopie UV-Visible avec $\varepsilon_{277}=2,65.10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Dans la suite des études, nous avons réalisé les assemblages $(CHI^+/Gox)_n$ dans une solution de tampon phosphate. Nous avons vérifié que le spectre d'une solution de Gox dans du tampon phosphate à pH=8 et de force ionique 0,1 M est le même que celui obtenu à la figure 3.14.

Puis, nous avons réalisé des mesures spectroscopiques d'un assemblage de $(CHI^+/Gox)_n$ sur un cuve de quartz préalablement modifiée (voir partie expérimentale) pour suivre couche après couche la construction de cet assemblage.

La figure 3.16 présente les spectres obtenus pour différents nombres de bicouches, n.

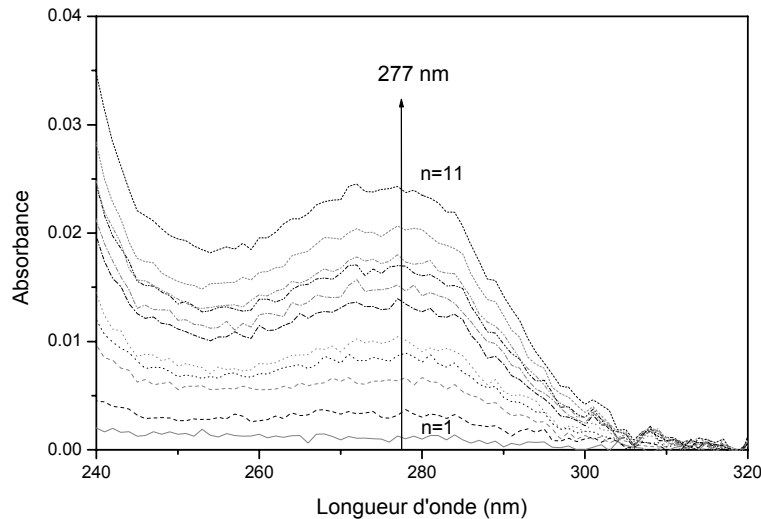


Figure n°3.16 : *Spectres d'absorption de différentes bicouches de CHI^+/Gox (assemblées à partir de la mise en contact, avec les parois de la cuve de quartz, de solution de CHI^+ à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ durant 20 minutes et de Gox à 1 mg.mL^{-1} durant 30 minutes, dans du tampon phosphate de pH=8 et de force ionique 0,1 M, respectivement) enregistrés dans le même tampon*

En relevant l'absorbance à 277 nm, couche par couche, et en supposant que le coefficient d'extinction molaire mesuré en solution à 277 nm est le même quand l'enzyme est immobilisée dans un film autoassemblé, on peut déterminer la concentration surfacique totale de Gox à chaque couche, Γ_{Gox} .

$$\Gamma_{Gox} = \frac{A}{2\epsilon_{277}} \quad (\text{pour une paroi de cuve}) \quad (16)$$

Les mesures d'absorbance à 277 nm et les calculs effectués selon la relation (16) nous ont permis de tracer la courbe présentée par la figure 3.17.

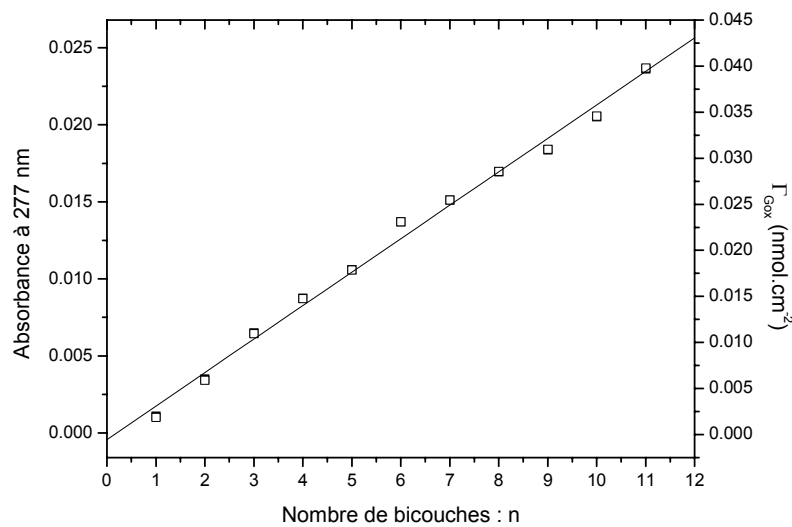


Figure n°3.17 : Evolution de l'absorbance mesurée à 277 nm (échelle de gauche) et de la concentration surfacique de Gox (échelle de droite) en fonction du nombre de bicouches, n , d'un assemblage Quartz/(CHI⁺/Gox) _{n} , réalisé par l'adsorption de CHI⁺ à partir d'une solution à 0,5 mg.mL⁻¹ durant 20 minutes et par l'adsorption de Gox à partir d'une solution à 1 mg.mL⁻¹ durant 30 minutes dans le tampon phosphate de force ionique 0,1 M et de pH=8

La figure 3.17 nous montre que l'augmentation de l'absorbance est linéaire, ce qui indique la reproductibilité de l'adsorption de Gox. Ce résultat est en accord avec plusieurs travaux^{32,33}. La pente de la droite obtenue permet de calculer une quantité moyenne d'enzyme immobilisée par couche, $3,64 \cdot 10^{-12}$ mol.cm⁻². Connaissant l'aire de projection d'une molécule de Gox, soit 58 nm²³⁴, on peut calculer la quantité surfacique de Gox pour une monocouche dense, soit $1,7 \cdot 10^{-12}$ mol.cm⁻². Dans notre assemblage

multicouche de (CHI⁺/Gox), la quantité immobilisée à chaque couche correspond à environ deux fois celle d'une monocouche dense. Nous avons remarqué, dans le premier chapitre de ce mémoire, que la dépendance linéaire de l'absorbance avec le nombre de couches n'est pas une preuve de la stratification du film. Il a également été remarqué, à plusieurs reprises, qu'il y a une interpénétration des couches plus importante à force ionique élevée. De plus, le chitosane utilisé est un polyélectrolyte (PE) très hydrophile de part ses groupes hydroxyles et sa charge positive permanente. Il a été montré qu'il y a diffusion des molécules de PE lors de leur adsorption dans les couches précédemment adsorbées³⁵. On peut donc considérer que les molécules de Gox diffusent dans les couches de CHI⁺, ce qui permet d'immobiliser une plus grande quantité de Gox qu'une seule monocouche, comme cela est schématisé par la structure B dans la figure 3.18.

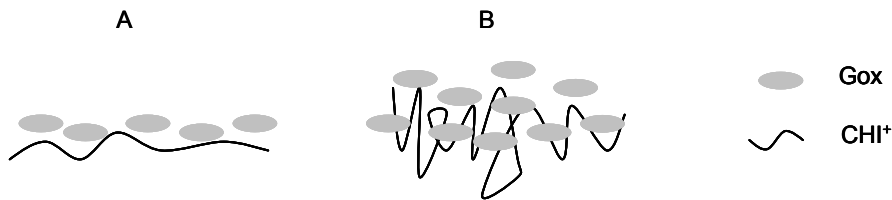


Figure n°3.18 : Représentation schématique de la structure possible d'une bicouche de (CHI⁺/Gox). La structure A tend vers l'hypothèse de stratification, hypothèse peu probable. La structure B fait intervenir la diffusion des molécules de Gox dans la couche de chitosane quaternisé, semblable à l'interpénétration de couches de polycation et de polyanion.

Cette observation peut être confirmée par des mesures microgravimétriques permettant la détermination de la masse surfacique de chaque couche.

3.3.2 Analyse microgravimétrique d'un assemblage de chitosane et de glucose oxydase

Nous avons suivi *in situ* la construction d'un assemblage entre le CHI⁺ et la glucose oxydase par QCM-D. La figure 3.19 représente ces mesures en fonction du temps, pour la première bicouche CHI⁺/Gox déposée sur Au/MPS.

Comme nous l'avons vu précédemment, nous avons mesuré les variations de fréquences $\Delta F_x/x$ (pour $x=3, 5$ et 7). Nous avons aussi mesuré les variations de dissipation d'énergie correspondantes ΔD_x .

On remarque que, dès l'adsorption de CHI^+ , ainsi que pour l'adsorption de Gox, les sauts de fréquence et de dissipation sont élevés. De plus, $\Delta F_x/x$ dépend de x . Ceci nous indique que ce type de film n'est pas rigide mais viscoélastique.

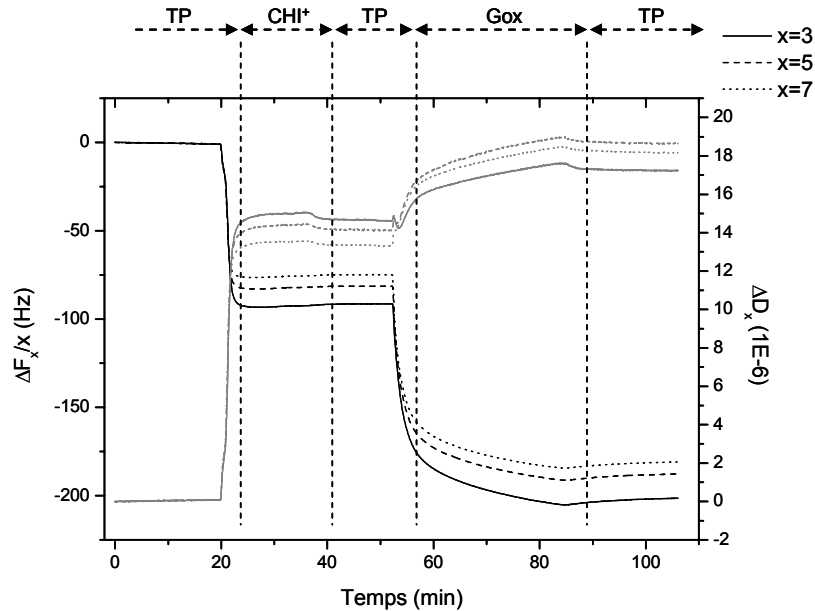


Figure n°3.19 : Mesures par QCM-D d'un assemblage d'une bicouche de CHI^+ /Gox (CHI^+ à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ et de Gox à 1 mg.mL^{-1} , dans du tampon phosphate de $\text{pH}=8$ et de force ionique $0,1 \text{ M}$) sur un cristal de quartz recouvert d'or, modifié par du MPS, sous un flux de $50 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$. Evolution de $\Delta F_x/x$ en noir (échelle de gauche) et ΔD_x en gris (échelle de droite) en fonction du temps

Par QCM-D, un faible changement de viscosité du milieu en contact avec le quartz entraîne une variation de fréquence. Ce changement de viscosité de la solution de tampon provient de la présence d'un composé (CHI^+ ou Gox par exemple) dans cette solution tampon. Pour connaître la valeur effective du saut de fréquence et de dissipation, pour l'adsorption d'une espèce, CHI^+ ou Gox, il faut relever les valeurs avant et après adsorption de cette espèce, avec une même référence. Nous avons choisi de relever les valeurs des fréquences et des dissipations, sur les paliers correspondant au tampon, avant et après adsorption, pour chacune des couches. Ce qui a permis de construire les graphes de la figure 3.20.

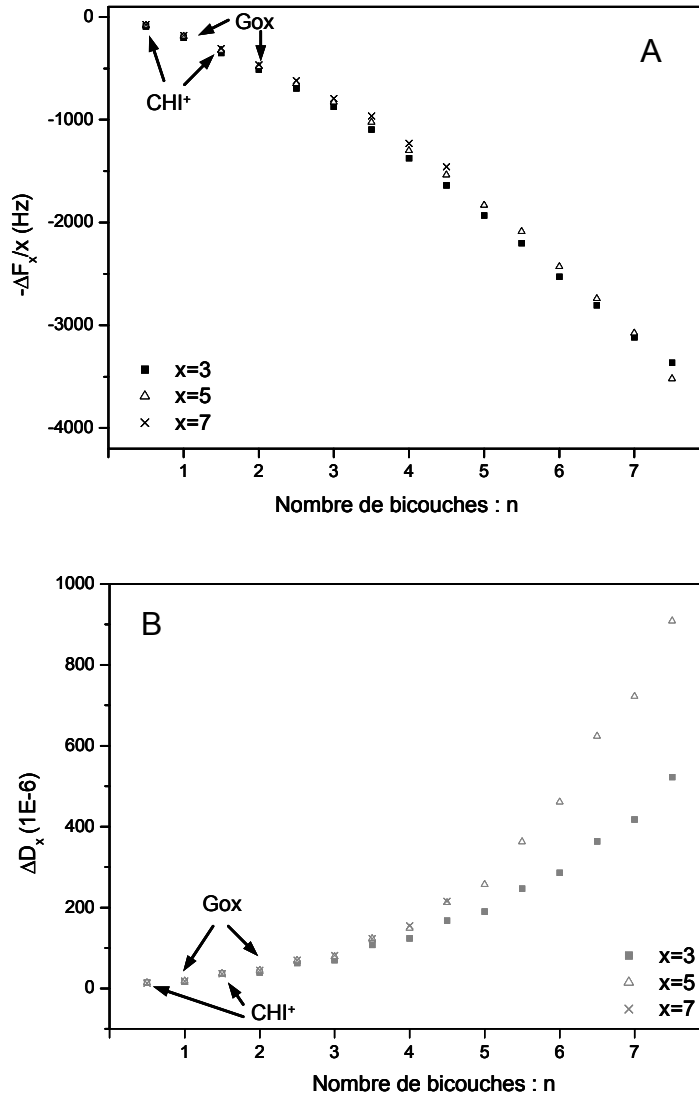


Figure n°3.20 : Variation de $\Delta F_x/x$ (A) et de ΔD_x (B) pour $x=3, 5$ et 7 en fonction du nombre de couches de $(CHI^+/Gox)_n$, adsorbé sur une surface Au/MPS. Pour n demi-entier, l'assemblage se termine par une couche de CHI^+ et pour n entier, la dernière couche est constituée de Gox.

D'après ces courbes, on peut remarquer que l'augmentation des sauts de dissipation n'est pas linéaire et que les valeurs de dissipation sont élevées, ce qui signifie que ce film n'est pas rigide mais viscoélastique. Ceci a déjà été observé dans des assemblages contenant du chitosane dans un tampon à force ionique élevée³⁵.

Par spectroscopie UV-Visible, on a mesuré qu'une couche de Gox correspondait à une quantité surfacique moyenne de $3,64 \cdot 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$. Connaissant la masse molaire de la Gox (160 kDa), on aurait donc une augmentation de masse de 582 ng.cm^{-2} . En modélisant nos mesures par le modèle viscoélastique de Voinova³⁶, on obtient, d'après

la figure 3.21, une augmentation de masse de 1500 ng.cm^{-2} pour l'adsorption de la 1^{ère} couche de Gox. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la 1^{ère} couche de Gox désorbe quelques molécules de CHI^+ ainsi que de l'eau et des anions contenus dans la 1^{ère} couche de CHI^+ . L'obtention de la masse surfacique de chaque couche, en modélisant les données obtenues de la figure 3.20, est présentée sur la figure 3.21.

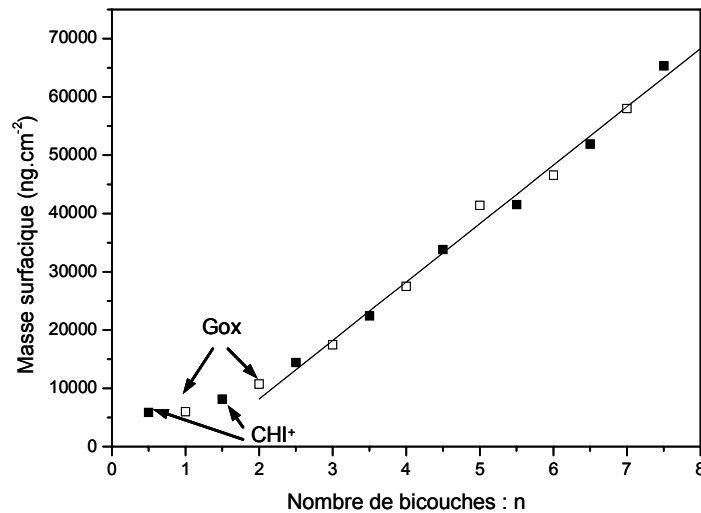


Figure n°3.21 : Evolution de la masse surfacique Γ , obtenue par modélisation des résultats présentés dans la figure 3.20, en utilisant le modèle de Voinova³⁶, en fonction nombre de couches de $(\text{CHI}^+/\text{Gox})_n$, adsorbé sur une surface Au/MPS. Pour n demi-entier (■), l'assemblage se termine par une couche de CHI^+ et pour n entier (□), la dernière couche est constituée de Gox.

Puis, à partir de deux bicouches de $(\text{CHI}^+/\text{Gox})$, on remarque une croissance linéaire du film. Nous avons calculé une masse surfacique moyenne par couche de Gox de 4895 ng.cm^{-2} . Il a été montré, dans la littérature³⁷, que les premières couches sont plus fines que les suivantes, ce qui explique que cette augmentation n'est pas observée pour les premières couches.

Etant donné que l'on a un film épais et très dissipatif, comme le montrent les valeurs de la figure 3.20B (environ 650.10^{-6} pour 7 bicouches), l'amortissement est tel que l'appareil ne peut plus analyser correctement le signal mesuré, même en excitant le quartz à son intensité maximale. C'est pour cette raison que nous n'avons pas pu analyser plus de 7,5 bicouches de $(\text{CHI}^+/\text{Gox})$ sur une surface Au/MPS.

La QCM-D nous permet de calculer la masse d'eau et d'ions contenus dans ces assemblages. Par spectroscopie UV-Visible, nous avons mesuré une quantité surfacique moyenne de Gox de 582 ng.cm^{-2} . La quantité d'eau et d'ions contenus dans l'assemblage représente, en moyenne, un pourcentage de 88% $((1-582/4895) \times 100)$.

Ceci indique que l'hydratation du film est importante, ce qui explique le caractère viscoélastique du film. Ces résultats confirment aussi l'hypothèse de la diffusion des molécules de Gox dans les couches épaisses de CHI^+ , comme nous avons pu le voir par l'exploitation des données obtenues par spectroscopie UV-Visible. De plus, cet environnement est favorable à l'activité de l'enzyme, qui a été déterminée par des mesures électrochimiques, comme nous avons pu aussi le remarquer pour un assemblage de CHI^+ et de PPO, qui a été traité dans le chapitre 2 de ce mémoire.

3.3.3 Etude des propriétés électrochimiques d'un assemblage de chitosane et de glucose oxydase

Etant donné les résultats obtenus sur cet assemblage de Gox avec du chitosane quaternisé, nous avons voulu déterminer les caractéristiques de cette bioélectrode enzymatique, dont le principe est rappelé par la figure 3.22.

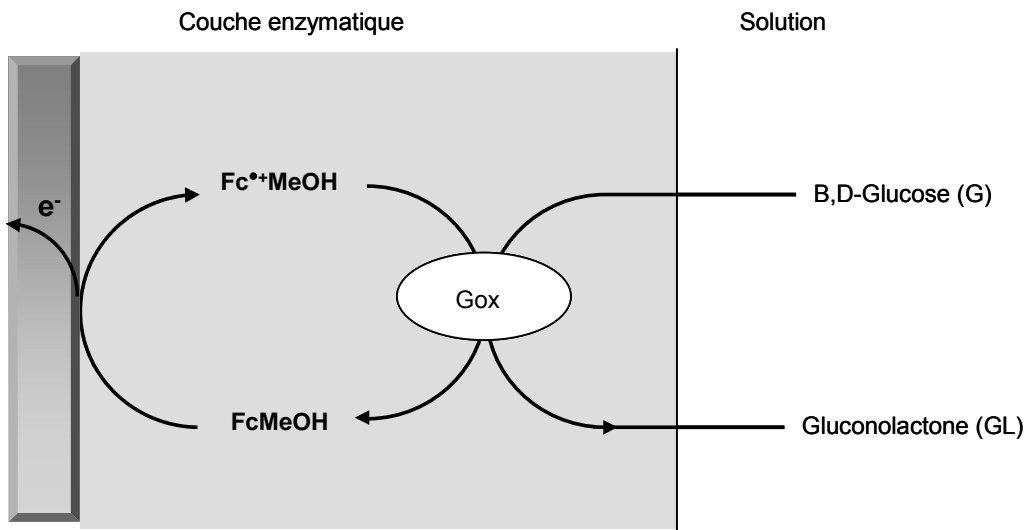


Figure n°3.22 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique à glucose, avec médiation artificielle par le ferrocène méthanol qui régénère l'enzyme au lieu de l'oxygène, médiateur naturel de la Gox

D'après la figure 3.22, lors de l'ajout de glucose, la Gox à l'état oxydé va réagir avec ce dernier pour former de la gluconolactone. On peut écrire le mécanisme réactionnel par des équations de réaction représentées par la figure 3.23.

Le radical cation de FcMeOH électrogénéré à l'électrode peut réagir avec la forme réduite de la Gox (FADH_2) et régénérer la forme active (FAD).

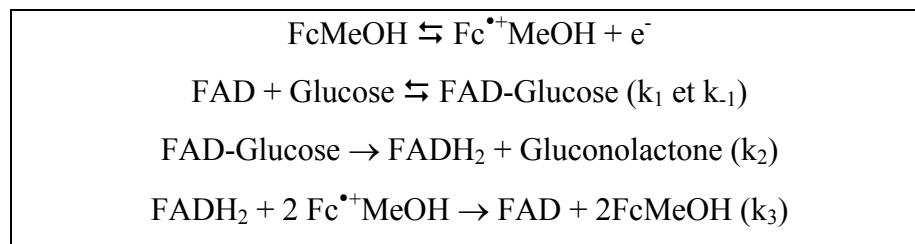


Figure n°3.23 : Schéma réactionnel du cycle catalytique de la glucose oxydase mettant en jeu le coenzyme FAD et le médiateur redox à base de ferrocène

Nous avons donc réalisé des mesures électrochimiques, par voltampérométrie cyclique, de ce système en l'absence et en présence de glucose, dont certains des voltampérogrammes obtenus pour un tel système sont présentés en figure 3.24.

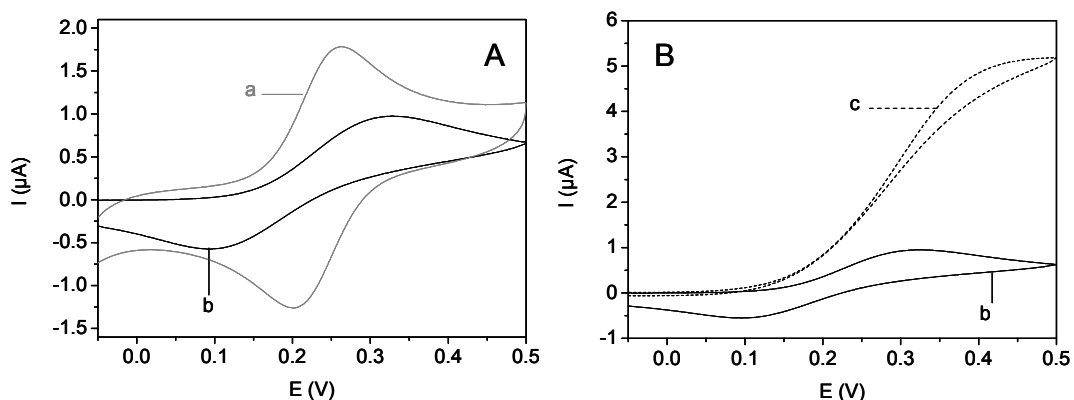


Figure n°3.24 : Courbes de VC ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) du $\text{FcMeOH } 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ enregistrées dans le tampon phosphate à $\text{pH}=8$, de force ionique $0,1 \text{ M}$ avec différentes électrodes Au/MPS (a), Au/MPS/CHI^+ (b) et $\text{Au/MPS/CHI}^+/\text{Gox}$ (c), en l'absence (A) et en présence (B) de glucose

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que l'électrochimie du FcMeOH n'était pas perturbée par la présence de la monocouche de MPS. Lors de l'ajout d'une couche de chitosane, on peut remarquer, d'après la courbe b de la figure 3.24A, que le transfert électronique est ralenti, car la différence de potentiel entre les pics anodique et cathodique augmente. Ceci est dû au fait que le FcMeOH, hydrophobe, diffuse plus lentement à travers la couche de chitosane, très hydrophile, ce qui diminue les interactions entre ces deux espèces. Lorsque l'on adsorbe une couche de Gox (courbe c de la figure 3.24B), en présence de glucose, on observe l'apparition d'un courant catalytique, traduisant la réaction enzymatique, via la médiation redox et indiquant le bon fonctionnement de ce biocapteur, ce qui est en accord avec les résultats rapportés dans la littérature¹⁴. Ce courant catalytique est relié à la quantité d'enzyme immobilisée. A ce propos, Bourdillon et al³⁸ ont développé un modèle cinétique, sur les bases de données déjà existantes, pour obtenir ces informations. Dans ce modèle, il faut calculer les coefficients de diffusion du médiateur redox (ici le FcMeOH) sous sa forme oxydée et sous sa forme réduite selon la relation (17).

$$ip = (2.69.10^5)n^{1/2}AD^{1/2}v^{1/2}C \text{ (à } T=25^\circ\text{C)} \quad (17)$$

Où i_p est le courant faradique anodique (ou cathodique), n , le nombre d'électrons échangés dans la réaction électrochimique d'oxydation (ou de réduction respectivement) du médiateur redox, A , la surface de l'électrode, C , la concentration du médiateur redox en solution, D , le coefficient de l'espèce redox étudiée et v , la vitesse de balayage.

Cette relation nous indique que le courant faradique anodique que l'on mesure, en l'absence du substrat de l'enzyme, est proportionnel à la racine carrée de la vitesse de balayage. Nous avons donc réalisé une étude en fonction de la vitesse de balayage. La figure 3.25 présente les voltampérogrammes obtenus pour différentes vitesses de balayage du ferrocène méthanol en solution.

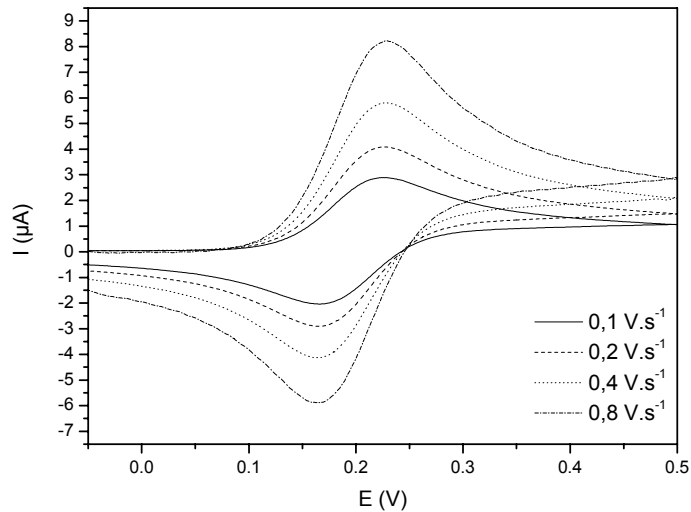


Figure n°3.25 : Courbes de VC, à différentes vitesses de balayage, du FcMeOH à 2.10^{-4} M en tampon phosphate de force ionique 0,1 M et pH=8, obtenues sur une électrode de carbone vitreux modifié par une couche de gélatine évitant l'adsorption du FcMeOH sur la surface de l'électrode²⁸

En traçant l'évolution du courant anodique (et cathodique) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, nous avons obtenu une droite, comme le montre la figure 3.26 présentant ces évolutions.

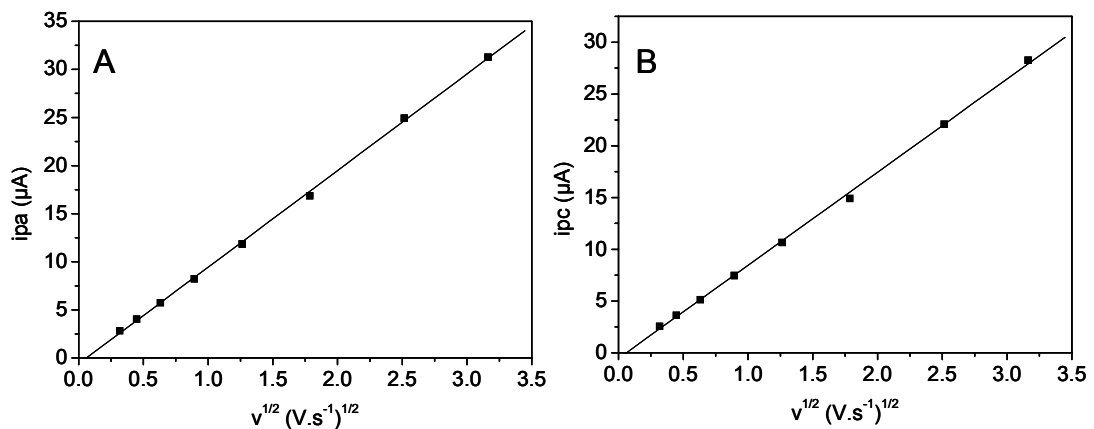


Figure n°3.26 : Evolution des courants faradiques anodique (A) et cathodique (B) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, mesurés à partir des courbes de VC présentées en figure 3.25

Les pentes des droites obtenues, d'après les figures 3.26A et 3.26B, nous ont permis de calculer par la relation (17), les coefficients de diffusion en solution du ferrocène méthanol, D_{Fc} , et du ferricinium méthanol, $D_{Fc,+}$, respectivement. Dans le tampon phosphate pH=8 et de force ionique 0,1 M, $D_{Fc}=D_{Fc,+}=D=6,810^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$. En présence de glucose, la viscosité de la solution augmente et D devient égal à $5,5.10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$.

D'après le schéma réactionnel de la figure 3.22, le FcMeOH diffuse de la solution vers la surface de l'électrode et le ferricinium depuis l'électrode vers la solution, en suivant la deuxième loi de Fick. A $t=0$, les concentrations respectives de ces deux espèces sont $[Fc]_0$ et 0 en solution. En supposant que FAD, FAD-Glucose et FADH₂ sont dans les conditions de l'état stationnaire et en prenant en compte que le glucose est en large excès, Bourdillon et al ont proposé l'équation suivante (18) pour déterminer la quantité surfacique de Gox électrochimiquement active, Γ_{Gox} ³⁸.

$$i_{cat} = \frac{2Fk_3\Gamma_{Gox}[Fc]_0}{1 + \exp\left[-\frac{F}{RT}(E - E^\circ)\right] + k_3[Fc]_0\left(\frac{1}{k_2} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1k_2[Glu \cos e]}\right)} \quad (18)$$

Où i_{cat} est l'intensité de courant mesurée sur le plateau en présence de glucose à laquelle est soustraite l'intensité de courant mesurée sur la courbe obtenue en l'absence de glucose (figure 3.24). Les constantes de vitesses des différentes réactions correspondant aux réactions décrites dans la figure 3.23, ont été prises dans la littérature³⁸. En se plaçant sur le plateau pour mesurer le courant catalytique, $(E-E^\circ)$ devient non négligeable et on peut simplifier l'expression (18). Comme $(E-E^\circ)$ est grand, $\exp\left[-\frac{F}{RT}(E - E^\circ)\right]$ devient petit devant 1. D'après les valeurs des différentes

constantes de vitesse, $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1[Glu \cos e]} \gg \frac{1}{k_2}$. Donc $\frac{k_{-1} + k_2}{k_2k_1[Glu \cos e]} \gg 1$. On peut donc

négliger 1 devant $\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_2k_1[Glu \cos e]}\right)k_3[Fc]_0$. En simplifiant par ces observations, on peut

écrire $i_{cat} = K'\Gamma_{Gox}[Glu \cos e]$, avec K' , une constante connue dépendant de la concentration en ferrocène méthanol et des constantes de vitesses des différentes réactions du cycle catalytique présenté en figure 3.23. Connaissant la concentration en glucose dans la solution et en mesurant i_{cat} , on peut extraire Γ_{Gox} .

Pour différents nombres de bicouches, nous avons tracé les courbes de VC en absence et en présence de glucose, dont les voltampérogrammes sont présentés dans la figure 3.27.

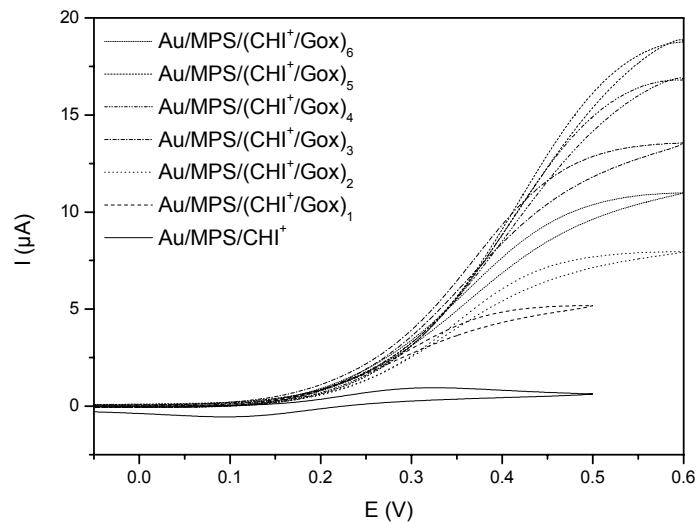


Figure n°3.27 : Courbes de VC ($0,1 \text{ V.s}^{-1}$), en présence de glucose $0,5 \text{ M}$ et de ferrocène méthanol 2.10^{-4} M dans le tampon phosphate de force ionique $0,1 \text{ M}$ et $\text{pH}=8$, pour différents nombres de bicouches, n , de $(\text{CHI}^+/\text{Gox})$, pour n allant de 1 à 6

Pour chacune de ces bicouches, nous avons calculé Γ_{Gox} , et tracé l'évolution de la concentration surfacique en glucose oxydase active en fonction du nombre de bicouches, n , de $(\text{CHI}^+/\text{Gox})$, dont la courbe est montrée par figure 3.28.

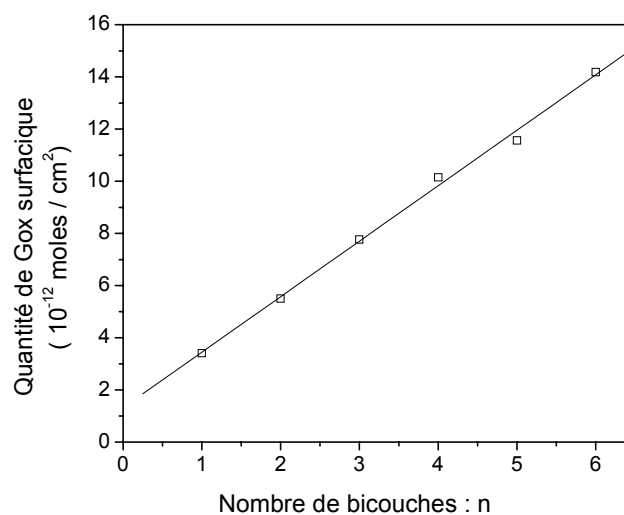


Figure n° 3.28 : Quantité surfacique de Gox électrochimiquement active en fonction du nombre de bicouches, n , de $(\text{CHI}^+/\text{Gox})$, obtenue d'après l'équation (18)

Sur la figure 3.28, on observe une augmentation linéaire de la quantité de Gox active incorporée lors de la construction de l'assemblage. Ceci confirme les résultats obtenus par spectroscopie UV-Visible et par QCM-D. En calculant la pente de la droite obtenue, on peut extraire une quantité, par couche, de Gox électrochimiquement active par unité de surface de $2,13 \cdot 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$.

Nous avons obtenu, par les mesures spectroscopiques, une quantité surfacique totale de Gox de $3,59 \cdot 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$. Cette différence n'est pas surprenante puisque, par électrochimie, on ne peut détecter que la quantité de molécules d'enzyme qui sont électriquement reliées. Le rapport de ces deux valeurs nous informe que l'on a 59 % de Gox électrochimiquement active dans ce type d'assemblage. Cette valeur est plutôt élevée quand on sait que l'enzyme est immobilisée dans un autoassemblage qui diminue l'accessibilité aux sites actifs de l'enzyme. Ceci signifie que le chitosane crée un environnement favorable à l'activité de la glucose oxydase et que le film ainsi construit facilite l'accessibilité aux sites actifs, comme nous l'avons observé avec la PPO dans le deuxième chapitre de ce mémoire.

Ces premiers résultats électrochimiques montrent que l'on peut utiliser le FcMeOH comme médiateur redox d'une électrode enzymatique Au/MPS/(CHI⁺/Gox)_n. Ainsi, on pourrait construire un biocapteur constitué d'un film multicouche de (CHI⁺/Gox)_n d'une bonne sensibilité vis-à-vis du glucose, en optimisant différents paramètres, comme le milieu d'adsorption, la concentration des solutions des espèces autoassemblées, la force ionique, etc. Tous ces paramètres ont une influence sur la structure mais aussi sur les propriétés du matériau construit, comme cela a été souligné dans le premier chapitre de ce mémoire.

3.4 Conclusion chapitre

Nous avons montré qu'une monocouche de thiol adsorbée en surface d'une électrode d'or n'est pas dense mais qu'elle recouvre la quasi-totalité de la surface ($\theta=0,9981$).

Cette monocouche de MPS agit comme une barrière cinétique vis-à-vis de composés redox neutres ou anioniques. Dans le cas du catéchol, le transfert électronique est fortement inhibé alors que les signaux du FcMeOH et Fe(CN)₆³⁻ sont très légèrement perturbés par la couche de MPS. Cependant, nous avons montré que le transfert

électronique de ces espèces a principalement lieu par des effets tunnel à travers la couche et que les défauts de la couche ne participent que très peu à ce transfert.

Les mesures microgravimétriques nous ont montré qu'en plus de la charge négative en surface de la monocouche de MPS, une couche supplémentaire d'eau et d'ions est rigidement associée à la couche de MPS et qu'elle peut aussi avoir une influence sur le transfert électronique ou le transport de charge.

Comme l'analyse cinétique de la monocouche de MPS nous a démontré que cette couche ne perturbait pas le signal électrochimique du ferrocène méthanol, nous avons pu développer un biocapteur à glucose, en immobilisant la glucose oxydase dans un autoassemblage électrostatique avec un chitosane quaternisé, via la médiation redox par le ferrocène méthanol en solution.

Par des mesures électrochimiques et spectroscopiques, nous avons remarqué que la quantité de Gox incorporée à chaque couche est constante lors de la construction de l'assemblage et que le chitosane préserve l'activité de la Gox de 59%. La microgravimétrie nous a permis de suivre la construction de cet assemblage et les résultats obtenus confirment un mode de croissance linéaire de ce film. Ces expériences ont aussi montré que ces assemblages sont hydratés à 95%, ce qui favorise la diffusion du ferrocène méthanol mais aussi l'accessibilité des sites actifs de l'enzyme.

Références chapitre 3

- [1] Terrettaz, S.; Becka, A. M.; Traub, M. J.; Fettinger, J. C.; Miller, C. J. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11216-11224.
- [2] Finklea, H. O.; Snider, D. A.; Fedyk, J.; Sabatani, E.; Gafni, Y.; Rubinstein, I. *Langmuir* **1993**, *9*, 3660-3667.
- [3] Steinberg, S.; Rubinstein, I. *Langmuir* **1992**, *8*, 1183-1187.
- [4] Takehara, K.; Takemura, H.; Aihara, M.; Yoshimura, M. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *404*, 179-182.
- [5] Raj, C. R.; Ohsaka, T. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 679-684.
- [6] Diao, P.; Jiang, D.; Cui, X.; Gu, D.; Tong, R.; Zhong, B. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *464*, 61-67.
- [7] Cannes, C.; Kanoufi, F.; Bard, A. J. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *547*, 83-91.
- [8] Cannes, C.; Kanoufi, F.; Bard, A. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 8134-8141.
- [9] Miller, C.; Cuendet, P.; Graetzel, M. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 877-886.
- [10] Miller, C.; Graetzel, M. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5225-5233.
- [11] Xu, J.; Li, H.; Zhang, Y. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11497-11500.
- [12] Forzani, E. S.; Otero, M.; Perez, M. A.; Teijelo, M. L.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 4020-4029.
- [13] Plunkett, M. A.; Claesson, P. M.; Rutland, M. W. *Langmuir* **2002**, *18*, 1274-1280.
- [14] Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, K.; Bartlett, P. N. *Langmuir* **1997**, *13*, 2708-2716.
- [15] Strong, L.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1988**, *4*, 546-558.
- [16] Perdriel, C. L.; Arvia, A. J.; Ipohorski, M. *J. Electroanal. Chem.* **1986**, *215*, 317-329.
- [17] Vela, M. E.; Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J. *Electrochimica Acta* **1990**, *35*, 117-125.
- [18] Goss, C. A.; Charych, D. H.; Majda, M. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 85-88.
- [19] Dalmia, A.; Liu, C. C.; Savinell, R. F. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *430*, 205-214.
- [20] Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559-3568.

- [21] Walczak, M. M.; Alves, C. A.; Lamp, B. D.; Porter, M. D. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *396*, 103-114.
- [22] Wong, S.-S.; Porter, M. D. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *485*, 135-143.
- [23] Calvente, J. J.; Kovacova, Z.; Sanchez, M. D.; Andreu, R.; Fawcett, W. R. *Langmuir* **1996**, *12*, 5696-5703.
- [24] Turyan, I.; Mandler, D. *Isr. J. Chem.* **1997**, *37*, 225-233.
- [25] Amatore, C.; Saveant, J. M.; Tessier, D. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *147*, 39-51.
- [26] Chambers, J. Q. *Chem. Quinonoid Compd.* **1974**, *Pt. 2*, 737-791.
- [27] Laviron, E. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *164*, 213-227.
- [28] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 1980.
- [29] Marchal, D.; Boireau, W.; Laval, J. M.; Bourdillon, C.; Moiroux, J. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *451*, 139-144.
- [30] Weibel, M. K.; Bright, H. J. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2734-2744.
- [31] Swoboda, B. E. P.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2209-2215.
- [32] Decher, G. *Science (Washington, D. C.)* **1997**, *277*, 1232-1237.
- [33] Sun, J. Q.; Sun, Y. P.; Zou, S.; Zhang, X.; Sun, C. Q.; Wang, Y.; Shen, J. C. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 840-844.
- [34] Szucs, A.; Hitchens, G. D.; Bockris, J. O. *J. Electrochem. Soc.* **1989**, *136*, 3748-3755.
- [35] Richert, L.; Boulmedais, F.; Lavalle, P.; Mutterer, J.; Ferreux, E.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 284-294.
- [36] Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. *Phys. Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
- [37] Caruso, F.; Rodda, E.; Furlong, D. N.; Niikura, K.; Okahata, Y. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2043-2049.
- [38] Bourdillon, C.; Demaille, C.; Gueris, J.; Moiroux, J.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12264-12269.

CHAPITRE 4

Chapitre 4 : Assemblages de polyélectrolytes, de nanoparticules et d'enzymes sur une surface d'or

4.1 Introduction chapitre

Les études présentées dans ce chapitre ont pour objet la caractérisation d'autoassemblages électrostatiques multicouches de polyélectrolytes, de nanoparticules et d'enzymes. Dans l'optique de développer de nouveaux transducteurs, il a été décidé d'utiliser des nanoparticules métalliques, en particulier des nanoparticules d'or pour leurs propriétés de conduction électronique. Ces nanoparticules ont été assemblées tout d'abord avec un polyélectrolyte non redox. Puis, pour nous permettre de suivre, par électrochimie, la construction de ces assemblages, différents polyélectrolytes contenant un groupement redox ont été synthétisés. Ce type de polyélectrolyte présente aussi l'intérêt de pouvoir analyser voire améliorer le transfert électronique au sein d'un assemblage. Les groupes redox qui ont été les principaux groupements utilisés et étudiés dans divers travaux¹⁻¹⁹, sont le viologène, le ferrocène et un complexe bipyridinique d'osmium. Les polyélectrolytes redox ont été synthétisés par greffage ou par polycondensation de ces groupes. La construction des assemblages de ces polyélectrolytes a été suivie par microgravimétrie et par spectroscopie UV-Visible. Ces assemblages ont également été caractérisés par électrochimie pour obtenir des informations sur la conductivité électronique de tels films.

Puis, dans un deuxième temps, des bioélectrodes enzymatiques, contenant une sous-couche conductrice électronique basée sur un assemblage LbL de polyélectrolytes et de nanoparticules, ont été réalisées pour présenter l'avantage de cette sous-couche composée de nanoparticules.

4.2 Caractérisation d'assemblage de polyélectrolytes non redox et de nanoparticules d'or

Dans ce travail, nous avons utilisé des dispersions colloïdales de nanoparticules d'or commercialisées par Sigma-Aldrich. Ces dispersions colloïdales sont obtenues par réduction chimique d'un sel d'or (HAuCl_4) par le trisodium citrate en présence d'acide tannique²⁰. La réduction par l'acide tannique est un processus rapide tandis que celle par

le citrate est beaucoup plus lente. La taille finale des nanoparticules est déterminée par le nombre de germes de cristallisation et donc par la concentration initiale d'acide tannique présente dans le milieu réactionnel. Les particules colloïdales d'or sont stabilisées par adsorption de citrate à leur surface et sont donc chargées négativement. Des colloïdes contenant des nanoparticules de diamètre 5 nm (NP₅) et 10 nm (NP₁₀) ont été tout d'abord caractérisés par microscopie électronique en transmission.

La figure 4.1 présente les clichés de microscopie électronique en transmission obtenus au moyen de grilles sur lesquelles une goutte du colloïde d'or a été évaporée après une dilution adéquate.

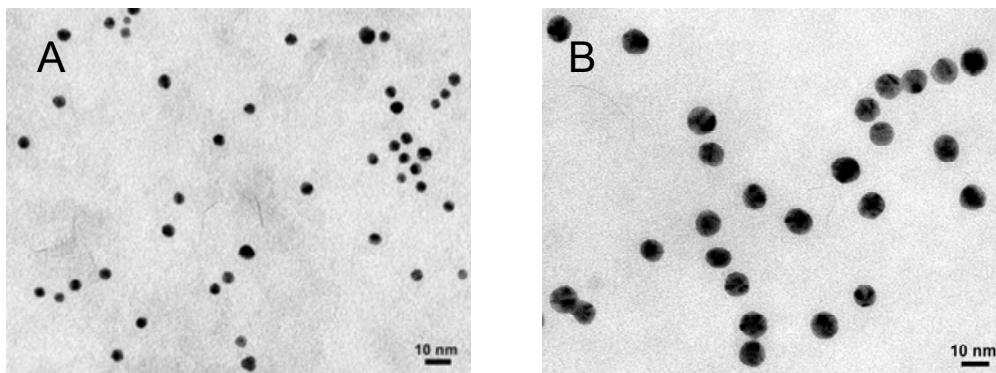


Figure n°4.1 : Microscopie électronique en transmission des nanoparticules d'or de diamètre 5 nm (cliché A) et de diamètre 10 nm (cliché B)

Grâce à un traitement d'images, le diamètre de 800 nanoparticules a été mesuré permettant ainsi d'obtenir la répartition en taille et le diamètre moyen des nanoparticules (figure 4.2).

On constate la présence de colloïdes homodisperses avec une seule population de nanoparticules sphériques dont les diamètres moyens sont respectivement de 4,3 et de 9,5 nm alors que les spécifications du fournisseur indiquent des diamètres de 6,4 et 11 nm pour les colloïdes dits de 5 et 10 nm de diamètre. Nous n'avons pas d'explications à ces différences.

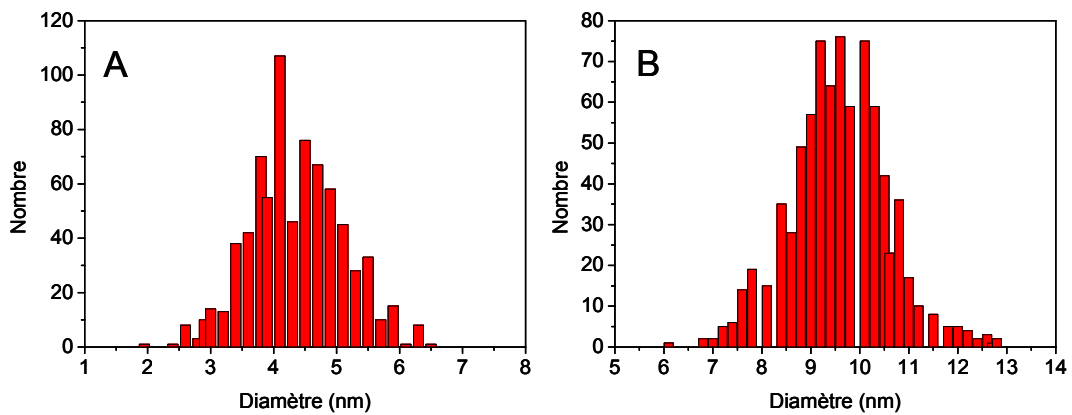


Figure n°4.2 : Répartition statistique de la taille des nanoparticules d'or de diamètre 5 nm (A) et 10 nm (B) colloïdales obtenue par traitement d'image des clichés de la figure 4.1

Selon les spécifications du fournisseur, ces colloïdes présentent une concentration de $6,57 \cdot 10^{12}$ nanoparticules.mL⁻¹ et de $4,66 \cdot 10^{12}$ nanoparticules.mL⁻¹ pour les NP₅ et NP₁₀ respectivement.

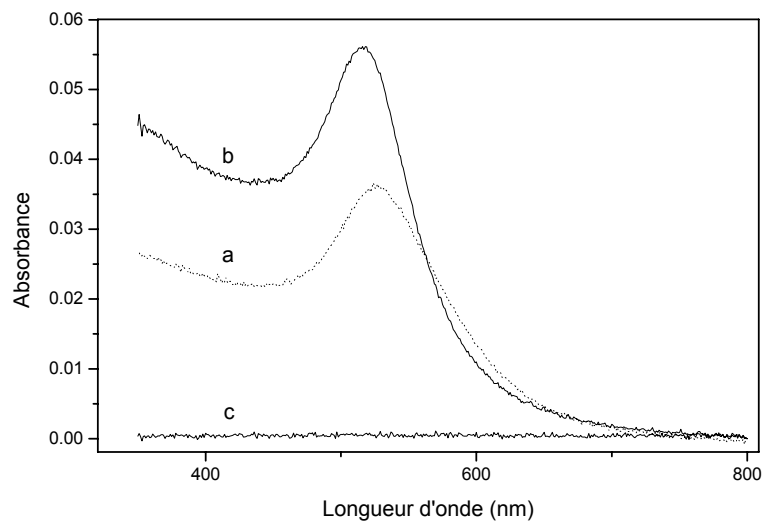


Figure n°4.3 : Spectres d'absorption des solutions colloïdales de NP₅ (courbe a) et NP₁₀ (courbe b) et du quartz après avoir été en contact avec ces solutions colloïdales (courbe c), dans le tampon phosphate 0,1 M, à pH=7,5 pour un trajet optique de 0,1 cm

Les spectres d'absorption des solutions colloïdales de NP₅ et NP₁₀ présentent une bande caractéristique à 524 et 519 nm respectivement. Ces longueurs d'onde correspondent à la résonance plasmonique de surface²¹ des nanoparticules.

On notera, d'après la figure 4.3 (courbe c), que les nanoparticules ne s'adsorbent pas à la surface de quartz de la cuve, préalablement traitée pour obtenir des charges négatives en surface (voir partie expérimentale). En effet, le spectre obtenu après la mise en contact des parois de la cuve avec les solutions colloïdales de NP₅ et NP₁₀ (courbe c), présente une absorbance nulle dans le domaine spectral balayé (entre 800 et 300 nm).

Ces colloïdes ont été utilisés comme solution d'immersion pour l'adsorption de ces nanoparticules. Ceci nous a permis de construire des assemblages de NP₁₀ et de polydiallyldiméthylammonium, PDDA⁺, polyélectrolyte commercial, possédant une densité de charge élevée.

4.2.1. Caractérisation structurale des assemblages de polydiallyldiméthylammonium et de nanoparticules d'or de 10 nm

4.2.1.1 Etude spectroscopique

Une étude préliminaire par spectroscopie UV-Visible a été effectuée pour déterminer la cinétique d'adsorption des NP₁₀ sur une monocouche de PDDA⁺. Il a été remarqué qu'un temps de 120 minutes était nécessaire pour adsorber une quantité maximale de NP₁₀. Puis, nous avons suivi la construction d'un assemblage (PDDA⁺/NP₁₀)_n par spectroscopie UV-Visible, dont les spectres d'absorption sont présentés en figure 4.4, pour différents nombres de bicouches, n.

On remarque que, dès la première couche de NP₁₀, on voit apparaître une bande d'absorption à 527 nm, correspondant à la bande d'absorption de résonance plasmonique de surface des NP₁₀²¹. Le déplacement bathochrome de cette bande entre la solution colloïdale (courbe b de la figure 4.3) et les NP₁₀ assemblées, a été attribué à un changement de l'environnement diélectrique des nanoparticules lors de l'assemblage²¹.

Sur le spectre correspondant à la première bicouche (PDDA⁺/NP₁₀), on remarque un épaulement à 586 nm. Puis, au fur et à mesure de la construction de l'assemblage, cette bande augmente en intensité, traduisant l'agrégation des NP₁₀²² lors de l'ajout de couches supplémentaires. Cet effet s'explique par la grande densité de charge du PDDA⁺, ce qui favorise l'agrégation des NP₁₀.

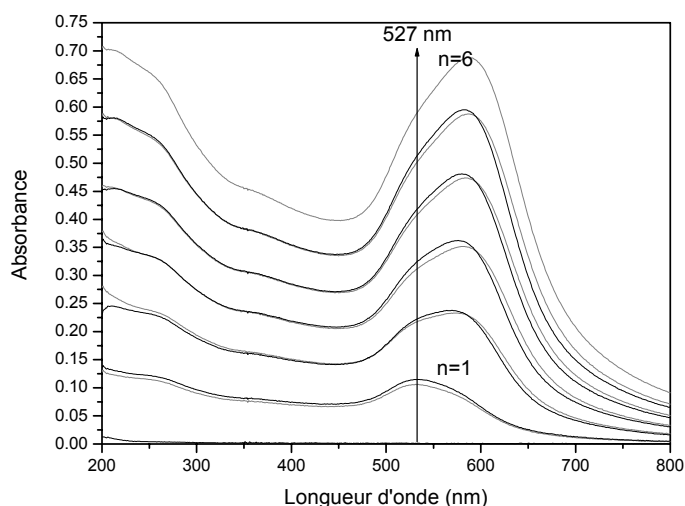


Figure n°4.4 :

Spectres d'absorption d'un assemblage $(PDDA^+/NP_{10})_n$ construit sur les parois d'une cuve de quartz (préalablement traitées de façon à leur conférer une charge négative en surface) par l'adsorption de $PDDA^+$ (trait noir) à partir d'une solution à 2 mg.mL^{-1} dans le tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ à $\text{pH}=6,5$ et par l'adsorption de NP_{10} (trait gris) à partir de la solution colloïdale de NP_{10} , enregistrés dans du tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ à $\text{pH}=6,5$

Nous avons mesuré l'absorbance à cette longueur d'onde et construit la figure 4.5 qui présente la variation de A_{527} en fonction du nombre de bicouches, n , de $(PDDA^+/NP_{10})_n$.

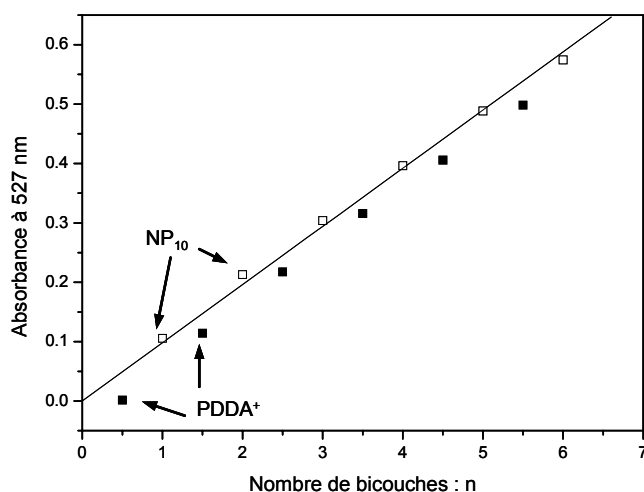


Figure n°4.5 :

Evolution de l'absorbance à 527 nm mesurée sur les spectres de la figure 4.4 en fonction du nombre de couches. Pour n demi-entier (\blacksquare), la dernière couche est faite de $PDDA^+$ et si n est entier (\square), les NP_{10} constituent la couche externe

D'après la figure 4.5, on note une variation linéaire de A_{527} avec le nombre de couches, indiquant la reproductibilité des étapes d'adsorption des deux espèces autoassemblées. La pente de la droite obtenue est de 0,098 d'absorbance à 527 nm par bicouche de (PDDA⁺/NP₁₀).

Pour avoir une ordre d'idée de la quantité de NP₁₀, nous avons supposé que le coefficient d'extinction molaire de la bande d'absorption à 527 nm est le même pour les NP₁₀ agrégées dans l'assemblage multicouche que pour les NP₁₀ non agrégées en solution colloïdale. Nous avons pu déterminer la concentration surfacique de NP₁₀, Γ_{NP10} , incorporées dans le film à chaque étape d'adsorption, selon la relation (1).

$$\Gamma_{(UV)} = \frac{A}{2\varepsilon} \text{ (pour une paroi de cuve)} \quad (1)$$

Γ_{NP10} est de $2,5 \cdot 10^{11}$ particules.cm⁻², ce qui correspond à un recouvrement surfacique de 20% environ.

Bien que la concentration surfacique de NP₁₀ varie linéairement avec le nombre de couches, ce n'est pas une preuve suffisante pour affirmer que le mode de croissance de l'assemblage (PDDA⁺/NP₁₀)_n est linéaire. En effet, il a été montré que l'on peut avoir une expansion latérale d'un assemblage de PE/NP, même si les mesures spectroscopiques montrent une augmentation linéaire de l'absorbance avec le nombre de couches déposées^{23,24}.

Des mesures microgravimétriques, qui permettent de mesurer la masse surfacique des couches adsorbées, peuvent apporter des éléments supplémentaires pour connaître le mode de croissance de ce type d'assemblage.

4.2.1.2 Etude microgravimétrique

La croissance d'autoassemblages (PDDA⁺/NP₁₀)_n a aussi été caractérisée par QCM-D. Nous avons suivi l'évolution des fréquences, $\Delta F_x/x$, et des dissipations d'énergie correspondantes, ΔD_x , pour x=3, 5 et 7, représentée par la figure 4.6, pour l'adsorption d'une bicouche de (PDDA⁺/NP₁₀) sur une surface Au/MPS. Les mesures ont été effectuées sous un flux de 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

On remarque que l'adsorption du PDDA⁺ est relativement rapide et conduit à une variation de $\Delta F_x/x$ relativement faible et une augmentation du facteur de dissipation, ΔD_x , d'une unité 10⁻⁶. Entre la solution de tampon phosphate 0,1 M de pH=6,5 (TP) et celle de la solution colloïdale de NP₁₀, la viscosité est différente et cela induit un

changement de $\Delta F_x/x$ et de ΔD_x . Au début de l'adsorption des NP_{10} , il est possible d'observer une augmentation de $\Delta F_x/x$, qui est due à ce changement de viscosité, puisque l'adsorption des NP_{10} est lente. Mais cette augmentation de la fréquence peut aussi correspondre à l'expulsion de molécules d'eau contenue dans le film lors de l'adsorption des NP_{10} , qui vont compresser le film.

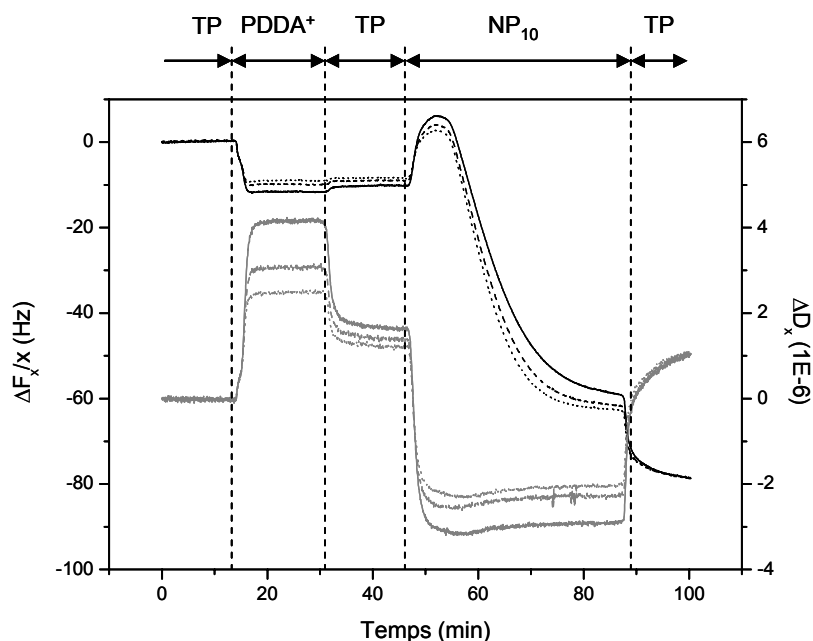


Figure n°4.6 : Evolution de $\Delta F_x/x$ (en noir) (échelle de gauche) et de ΔD_x (en gris) (échelle de droite) pour $x=3, 5$ et 7 , en fonction du temps pour la construction de $(PDDA^+/NP_{10})_1$, sur un quartz recouvert d'or modifié par une couche de MPS, enregistrées avec un flux de $50 \mu L \cdot min^{-1}$, pour une solution de $PDDA^+$ de $2 mg \cdot mL^{-1}$ dans la tampon phosphate $0,1M$ de $pH=6,5$ et pour la solution colloïdale de NP_{10}

La figure 4.7 présente la variation de $\Delta F_x/x$ (graphe A) et de ΔD_x (graphe B) en fonction du nombre de bicouches de $(PDDA^+/NP_{10})$, n . Les sauts de fréquence et de dissipation ont été mesurés avant et après adsorption de chaque couche, sur le palier correspondant au tampon.

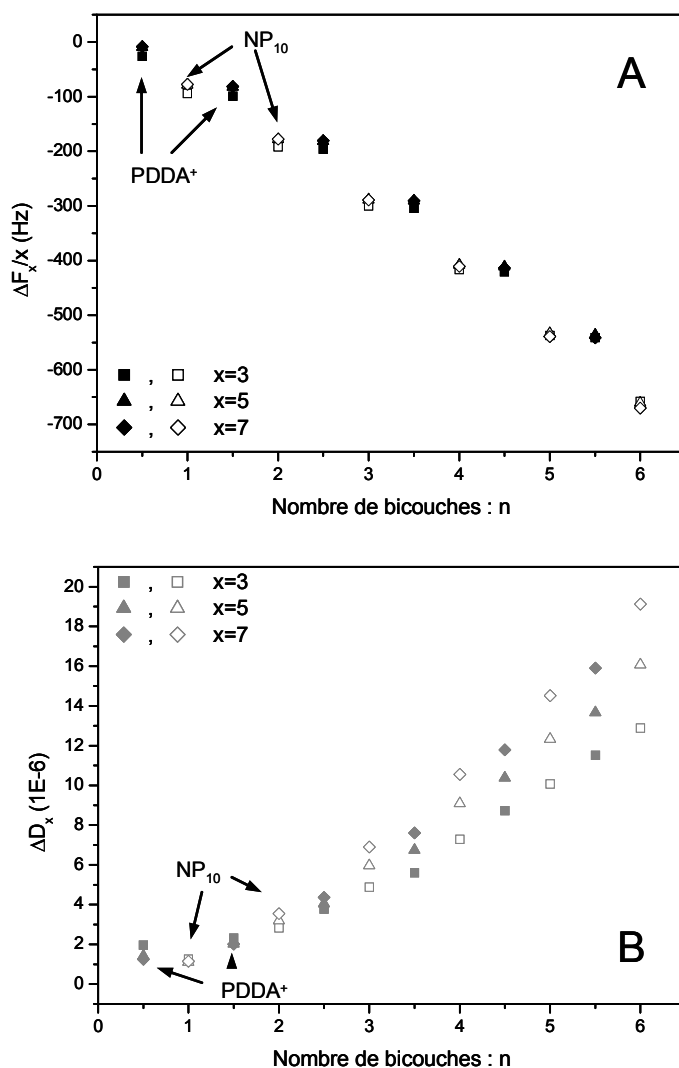


Figure n°4.7 : Evolution de $\Delta F_x/x$ (A) et de ΔD_x , mesurés sur le palier du tampon phosphate 0,1 M de pH=6,5, en fonction du nombre de bicouches, n, d'un autoassemblage $(PDDA^+/NP_{10})_n$. Pour n demi-entier (symbole fermé), la dernière couche est faite de $PDDA^+$ et si n est entier (symbole ouvert), les NP_{10} constituent la couche externe.

On remarque que, pour $(PDDA^+/NP_{10})_6$, $\Delta F_x/x$ ne dépend pas de l'harmonique étudiée et que les sauts de ΔD_x sont peu élevés. Ceci indique que le film construit est relativement rigide.

Les valeurs de la figure 4.7 ont été modélisées pour obtenir la variation de la masse surfacique, Γ , en fonction du nombre de bicouches, n. Les résultats obtenus, selon le modèle de Sauerbrey (courbe a) et selon le modèle viscoélastique (courbe b), sont représentés sur la figure 4.8.

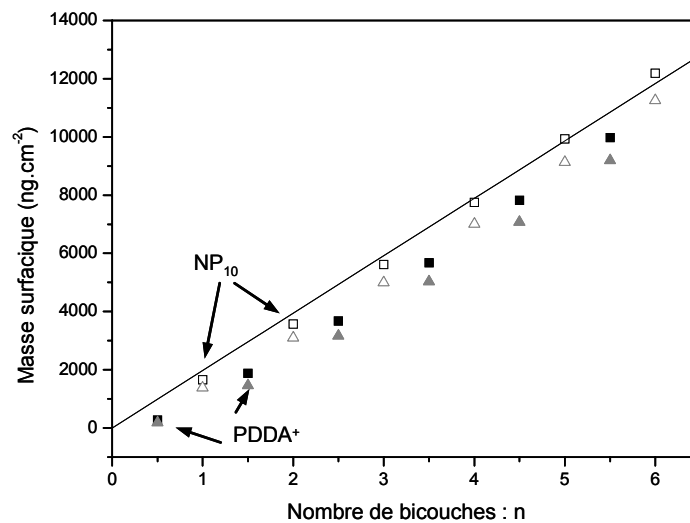


Figure n°4.8 : Evolution de la masse surfacique, Γ , en fonction du nombre de bicouches, n , d'un assemblage $(PDDA^+/NP_{10})_n$, obtenue selon le modèle de Sauerbrey (\square) et selon le modèle viscoélastique (\blacktriangle). Si n est entier (symbole ouvert), la dernière couche contient des NP_{10} , alors que si n est demi-entier (symbole fermé), le $PDDA^+$ est en couche externe.

On remarque que les deux modèles sont en bon accord, ce qui signifie que le film étudié est rigide. De plus, la variation de Γ avec n est linéaire et on remarque que la contribution à l'augmentation de la masse est principalement due à l'adsorption des NP_{10} . Nous avons déterminé une quantité moyenne de NP_{10} incorporées à chaque couche de 2190 ng.cm^{-2} . Cette quantité correspond non seulement aux NP_{10} intégrées dans le film mais aussi à la quantité d'eau et d'ions incorporés durant l'assemblage.

Connaissant la densité de l'or ($19,31$) et le volume d'une nanoparticule, nous pouvons calculer la masse d'une nanoparticule d'or NP_{10} , qui est de $2,76.10^{-18} \text{ g}$. Par les mesures spectroscopiques, nous avons obtenu une quantité surfacique de $2,5.10^{11} \text{ particules.cm}^{-2}$. Cette quantité correspond donc à une masse de 690 ng.cm^{-2} . La quantité d'ions et d'eau contenues dans un tel assemblage est de $68,5\%$ $((1-690/2190) \times 100)$.

De plus, on peut dire que le type de croissance d'un tel assemblage est linéaire. Nous avons fait la même remarque pour un film multicouche de chitosane et de PPO dans le chapitre 2 de ce mémoire. Or ce type de film enzymatique est viscoélastique et contient 74% d'eau.

Le résultat que nous obtenons pour un film $(PDDA^+/NP_{10})_n$ est étonnant car la quantité d'eau incorporée est du même ordre de grandeur que les films enzymatiques que nous

avons caractérisé. Dans ce cas, on peut penser à une stratification partielle de l'assemblage où l'eau et les ions sont associés de manière rigide à l'assemblage de NP, contrairement à un film constitué de chitosane et d'enzymes.

La différence de comportement peut s'expliquer par la nature du polyélectrolyte utilisé, dont la densité de charge influence la structure de l'assemblage. En effet, le chitosane, étant très hydrophile et ayant une faible densité de charge, aura tendance à former plus de boucles, que le PDDA⁺, qui a une densité de charge plus importante, comme l'ont montré plusieurs travaux de la littérature²³. Ceci se traduit par une masse surfacique de la couche de CHI⁺ (environ 6000 ng.cm⁻²) plus élevée que celle du PDDA⁺ (environ 100 ng.cm⁻²).

4.2.1.3 Propriétés électrochimiques

Nous avons vu, dans le chapitre 3 de ce mémoire, qu'une monocouche de MPS, autoassemblée à la surface d'une électrode d'or, bloque le transfert électronique du processus électrochimique du système catéchol/orthoquinone (courbe Au/MPS de la figure 4.9A).

Afin d'évaluer les propriétés de conduction électronique de l'assemblage multicouche (PDDA⁺/NP₁₀)_n, nous avons étudié l'évolution de la réponse électrochimique du catéchol sur des surfaces Au/MPS/(PDDA⁺/NP₁₀)_n.

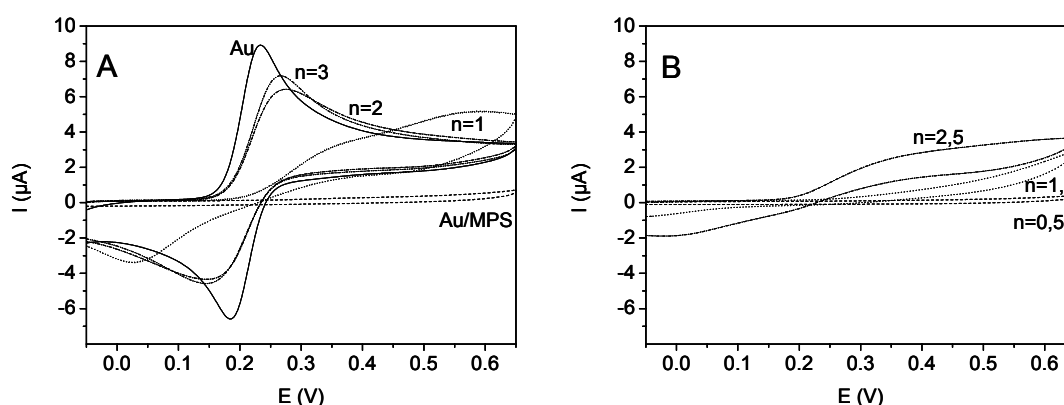


Figure n°4.9 : Courbes de VC (0,1 V.s⁻¹) obtenues sur des électrodes Au, Au/MPS, Au/MPS/(PDDA⁺/NP₁₀)_n, pour n=1, 2 et 3 (A) et pour n=0,5, 1,5 et 2,5 (B), dans une solution électrolytique de tampon phosphate 0,1 M de pH=6,5, en présence de catéchol 4.10⁻⁴ M

Des mesures par voltampérométrie cyclique ont été réalisées pour différents nombres de couches n (0,5 à 6). Les voltampérogrammes obtenus lors de ces expériences sont représentés sur la figure 4.9.

On remarque que l'ajout d'une couche de PDDA⁺ sur une surface d'électrode d'or modifiée par une monocouche de MPS (courbe $n=0,5$ de la figure 4.9B), ne modifie pas le transfert électronique du processus électrochimique d'oxydation du catéchol par rapport à celui enregistré sur Au/MPS (voir chapitre 3). Cependant, l'ajout d'une couche de NP₁₀ restitue un signal d'oxydation du catéchol (courbe $n=1$ de la figure 4.9A).

Pour $n=1$, la courbe de VC du catéchol est caractéristique d'un système lent avec un ΔE_p de 185 mV. Ces valeurs de ΔE_p diminuent avec le nombre de couches de NP₁₀, comme le montre le tableau 4.1.

Tableau n°4.1 : Valeurs de la différence de potentiel ΔE_p de pics des réponses obtenues par VC du catéchol $4 \cdot 10^{-4}$ M en solution dans le tampon phosphate 0,1 M à pH=6,5, pour différentes électrodes modifiées

| Couche | ΔE_p (mV) |
|--|----------------------|
| Au | 49 |
| Au/MPS/(PDDA ⁺ /NP ₁₀) ₁ | 185 |
| Au/MPS/(PDDA ⁺ /NP ₁₀) ₂ | 155 |
| Au/MPS/(PDDA ⁺ /NP ₁₀) ₄ | 60 |
| Au/MPS/(PDDA ⁺ /NP ₁₀) ₆ | 49 |

On remarque, d'après ce tableau, que 6 bicouches de (PDDA⁺/NP₁₀) sont nécessaires pour obtenir un signal identique à celui obtenu sur une électrode d'or nu. On peut en déduire que cet assemblage est conducteur électronique, car il améliore l'étape de transduction du processus électrochimique catéchol/orthoquinone.

Ce résultat montre qu'il y a une communication électronique entre les NP₁₀ et que cette communication est améliorée par le nombre de couches de NP₁₀, jusqu'à 6 bicouches.

4.3 Caractérisation d'assemblage de polyélectrolytes redox et de nanoparticules d'or

Deux types de groupes redox ont été étudiés : le groupe viologène (4,4'-bipyridium), dont la réaction redox correspondante se situe dans le domaine des potentiels négatifs, et un groupement constitué d'un complexe bipyridinique d'osmium, possédant un couple redox dont le potentiel standard est positif.

4.3.1 Polyélectrolyte comportant un groupe viologène

Le groupement viologène a été étudié dans divers assemblages et en particulier, au laboratoire, pour ses propriétés de médiation redox vis-à-vis de la nitrate réductase²⁵. Suite à cette étude au sein du laboratoire, nous avons voulu vérifier si ce type de groupes redox pouvait interagir avec des nanoparticules d'or.

Nous avons synthétisé deux types de polymères contenant un groupe viologène, comme le montre la figure 4.10. Le premier de ces polymères (PV₁) a été obtenu par le greffage d'un groupement alkylviologène sur une chaîne de polyvinylpyridine alors que le second (PV₂) est constitué d'un enchaînement de *p*-xylylviologène.

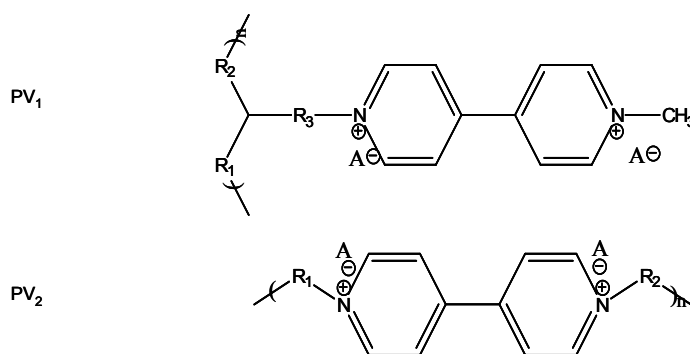


Figure n°4.10 : Deux types différents d'espèces où le viologène se trouve dans la chaîne polymère d'un polyélectrolyte

Ces polyélectrolytes seront nommés polyviologènes : ceux dont le groupe viologène est une partie du groupe de répétition (PV₂ de la figure 4.10) de la chaîne polymères et ceux où le groupement viologène est greffé sur une chaîne polymère (PV₁ de la figure 4.10). Le polyviologène PV₁ a été synthétisé pour assembler et connecter la nitrate réductase²⁵. Mais nous avons voulu connaître l'influence de la structure du polyélectrolyte redox

utilisé sur les propriétés de films autossemblés de polyviologène et d'un polyanion. Pour cela, le polyviologène PV₂ a été aussi synthétisé. Nous avons caractérisé les polymères obtenus, et en particulier par électrochimie dans un assemblage électrostatique avec un polyanion.

4.3.1.1 Synthèse et caractérisation

4.3.1.1.1 Polyviologène greffé : PV₁

Ce polymère a été synthétisé via quatre étapes, décrites par le schéma 4.1.

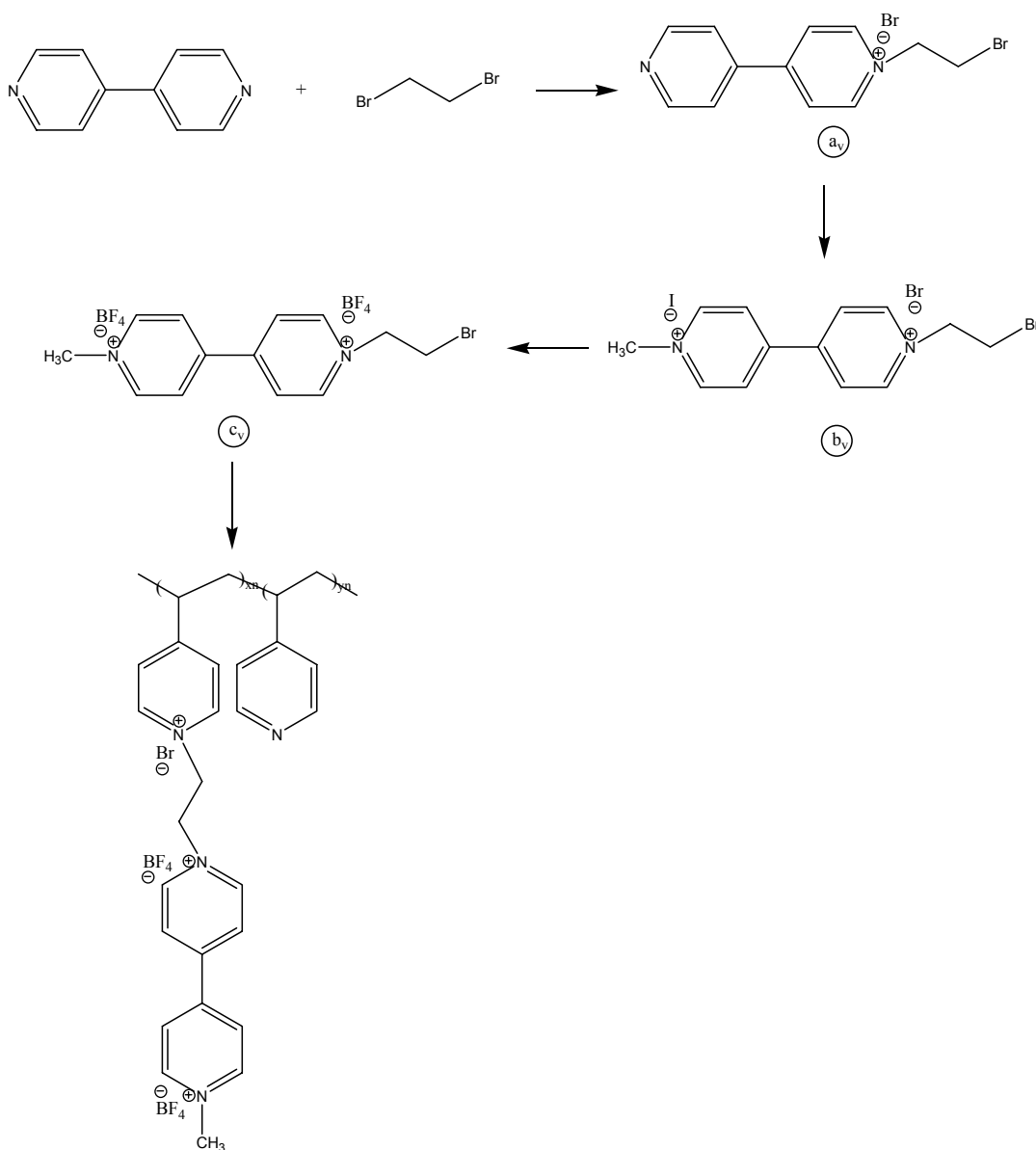


Schéma n°4.1 :

Schéma réactionnel du greffage du groupement viologène sur la chaîne polymère d'une polyvinylpyridine (PVP)

La dernière étape est le greffage du groupe alkylviologène sur la chaîne polymère d'un polyvinylpyridine (PVP) par quaternisation de l'azote des groupes pyridines (voir la partie expérimentale pour les détails du mode opératoire).

Selon les résultats obtenus dans un travail préalable²⁵ où il a été noté que les procédures de synthèse influencent le degré de substitution en viologène, il est difficile d'établir une relation entre le degré de substitution et le comportement électrochimique de ces polyviologènes. Le taux de substitution du PVP par les groupements alkylviologènes a été déterminé par RMN ¹H, dont le spectre est représenté sur la figure 4.11, selon le mode de calcul décrit dans ces travaux²⁵.

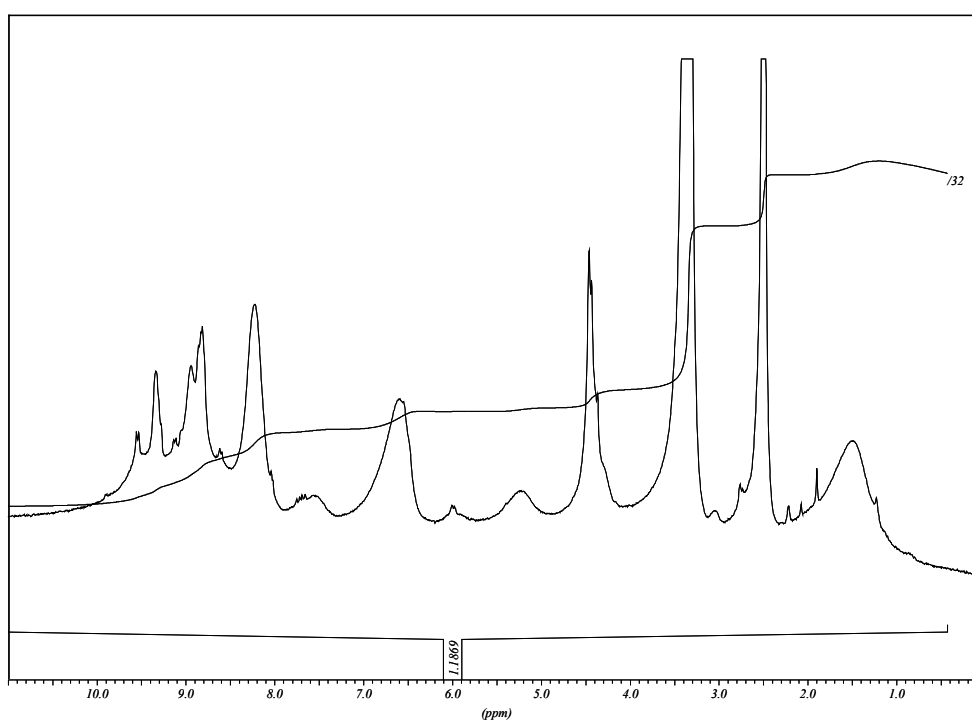


Figure n°4.11 : Spectre de résonance magnétique nucléaire du proton de PV₁, dans le diméthylsulfoxyde deutéré

D'après la figure 4.11, le pic d'intensité relative 2, à 6,6 ppm, correspond au nombre de protons des pyridines non substituées. Le massif de pics de 10 protons, centré sur 9 ppm, correspond au nombre de protons du groupement viologène. Soit x , le nombre d'unités pyridines non substituées et $(n-x)$ le nombre de pyridines substituées par les groupements viologènes. De plus, A_1 et A_2 sont les aires des pics correspondantes aux pyridines non substituées et aux pyridines substituées respectivement. On a $2x=kA_1$ et

$10(n-x)=kA_2$, avec k , une constante de proportionnalité. On peut donc déterminer le taux de substitution :

$$1 - \frac{x}{n} = \frac{1}{5 \frac{A_1}{A_2} + 1} \quad (2)$$

Cette relation (2) nous a permis de calculer un taux de substitution en groupes viologènes du polyviologène synthétisé de 30%.

Le PV_1 a été assemblé avec du polystyrène sulfonate (PSS^-) sur une électrode d'or modifiée par une monocouche de MPS. La construction de cet assemblage a été suivie par voltampérométrie cyclique. La figure 4.12 présente les voltampérogrammes obtenus pour différentes couches de (PV_1/PSS^-) .

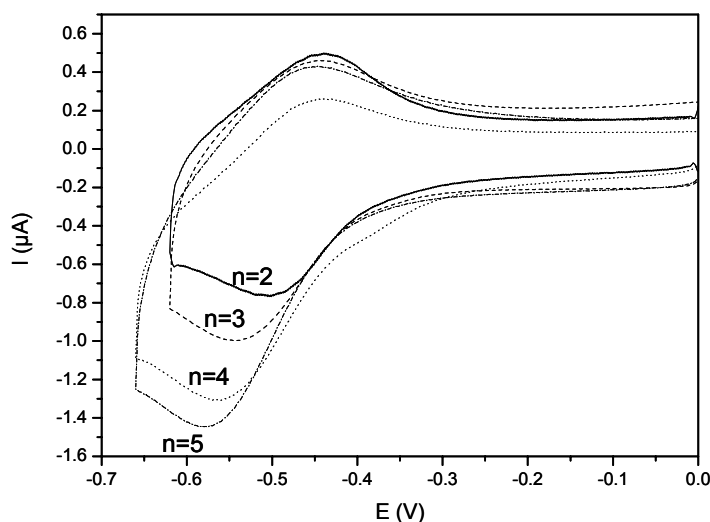
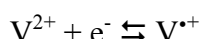


Figure n°4.12 : Voltampérogrammes cycliques ($0,1 \text{ V.s}^{-1}$) enregistrés dans du tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ de $\text{pH}=6,5$, pour différents nombres de bicouches, n , de $(PV_1/PSS^-)_n$ assemblées sur une électrode Au/MPS

Les voltampérogrammes de la figure 4.12 sont caractéristiques de la réduction monoélectronique réversible du groupement viologène (V^{2+}) en radical cation ($V^{\bullet+}$):



On remarque que le courant de pic augmente avec le nombre de couches. Ceci indique qu'il y a conduction redox entre les sites redox des différentes couches malgré la présence du polystyrène sulfonate qui augmente la distance entre les groupements redox

d'une couche à l'autre. On note toutefois un ralentissement du processus de transfert électronique qui se traduit par une légère augmentation de la différence des potentiels de pic anodique et cathodique, ΔE_p , avec le nombre de couches.

Pour chacune de ces couches, nous avons fait varier la vitesse de balayage de façon à étudier la cinétique du système redox. Le tracé du courant de pic cathodique en fonction de la vitesse de balayage donne une droite. Ceci nous indique que l'assemblage réalisé a un comportement en couche mince. Il est donc possible d'appliquer la relation suivante :

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A^2}{4RT} \Gamma_R \nu \quad (3)$$

Où i_p est le courant faradique (cathodique ou anodique), n , le nombre d'électrons échangés lors du processus électrochimique, A , la surface de l'électrode, Γ_R , la concentration surfacique en groupements redox actifs et ν , la vitesse de balayage.

La relation (3) nous permet de calculer la concentration surfacique de sites redox viologènes actifs, $\Gamma_{V_{2+}}$, dans le film pour chaque couche.

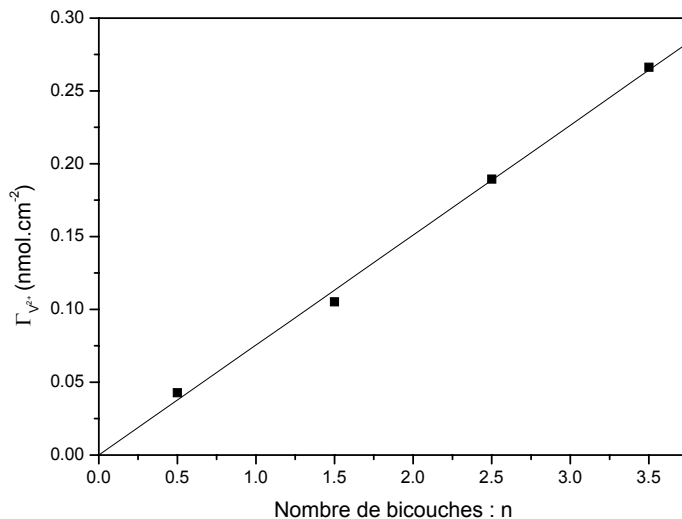


Figure n°4.13 : Evolution de la concentration surfacique, $\Gamma_{V_{2+}}$, en groupes viologènes, en fonction du nombre de couches, n , d'un assemblage $(PV_1/PSS)_n$, déterminée par la relation (3)

On note, d'après la figure 4.13 qui correspond à l'évolution de $\Gamma_{V_{2+}}$ en fonction du nombre de bicouches (PV_1/PSS^-) , n , une augmentation linéaire de la concentration en sites viologènes électriquement reliés avec le nombre de couches adsorbées. A chaque

adsorption de PV₁, une quantité de $7,55 \cdot 10^{-11}$ mol.cm⁻² de viologène est immobilisé. Or, nous avons obtenu un taux de substitution de 30% par les mesures de RMN ¹H, on a donc $\Gamma_{PV1} = 2,52 \cdot 10^{-10}$ mol.cm⁻² ($=\Gamma_{V2+}/30\%$), qui représente le nombre de moles par unité de surface de tous les groupements pyridines dans la chaîne polymère, qu'ils contiennent le groupe viologène ou non.

4.3.1.1.2 Polyviologène linéaire : PV₂

Le mode opératoire (détaillé dans la partie expérimentale) suit celui décrit par Factor et al²⁶.

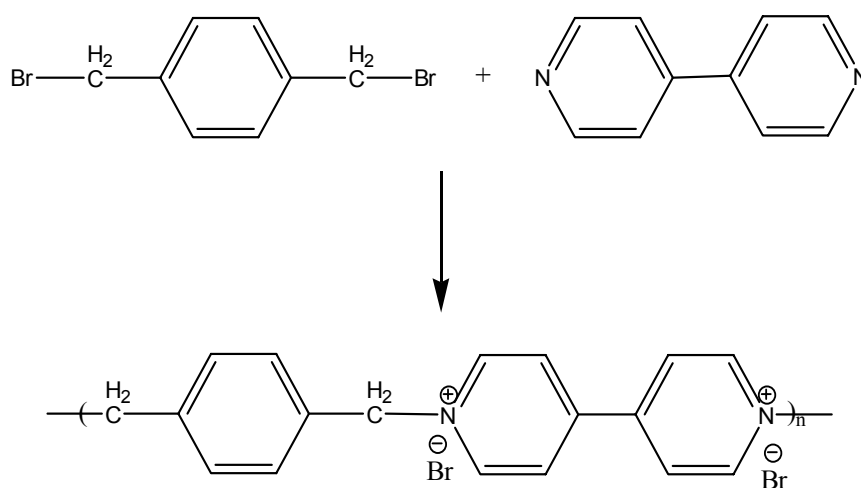


Schéma n°4.2 : Schéma réactionnel de la synthèse du polyviologène linéaire PV₂

Le schéma 4.2 nous montre la voie de synthèse d'un polyviologène linéaire, où le groupe de répétition contient le groupe redox viologène. On peut remarquer qu'il s'agit d'une simple polycondensation.

Après purification, ce polymère a été caractérisé par RMN ¹H, dont le spectre est présenté en figure 4.14.

L'analyse de ce spectre montre que les protons en position α et β de la partie bipyridinium du groupe de répétition du polymère correspondent aux pics à 9,14 ppm (doublet d'intensité relative 2) et à 7,6 ppm (doublet d'intensité relative 2 également) respectivement. Les protons de la partie *p*-xylène correspondent aux singulets à 8,5 ppm pour les 4 protons du cycle benzénique, et à 5,95 ppm pour les 4 protons restants. Les autres signaux correspondent à différents bouts de chaînes venant de la multiplicité de longueurs de chaîne.

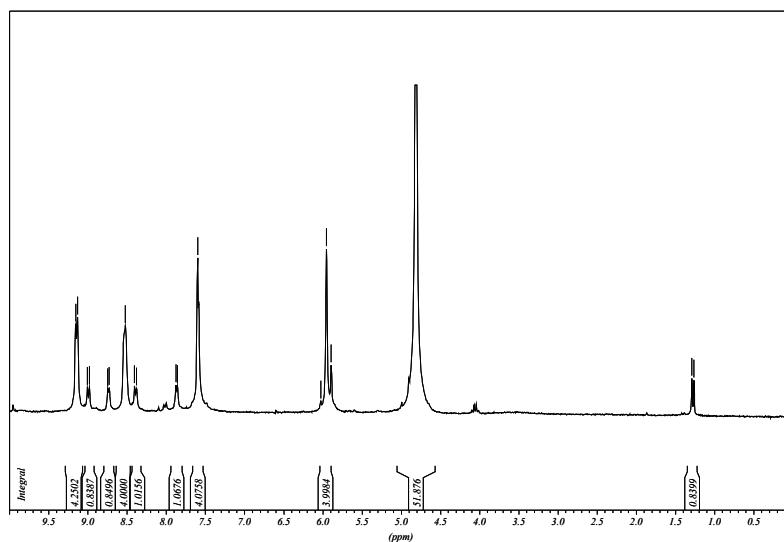


Figure n°4.14 : Spectre RMN 1H du polyviologène PV_2 dans l'eau deutérée

Puis, pour connaître les propriétés électrochimiques de ce polyélectrolyte, il a été autoassemblé avec du polystyrène sulfonate, comme pour PV_1 , dont la construction a été suivie par électrochimie, sur une électrode modifiée par du 3-mercaptopropanesulfonate (MPS) (de la même manière que cela a été développé dans le chapitre précédent) comme le présente la figure 4.15.

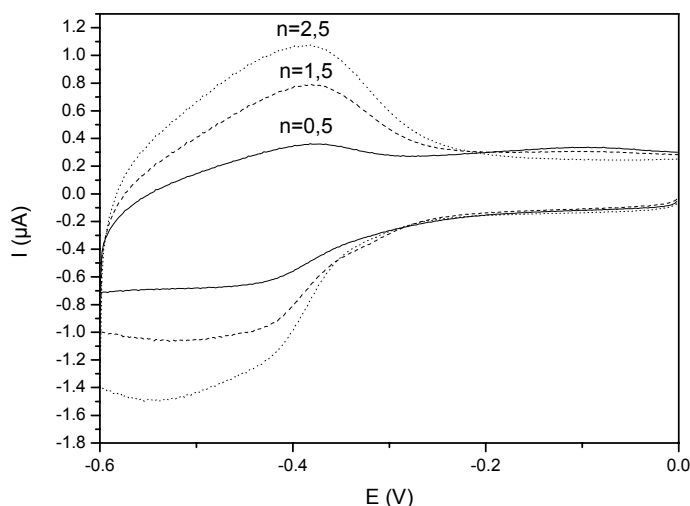


Figure n°4.15 : Voltampérogrammes cycliques ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) obtenus sur $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{PV}_2/\text{PSS})_n$ pour différents nombres de bicouches, n , (0,5, 1,5 et 2,5) enregistrés dans du tampon phosphate 0,1 M, $\text{pH}=7,4$ désoxygéné

Sur la figure 4.15, on note, pour la première couche (courbe n=0,5), la présence d'un pic de réduction à -0,52V, qui correspond à la réduction du groupe viologène en radical cation, $V^{\bullet+}$. Le voltampérogramme obtenu pour une monocouche de PV_2 est caractéristique d'une espèce adsorbée à la surface de l'électrode. De la même manière que pour PV_1 , l'étude en fonction de la vitesse de balayage révèle un comportement en couche mince de ce type d'assemblage.

La différence de potentiel n'augmente pas avec le nombre de couches, montrant que le PSS^- , dans ce cas, ne ralentit pas la communication électronique entre les sites redox d'une couche de PV_2 à l'autre. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en proportion, le nombre de groupes viologènes présents dans la chaîne polymère est plus important dans le cas de PV_2 que dans le cas de PV_1 . Le phénomène d'interpénétration des couches peut lui aussi jouer un rôle ici comme cela a été plusieurs fois démontré dans des études d'assemblages de deux polyélectrolytes, en réduisant la distance entre deux couches de PV_2 et en favorisant donc la communication électronique entre les sites redox.

En intégrant la surface du pic de réduction, on obtient la quantité d'électricité, Q_{red} , nécessaire à la réduction du viologène en radical cation. Or cette quantité est directement reliée à la quantité de groupes redox actifs, Γ_{V2+} , accessibles au transfert d'électrons pendant le temps d'enregistrement d'une courbe.

$$\Gamma_R = \frac{Q}{nFA} \quad (4)$$

Où n est le nombre d'électrons échangés lors de la réaction électrochimique (1 dans ce cas), A, la surface de l'électrode et F, le faraday (96500 coulombs).

La figure 4.16 nous montre l'évolution de Γ_{V2+} en fonction du nombre de couches de PV_2 . On peut remarquer que la variation de la quantité de groupements viologènes électroactifs est linéaire avec le nombre de couches de l'assemblage étudié, traduisant la reproductibilité des étapes d'adsorption de l'assemblage. Une quantité moyenne de viologènes électroactifs incorporés par couche de polyélectrolyte redox a pu être déterminée et est égale à $5,65 \cdot 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$.

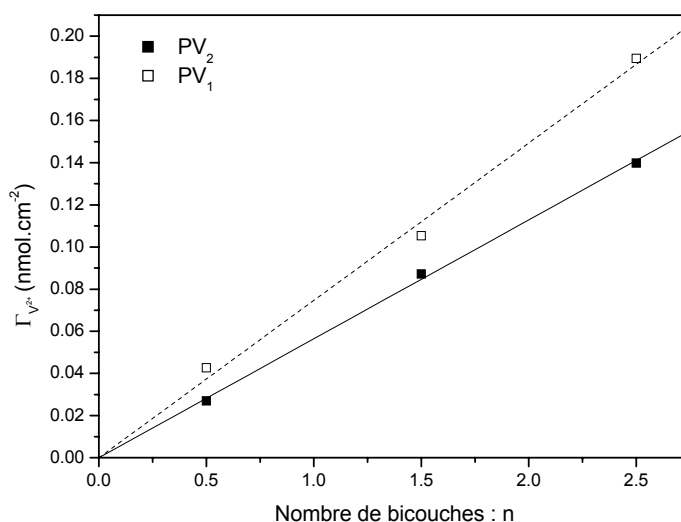


Figure n°4.16 : Evolution de la concentration surfacique, $\Gamma_{V_2^+}$, en groupes viologènes, en fonction du nombre de couches d'un assemblage $(PV_2/PSS)_n$ (■), et d'un assemblage $(PV_1/PSS)_n$ (□), pour $n=0,5, 1,5$ et $2,5$

En comparant les deux polyviologènes PV₁ et PV₂, on voit que l'on a une plus grande quantité de groupes viologènes électroactifs dans le film avec PV₁ qu'avec PV₂. Ceci signifie qu'un plus grand nombre de sites redox est accessible dans le cas de PV₁. Ce résultat est surprenant car on pouvait s'attendre à l'inverse, étant donné que le nombre de groupes viologènes est nettement plus grand dans le cas de PV₂.

Comme le PV₁ a déjà fait l'objet d'une étude lors d'assemblage avec la nitrate réductase²⁵, nous avons choisi de continuer de travailler avec ce polyviologène, pour des assemblages avec des nanoparticules d'or.

De plus, il est difficile de contrôler la longueur de chaîne de PV₂ mais il aurait été intéressant de voir l'influence de ce type de polyviologène dans des assemblages avec des nanoparticules d'or.

4.3.1.2 Caractérisation d'assemblages de polyviologène et de nanoparticules d'or

La caractérisation d'assemblages de polyviologène (PV₁) et de nanoparticules d'or de 5 et 10 nm (nommées NP₅ et NP₁₀ respectivement) a été effectuée par spectroscopie UV-

Visible et par électrochimie pour obtenir des informations sur la structure et sur les propriétés de tels films.

4.3.1.2.1 Etude spectroscopique

Les parois d'une cuve de quartz sont modifiées de façon à obtenir une monocouche de charges négatives, comme dans le cas des assemblages avec le chitosane, qui ont été décrits dans les chapitres 2 et 3 de ce mémoire. Puis, après chaque mise en contact alternée avec les solutions de PV₁ et de NP₅ ou NP₁₀, un spectre d'absorption de la cuve en présence de tampon phosphate (TP) 0,1M, pH=7,5 est enregistré. L'ensemble des spectres réalisés sont présentés sur la figure 4.17.

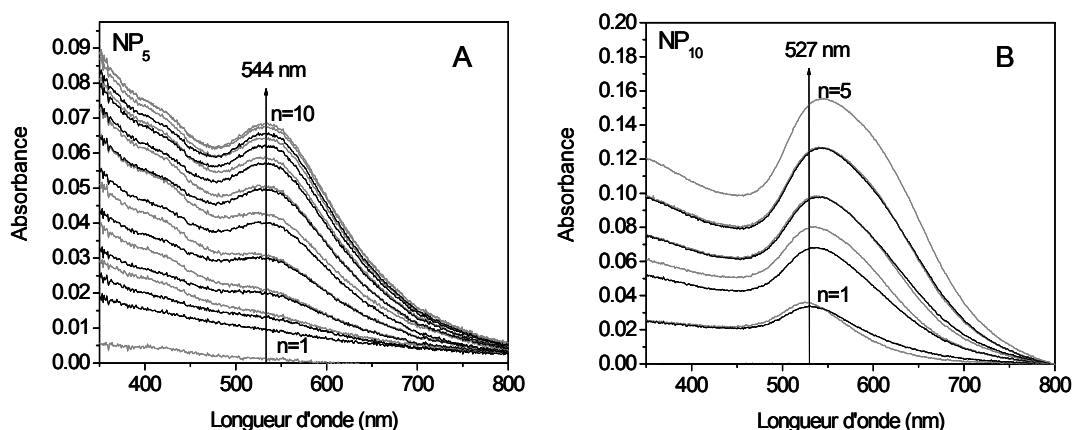


Figure n°4.17 : Spectres d'absorption d'assemblages, à partir de la mise en contact des parois (négativement chargées) d'une cuve de 0,1 cm de trajet optique avec une solution de PV₁ à 1 mg.ml⁻¹ dans le tampon phosphate 0,1 M à pH=7,5 durant 15 minutes (en noir) et les solutions colloïdales de NP (en gris) durant 15 minutes, (PV₁/NP₅)_n (A) et (PV₁/NP₁₀)_n (B) pour différents nombres de bicouches, n, enregistrés dans le tampon phosphate 0,1 M, à pH=7,5

La figure 4.17 présente les spectres d'absorption, à chaque couche, des assemblages réalisés entre le polyviologène PV₁ et les nanoparticules de 5 et 10 nm. On observe l'augmentation de l'absorbance avec le nombre de couches, traduisant la croissance des assemblages. On remarque que la longueur d'onde maximale caractéristique des NP₁₀ est déplacée de 516 nm (courbe b de la figure 4.9) à 527 nm entre la suspension colloïdale des NP₁₀ et l'assemblages de (PV₁/NP₁₀)_n, respectivement. Ce déplacement

s'explique par un changement de l'environnement diélectrique des nanoparticules²¹. Ce même raisonnement est applicable dans le cas des NP₅, où la bande de résonance plasmonique de surface de ces NP passe de 524 à 544 nm.

Puis en relevant l'absorbance à la longueur d'onde d'absorption caractéristique de chaque type de NP en fonction du nombre de bicouches, le graphe de la figure 4.18 a été construit.

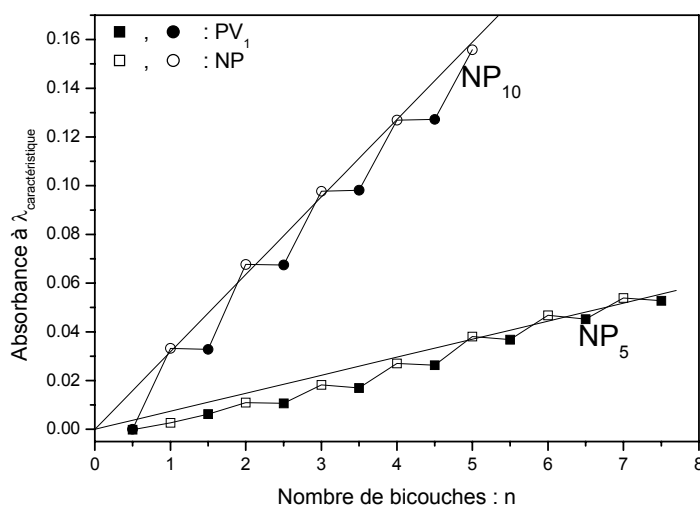


Figure n°4.18 : Evolution de l'absorbance pour les assemblages $(PV_1/NP_5)_n$ à 544 nm (■) et $(PV_1/NP_{10})_n$ à 527 nm (●) respectivement. Pour n demi-entier (symbole fermé), la dernière couche est constituée de PV₁ et pour n entier (symbole ouvert), la dernière couche de l'assemblage est composée de NP.

On note une augmentation linéaire de l'absorbance avec le nombre de couches, ce qui traduit la reproductibilité des étapes d'adsorption des espèces utilisées pour ces assemblages.

A partir des valeurs d'absorbances mesurées et de la relation (1), il est possible de calculer la concentration surfacique en NP, Γ_{NP} (où les coefficients d'extinction molaire des ϵ_{544} et ϵ_{527} sont respectivement de $5,33 \cdot 10^{-14}$ mL.particules⁻¹.cm⁻¹ et $1,63 \cdot 10^{-13}$ mL.particules⁻¹.cm⁻¹) pour les bandes d'absorption caractéristiques des NP₅ et NP₁₀ respectivement. Nous avons calculé une quantité moyenne de NP₅ et de NP₁₀ adsorbées par couche : $1,3 \cdot 10^{11}$ et $1,6 \cdot 10^{11}$ particules.cm⁻² respectivement. Connaissant l'aire de projection d'une nanoparticule, on peut calculer la quantité de NP contenues dans une monocouche dense, $5,09 \cdot 10^{12}$ particules.cm⁻² et $1,27 \cdot 10^{12}$ particules.cm⁻² pour les NP₅ et

NP₁₀ respectivement. Dans les assemblages réalisés, chaque couche de NP correspond donc à un recouvrement surfacique de 2,5% et de 12,6% respectivement. Ce recouvrement est plus faible que dans le cas où les NP sont assemblées avec du PDDA⁺, cette différence peut être attribuée à la différence de la densité de charge de ces polyélectrolytes. Comme la densité de charge du PV₁ est plus faible que celle du PDDA⁺, la quantité de NP₁₀ adsorbées est plus faible aussi.

Un avantage de la présence d'un groupement redox greffé sur la chaîne polymère du polyélectrolyte est que l'on peut suivre la construction de l'assemblage par électrochimie, comme cela a été observé avec le PSS⁻. Un autre avantage de ce groupe redox est qu'il peut conférer des propriétés électrochimiques intéressantes.

4.3.1.2.2 Etude électrochimique

Ces mêmes assemblages ont été construits sur une surface d'électrode d'or modifiée par une monocouche de 3-mercaptopropanesulfonate, MPS, dont la structure et les propriétés ont été décrites dans le chapitre précédent. Nous avons pu suivre la construction de ces assemblages par électrochimie du fait du groupe viologène électroactif, présent dans la chaîne polymère du polyélectrolyte autoassemblé.

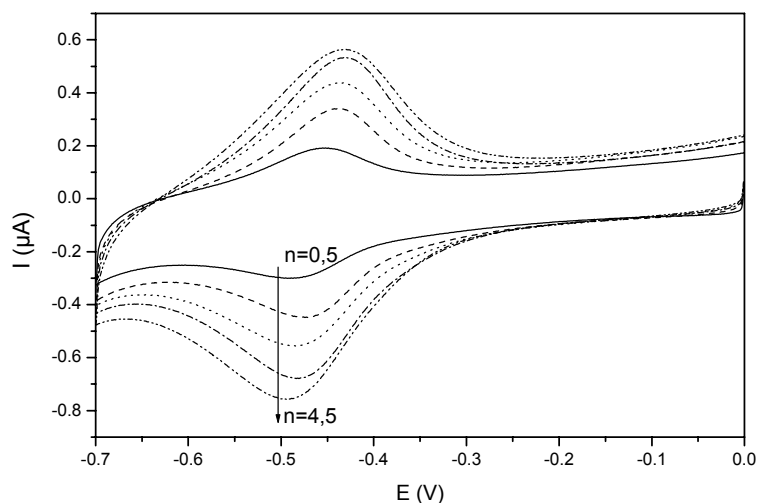


Figure n°4.19 : Voltampérogrammes cycliques ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) obtenus avec des électrodes d'or modifiées, de type $\text{Au/MPS}/(\text{PV}_1/\text{NP}_{10})_n$ avec différents nombres de bicouches, n , dans le tampon phosphate $0,1 \text{ M}$ à $\text{pH}=7,5$

La figure 4.19 montre les courbes de VC obtenues pour différentes couches déposées à la surface de l'électrode d'or, à la même vitesse de balayage ($0,1 \text{ V.s}^{-1}$).

L'étude en fonction de la vitesse de balayage a montré que ces assemblages ont un comportement de film en couche mince jusqu'à $0,2 \text{ V.s}^{-1}$, avec un potentiel standard apparent $E^{\circ'}=E_{1/2}=-0,46 \text{ V}$, pour chacune des couches adsorbées. Cette étude a également permis de déterminer la quantité de sites redox actifs, selon la relation (3), pour chaque couche, dont l'évolution est présentée sur la figure 4.20.

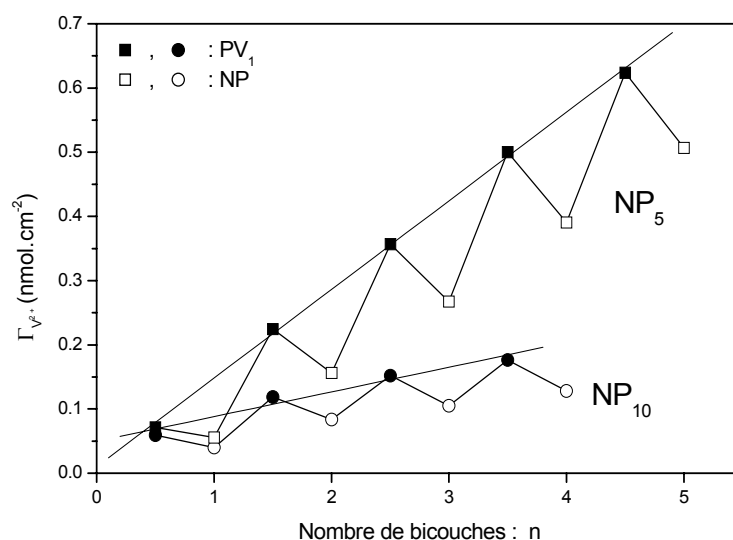


Figure n°4.20 : Variation de la quantité de sites redox actifs, $\Gamma_{V^{2+}}$, en fonction du nombre de bicouches, n , pour des assemblages $(PV_1/NP_5)_n$ (■) et $(PV_1/NP_{10})_n$ (●) réalisés sur une électrode d'or modifiée par une monocouche de MPS. Pour n demi-entier (symbole fermé), la dernière couche est constituée de PV_1 et pour n entier (symbole ouvert), la dernière couche de l'assemblage est composée de NP.

De la même manière que par spectroscopie UV-Visible pour les NP, on observe une croissance linéaire de la quantité de viologène électroactif immobilisé à chaque étape d'adsorption. On peut donc dire que la croissance de ce type de film est linéaire dans les conditions d'adsorption utilisées.

Cette augmentation linéaire a déjà été observée pour un assemblage de polyallylamine ferrocène et de glucose oxydase¹. La figure 4.20 montre aussi que plus la taille de NP est petite, plus le recouvrement surfacique des groupes viologènes électroactifs est important.

D'après la figure 4.18, nous avons déterminé une quantité quasiment équivalente de NP_5 et de NP_{10} . Cela signifie que le transfert électronique entre sites redox devient plus

difficile quand la distance entre deux couches de PV₁ augmente avec la taille des NP. Ce comportement suggère que le transfert électronique dans le film multicouche (PV₁/NP)_n s'effectue principalement par saut d'électrons entre les sites redox et que le transfert électronique entre les sites redox et les NP ou interparticulaire est moins efficace. Ce résultat est en désaccord avec d'autres résultats²⁷ qui démontrent une conductivité électronique où les NP jouent un rôle dans le processus de transfert d'électrons entre les sites redox viologènes d'une couche à l'autre. Ce phénomène pourrait être dû au faible taux d'adsorption de nanoparticules dans ces films.

Etant donné que la communication électronique n'est apparemment pas favorisée par la présence de groupements viologènes, avec le type de polyélectrolyte utilisé (PV₁), nous avons testé un autre polyélectrolyte redox. Et pour des raisons de commodité, nous avons choisi un polyélectrolyte modifié par un groupement ferrocène, qui permet de travailler dans le domaine de potentiels positifs, ce qui évite de devoir désoxygéner la solution, comme cela a été fait pour les polyviologènes. L'étude spectroscopique de ce « polyferrocène » montre des résultats similaires à ceux obtenus avec PV₁ pour des assemblages avec des NP₁₀. Cependant, les mesures électrochimiques ont révélé que le transfert électronique n'était pas efficace dans ce type d'assemblage. Nous avons attribué ces résultats à l'hydrophobie non négligeable du groupement ferrocène, qui ne favorise pas les interactions entre ces groupements redox et avec les nanoparticules. Pour remédier à ce problème, nous avons décidé de synthétiser des polyélectrolytes comportant un groupement plus hydrophile, comme des complexes à base d'osmium.

4.3.2 Polyélectrolyte comportant un groupe à base d'un complexe d'osmium

Il a été décidé de greffer le groupe redox sur un polyallylamine (PAH) et sur un polyvinylpyridine (PVP) pour étudier l'influence de la nature du polymère de départ sur les propriétés finales des assemblages des polyélectrolytes modifiés correspondants, vis-à-vis du transfert électronique.

Le groupement redox choisi est un complexe bipyridinique d'osmium dont l'hydrophilie est plus importante que celle du ferrocène. De plus, le potentiel standard du couple Os(II)/Os(III) est très proche de celui du ferrocène, ce qui a permis à ces

complexes d'être utilisés comme médiateur redox dans un processus électroenzymatique^{2-5,7,12,13,28,29}.

4.3.2.1 Synthèse et caractérisation

4.3.2.1.1 Complexes d'osmium

Nous avons commencé par synthétiser les complexes d'osmium qui seront ultérieurement greffés^{30,31} sur les chaînes polymère du PVP ou du PAH.

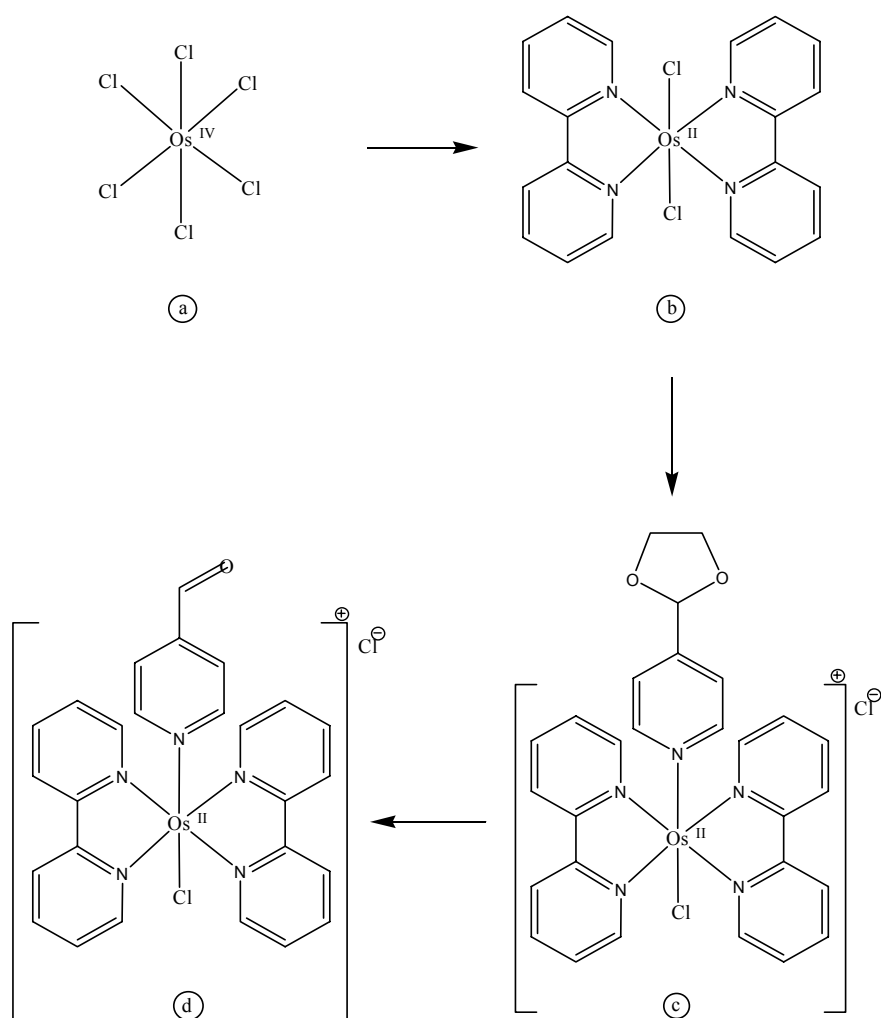


Schéma n°4.3 : Complexes d'osmium synthétisés pour la modification de polyélectrolytes (voir partie expérimentale pour les détails de la synthèse)

Le schéma 4.3 présente les différents complexes obtenus à partir du sel d'hexachloroosmate de départ (complexe a).

Les différents complexes d'osmium b, c et d ont été caractérisés par RMN ^1H et aussi par spectrométrie de masse (voir partie expérimentale).

La figure 4.21 représente les spectres d'absorption UV-Visible des complexes b, c et d en solution dans l'acétonitrile.

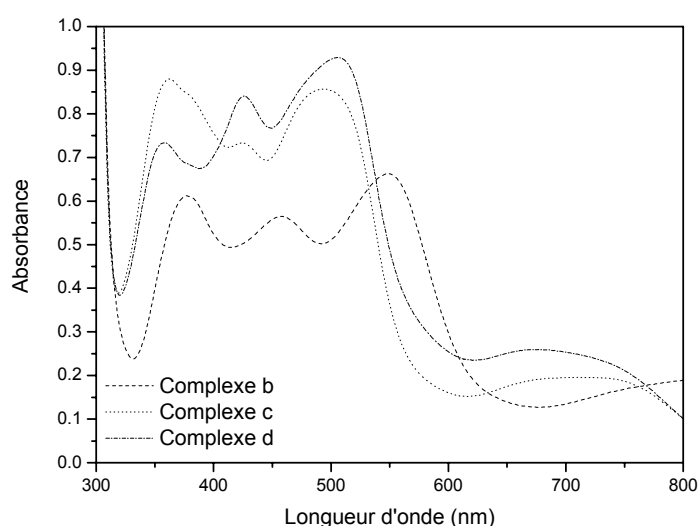


Figure n°4.21 : Spectres d'absorption UV-Visible des différents complexes en solution dans l'acétonitrile, avec un cuve de 1 cm de trajet optique ($[b]=7,9.10^{-5} M$, $[c]=7,2.10^{-5} M$ et $[d]=6,9.10^{-5} M$)

Les bandes vers 475-500 et 420-460 nm des spectres d'absorption de la figure 4.21 correspondent à des transitions électroniques métal – ligand $\text{Os}(d\pi) \rightarrow \text{bpy}(\pi^*)$, tandis que les bandes vers 360-380 traduisent un transition $\pi \rightarrow \pi^*$ des ligands bipyridines(bpy)³².

Des droites d'étalonnage de solutions de ces complexes dans l'eau et dans l'acétonitrile ont été réalisées, selon la loi de Lambert-Beer. Le tableau 4.2 regroupe les résultats obtenus des calculs des différents coefficients d'extinction molaire aux longueurs d'onde caractéristiques correspondantes.

Tableau n°4.2 : Coefficients d'extinction molaire des complexes b, c et d, obtenus par étalonnage de solutions de ces complexes dans l'eau et l'acétonitrile. Remarque : le complexe b n'est pas soluble dans l'eau et le complexe c ne possède que 2 bandes distinctes en milieu aqueux

| Produit | Absorption UV-Visible | | | | | | | | | | | |
|------------|-----------------------|---|----------------|---|----------------|---|----------------|---|----------------|---|----------------|---|
| | H2O | | CH3CN | | H2O | | CH3CN | | H2O | | CH3CN | |
| | λ (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) | λ (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) | λ (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) | λ (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) | λ (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) | λ (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) |
| Complexe b | / | / | 549 | 10800 | / | / | 459 | 9300 | / | / | 379 | 10200 |
| Complexe c | 475 | 11300 | 493 | 12000 | / | / | 426 | 10300 | 374 | 11450 | 362 | 12400 |
| Complexe d | 495 | 12800 | 507 | 13300 | 415 | 10650 | 426 | 12100 | 357 | 10000 | 357 | 10600 |

Ces complexes ont aussi été analysés par électrochimie en solution, dont les résultats sont regroupés dans le tableau 4.3.

Tableau n°4.3 : Caractéristiques électrochimiques (potentiel de demi-vague $E_{1/2}$) des complexes d'osmium b, c et d, obtenues par VC sur une électrode d'or nu

| Produit | Electrochimie (par rapport à Ag/Ag ⁺) | Electrochimie (par rapport à Ag/AgCl/KCl 3 M) |
|------------|---|--|
| | $E_{1/2}$ (V) dans TBAP 0,1 M dans CH ₃ CN | $E_{1/2}$ (V) dans Tampon phosphate 0,1 M pH=7,5 |
| Complexe b | -0,308 | Insoluble en milieu aqueux |
| Complexe c | 0,074 | 0,263 |
| Complexe d | 0,094 | 0,265 |

Les valeurs que nous avons obtenues sont en accord avec celles données dans la littérature³².

On peut noter que la nature du ligand de l'osmium a une influence sur le processus électrochimique du système Os(II)/Os(III), comme l'ont montré Kober et al³⁰.

Les ligands des différents complexes sont plus ou moins électrodonneurs : un chlorure est plus électrodonneur qu'un groupement pyridine-acétal qui l'est un peu plus qu'un groupement pyridine-aldéhyde. Plus le ligand est électrodonneur, plus le centre métallique d'osmium sera facile à oxyder, donc, plus le $E_{1/2}$ est faible. C'est ce que l'on remarque dans l'acétonitrile. Dans l'eau, cette différence est nettement moins marquée

car les ligands des complexes c et d sont similaires. De plus, le complexe b est insoluble en milieu aqueux, donc on peut penser que les complexes c et d auront tendance à faire des paires d'ions avec les contre-ions du milieu plus facilement en milieu aqueux qu'en milieu organique. Ceci va diminuer les différences d'environnement électronique du centre métallique dans les deux complexes c et d.

Nous avons ensuite greffé les complexes d'osmium c et d sur une chaîne de polyvinylpyridine pour obtenir le polyvinylpyridine osmium (OsPVP) et de polyallylamine pour obtenir le polyallylamine osmium (OsPAH) respectivement.

4.3.2.1.2 Polyvinylpyridine osmium

La voie de synthèse du polyvinylpyridine osmium suit la méthode décrite par Heller²⁹ et est représentée par le schéma 4.4.

La synthèse du polyvinylpyridine osmium (OsPVP) (détaillée dans la partie expérimentale) se fait en une étape et est suivie d'une purification classique et d'une dialyse.

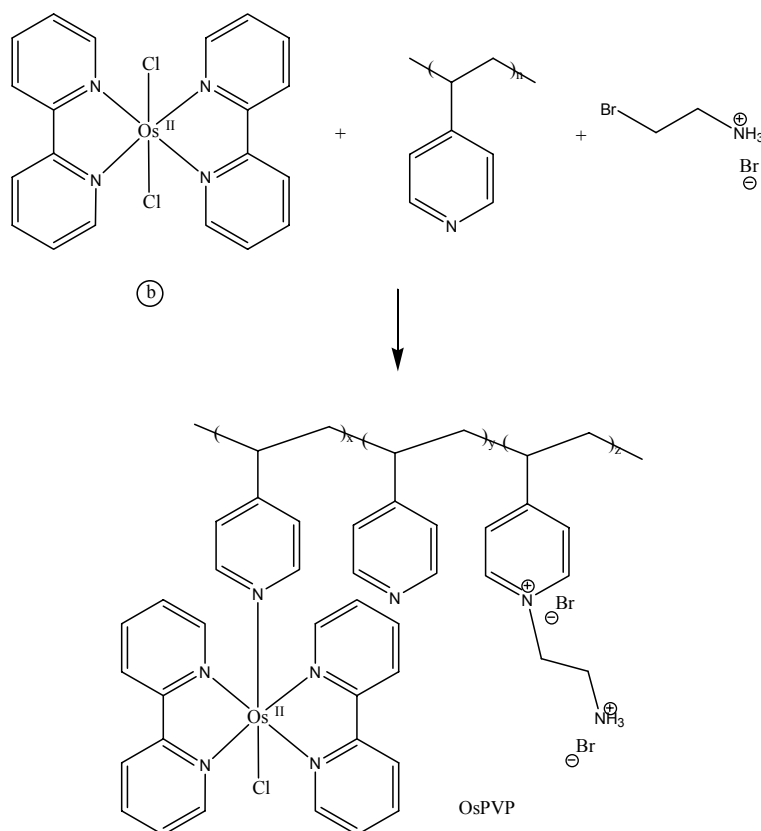


Schéma n°4.4 : Voie de synthèse utilisée pour le polyvinylpyridine osmium (OsPVP)

Le polyélectrolyte résultant a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible. Son spectre d'absorption en solution est superposé à celui du complexe d'osmium c dans la figure 4.22.

On remarque que ces deux produits ont les mêmes bandes d'absorption caractéristiques. En supposant que les caractéristiques spectroscopiques de l'OsPVP sont les mêmes que celles du complexe c (voir tableau 4.2), le taux de substitution du PVP par le complexe d'osmium a été estimé à 2,9%. Avec ce taux de substitution et en estimant que l'on n'a pas perdu de molécules de PVP lors de la dialyse, nous avons estimé la concentration de la solution d'OsPVP à environ 2 mg.mL^{-1} .

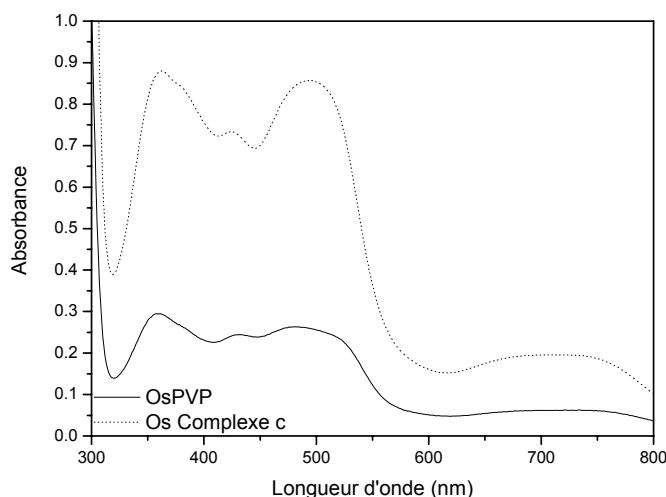


Figure n°4.22 : Spectres d'absorption UV-Visible d'une solution de complexe c ($[c]=7,2.10^{-5} \text{ M}$) et d'une solution d'OsPVP (solution de dialyse diluée 10 fois dans l'acétonitrile), enregistrés avec une cuve de quartz de 1 cm de trajet optique dans l'acétonitrile

La construction d'un assemblage de ce PE redox avec du PSS^- a été suivie par électrochimie pour connaître son comportement en phase adsorbée. Ceci a permis d'obtenir les voltampérogrammes présentés en figure 4.23, pour différentes électrodes $\text{Au/MPS}/(\text{OsPVP}/\text{PSS}^-)_n$, avec $n=0,5, 1,5$ et $2,5$.

Les voltampérogrammes de la figure 4.23 sont caractéristiques de l'oxydation monoélectronique réversible du centre métallique Os(II) en Os(III) :



Ces voltampérogrammes montrent aussi une croissance du film par l'augmentation des courants faradiques anodique et cathodique (correspondant respectivement à

l'oxydation et à la réduction du couple redox Os(II)/Os(III)), résultant de la communication électronique entre les sites redox d'osmium entre les différentes couches. Une couche de PSS⁻ séparant deux couches de PE redox ralentit cette communication électronique puisque le ΔE_p augmente avec le nombre de couches, alors que le potentiel demi-vague $E_{1/2}$ ne varie pas et est égal à 0,32 V. Cette valeur est proche de celle du complexe c en solution aqueuse. Ceci confirme que leurs comportements sont très semblables.

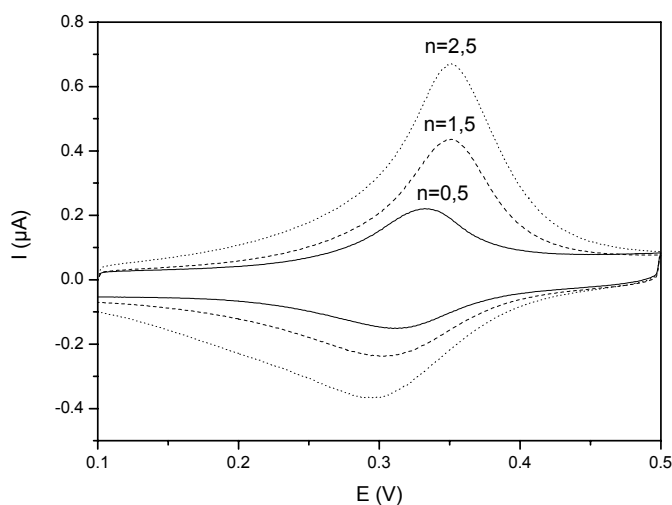


Figure n°4.23 : Courbes de VC ($0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) d'électrodes d'or modifiées Au/MPS/(OsPVP/PSS)_n, avec n=0,5, 1,5 et 2,5, enregistrées dans le tampon phosphate 0,1 M et à pH=7,5

Il faut noter que le voltampérogramme correspondant à une monocouche d'OsPVP (courbe n=0,5 de la figure 4.23) nous indique que ce système n'est pas réversible car le rapport de l'aire du pic anodique sur l'aire du pic cathodique est supérieur à 1.

Ce manque de réversibilité nous a conduit à réaliser le greffage d'un autre polymère par un complexe d'osmium en espérant obtenir un système redox plus réversible.

4.3.2.1.3 Polyallylamine osmium

La voie de synthèse utilisée suit la méthode décrite dans la littérature³⁰⁻³². Le mode opératoire des différentes étapes de synthèse, montrées par le schéma 4.5, est précisé dans la partie expérimentale de ce mémoire.

Le polyélectrolyte que l'on a obtenu n'a pas pu être isolé par lyophilisation ou même par précipitation. Nous avons donc utilisé la solution de dialyse dont la concentration a été estimée à $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$, d'après les masses et volumes utilisés lors de la synthèse et en supposant que l'on ne perd pas de molécules de polyallylamine lors de la dialyse.

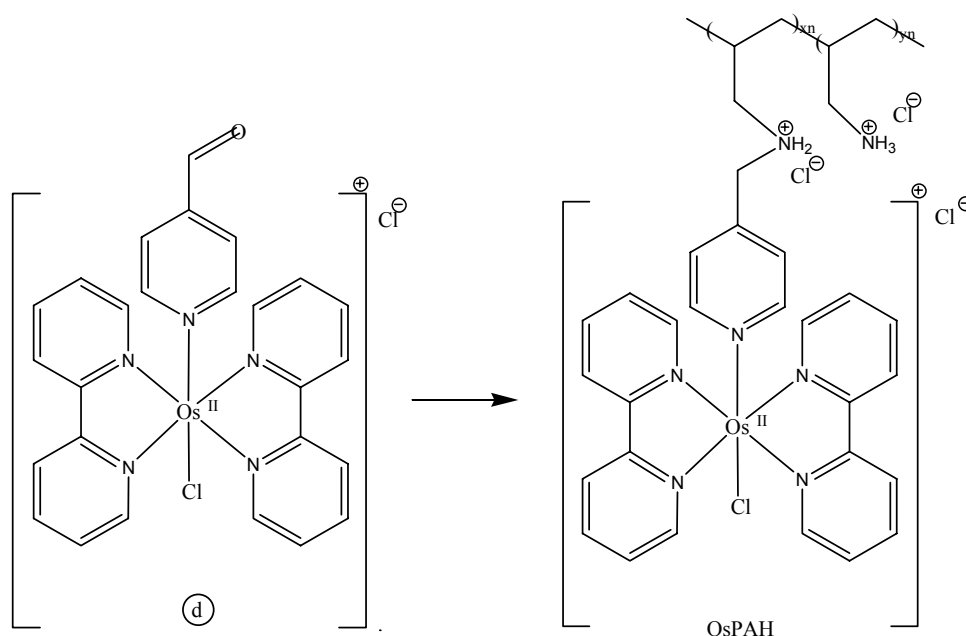


Schéma n°4.5 : Schéma réactionnel du greffage d'un complexe d'osmium sur la chaîne polymère d'un polyallylamine, permettant la synthèse du polyallylamine osmium, OsPAH

Ce polymère a été analysé par spectroscopie UV-Visible, dont le spectre est représenté par la figure 4.24.

On remarque cependant que le spectre de l'OsPAH est particulièrement similaire à celui du complexe c, sans doute à cause d'environnements électroniques similaires autour de l'osmium. On note que les différents coefficients d'extinction molaire sont du même ordre de grandeur pour les trois complexes, aux différentes longueurs d'onde caractéristiques. Il a donc été supposé que les coefficients d'extinction molaire de l'osmium dans l'OsPAH sont les mêmes que pour le complexe c. Grâce à cette hypothèse, nous avons pu déterminer le taux de substitution du PAH par les groupements d'osmium à 5%.

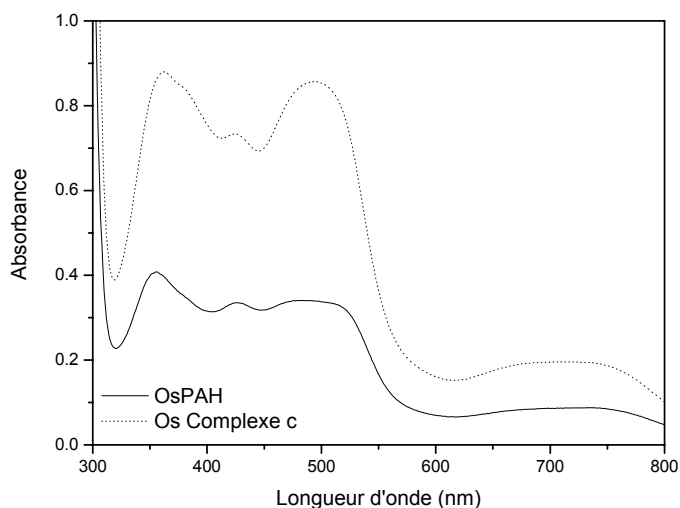


Figure n°4.24 : Spectres d'absorption UV-Visible d'une solution de complexe c ($[c]=7,2 \cdot 10^{-5} M$) et d'une solution d'OsPAH (solution de dialyse diluée 10 fois dans l'acétonitrile), enregistrés avec une cuve de quartz de 1 cm de trajet optique dans l'acétonitrile

Le polyallylamineosmium a été assemblé avec du polystyrène sulfonate, sur une surface d'électrode d'or activée et modifiée par une monocouche de MPS, dans les mêmes conditions qu'au chapitre 3. Les voltampérogrammes d'électrodes Au/MPS/(OsPAH/PSS⁻)_n sont montrés par la figure 4.25, pour n=0,5, 1,5 et 2,5.

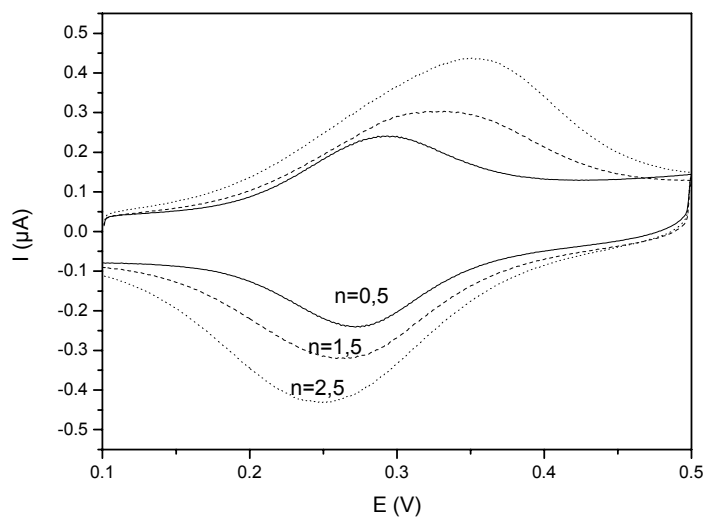


Figure n°4.25 : Courbes de VC ($0,05 V \cdot s^{-1}$) pour des électrodes Au/MPS modifiées par différentes bicouches de (OsPAH/PSS⁻)_n, pour n=0,5, 1,5 et 2,5, enregistrées dans le tampon phosphate 0,1 M à pH=7,5

On remarque que le potentiel de demi-vague, $E_{1/2}$, ne varie pas avec le nombre de couches et est égal à 0,28 V. Ceci indique que l'environnement des sites d'osmium ne change pas lors de l'adsorption d'une monocouche ou de plusieurs couches. Les courants faradiques anodique et cathodique augmentent avec le nombre de bicouches, prouvant la construction de l'assemblage et la communication électronique entre les différents sites redox des différentes couches. De plus, ce potentiel est proche de celui mesuré pour le complexe c en solution aqueuse. Donc, comme pour l'OsPVP, le complexe d'osmium dans l'OsPAH a un environnement électronique proche de celui du complexe c. Ceci confirme les observations qui ont été faites, par spectroscopie UV-Visible, pour le calcul du taux de substitution de l'osmium dans ce polymère.

Il faut aussi noter que le voltampérogramme obtenu pour une monocouche d'OsPAH (courbe n=0,5 de la figure 4.25) est caractéristique d'une espèce redox adsorbée à la surface de l'électrode, car $\Delta E_p \approx 0$. Le transfert électronique est rapide et réversible car les aires des pics anodique et cathodique sont équivalentes.

Cependant, cette communication devient de plus en plus difficile lorsque des couches de PSS⁻ viennent séparer celles d'OsPAH. Ces couches de PSS⁻ augmentent la distance entre les couches de PE redox, ce qui ralentit le transfert électronique entre les sites redox des différentes couches. Ceci se traduit par une augmentation de la différence de potentiel ΔE_p entre les pics anodique et cathodique. Ce phénomène a aussi été observé avec les autres PE synthétisés.

Si on compare les observations réalisées avec l'OsPAH et l'OsPVP, on remarque que ces deux polymères ont un comportement spectroscopique équivalent. Cependant, leur comportement électrochimique en phase adsorbée avec du polystyrène sulfonate est différent. Le polyallylamine permet que le processus électrochimique, mettant en jeu le complexe d'osmium, soit rapide et réversible. Pour cette raison, il a été décidé d'assembler l'OsPAH avec les NP₁₀, malgré la synthèse plus compliquée de l'OsPAH.

Avant de réaliser des assemblages entre l'OsPAH et les NP₁₀, il a été nécessaire de déterminer le milieu adéquat pour l'adsorption de ce PE redox.

La densité de charge de l'OsPAH provient de la proportion de groupes allylamine protonés en fonction du pH d'utilisation. Le pH de la solution d'adsorption va donc indirectement influencer l'adsorption de ce PE redox à la surface d'une électrode.

Plusieurs tests ont été réalisés. Il a été remarqué que des solutions d'OsPAH en tampon acétate et en tampon MES (acide 2-(2-morpholino)éthanesulfonique) à pH=4 ne permettent pas d'obtenir des monocouches suffisamment stables ni reproductibles pour qu'elles puissent être utilisées pour immobiliser des nanoparticules d'or. L'ajout de tampon phosphate à une solution d'OsPAH forme un précipité, donc, ce tampon n'a pas pu non plus être utilisé comme milieu d'adsorption de l'OsPAH.

Le même essai a été réalisé avec une solution d'OsPAH à $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans un tampon TRIS $0,025 \text{ M}$ de pH=7,5. Nous avons remarqué que l'intensité du courant faradique, mesurée à partir des courbes de VC obtenues dans une solution électrolytique de tampon TRIS $0,025 \text{ M}$ de pH=7,5, augmente avec le temps de contact entre l'électrode et la solution d'OsPAH dans le TRIS. La figure 4.26 présente l'évolution de i_{pa} en fonction du temps d'adsorption de l'OsPAH sur la surface Au/MPS.

On note que l'intensité du pic augmente régulièrement jusqu'à atteindre une valeur maximale. A partir de ces résultats, un temps de 15 minutes d'adsorption a été choisi pour réaliser des autoassemblages de ce PE redox, ce qui concorde avec les résultats obtenus avec ce même PE⁷.

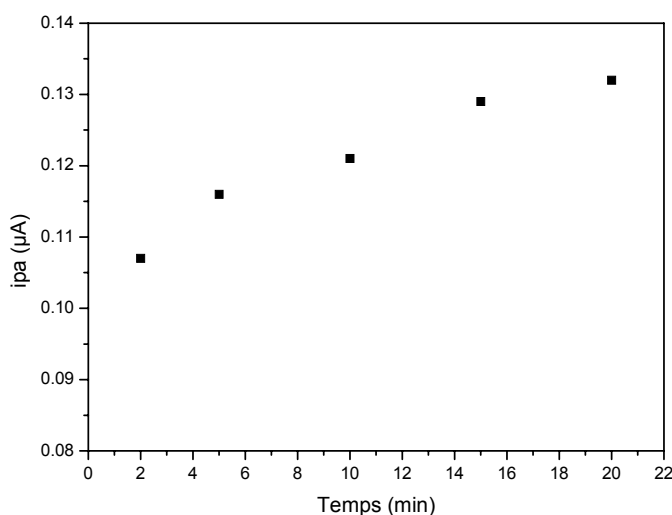


Figure n°4.26 :

« Cinétique d'adsorption » de l'OsPAH sur Au/MPS en tampon TRIS $0,025 \text{ M}$, pH=7,5. Courant de pic anodique, i_{pa} , mesuré sur des courbes de VC réalisées à une vitesse de balayage de $0,05 \text{ V.s}^{-1}$ dans TRIS $0,025 \text{ M}$ à pH=7,5. Evolution de i_{pa} en fonction du temps de contact entre la solution d'OsPAH dans du TRIS $0,025 \text{ M}$ à pH=7,5 et une même électrode Au/MPS.

Une électrode Au/MPS/OsPAH a été réalisée à partir d'une solution d'OsPAH dans l'eau. Le voltampérogramme obtenu dans du TRIS 0,025 M à pH=7,5, présenté dans la figure 4.25 (courbe n=0,5), est caractéristique d'une espèce adsorbée à l'électrode.

En comparant la courbe de VC obtenue dans ce cas (courbe a) à celle obtenue pour une même électrode modifiée Au/MPS/OsPAH mais à partir d'une solution d'OsPAH avec du TRIS (courbe b), on remarque, d'après la figure 4.27, que les ΔE_p et $E_{1/2}$ sont les mêmes pour ces deux électrodes. Ceci signifie que l'immobilisation par interactions électrostatiques d'un polymère greffé par un complexe d'osmium présente un système redox réversible. De plus, le courant faradique anodique est élevé dans le cas où l'adsorption de l'OsPAH a été réalisée à partir d'une solution dans le TRIS. Dans ces conditions, on adsorbe une plus grande quantité de PE.

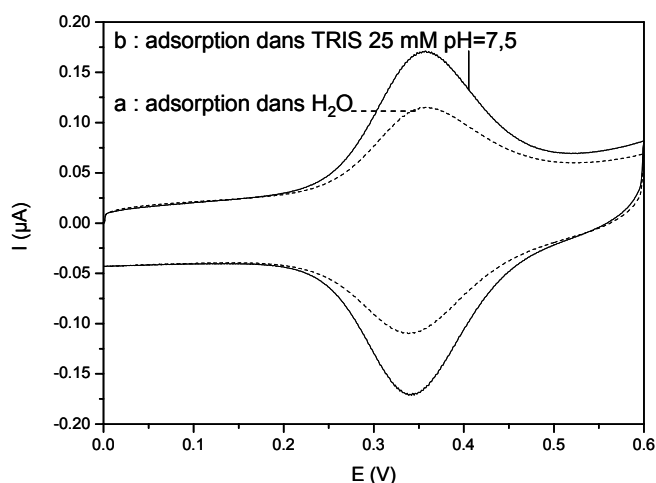


Figure n°4.27 : Courbes de VC ($0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) d'une électrode Au/MPS/OsPAH réalisée à partir d'une solution d'OsPAH dans l'eau pure (a) ou d'une solution dans le tampon TRIS 0,025M pH=7,5 (b) mais de même concentration en OsPAH ($0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), enregistrées dans le tampon TRIS 0,025 M pH=7,5

Ces observations sont en accord avec la littérature^{23,29}, concernant des études montrant que la force ionique influence l'adsorption de PE. A force ionique plus élevée, l'effet d'écran des charges est plus important, il y a donc moins de répulsion électrostatique entre les charges de la chaîne polymère. De ce fait, les chaînes macromoléculaires vont former plus de boucles lors de leur adsorption, ce qui permet d'incorporer une plus grande quantité de PE. Ce résultat prouve que l'électrochimie est un autre moyen de

démontrer l'influence de la force ionique du milieu d'adsorption sur la quantité de PE adsorbé, quand ce même PE contient un groupement redox dans la chaîne polymère.

A partir de tous ces résultats, il a été décidé de travailler avec une solution d'OsPAH dans du tampon TRIS 0,025 M à pH=7,5, avec un temps d'adsorption de 15 minutes. Nous avons donc construit des autoassemblages d'OsPAH à partir d'une solution dans le TRIS, et des nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre (NP₁₀). Ces assemblages ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible, par microgravimétrie et par électrochimie pour obtenir des informations sur la structure et les propriétés des films obtenus.

4.3.2.2 Assemblage de polyallylamine osmium et de nanoparticules d'or

4.3.2.2.1 Etude spectroscopique

Par spectroscopie UV-Visible, nous avons pu évaluer la cinétique d'adsorption des nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre sur une surface Quartz/OsPAH. Nous avons mesuré l'absorbance dans du tampon TRIS, en fonction du temps de contact de la surface de quartz modifiée avec la solution colloïdale des NP₁₀, à la longueur d'onde d'absorption caractéristique des nanoparticules (527 nm). La figure 4.28 présente l'évolution de l'absorbance à cette longueur d'onde en fonction du temps de contact.

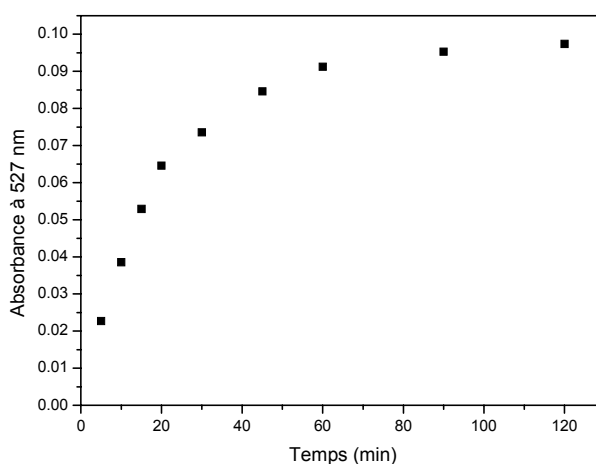


Figure n°4.28 : *Cinétique d'adsorption : variation de l'absorbance mesurée à 527 nm d'une cuve Quartz/OsPAH, dans le tampon TRIS 0,025 M à pH=7,5, en fonction de temps de contact des parois modifiées de cette cuve avec la solution colloïdale de NP₁₀*

On peut noter que l'adsorption est relativement rapide durant les 20 premières minutes puis ralentit et se stabilise car l'absorbance mesurée devient constante. Cette observation a aussi été faite dans le cas du PDDA⁺ présenté précédemment. A partir de la figure 4.28, un temps de 90 minutes a été choisi pour l'adsorption des NP₁₀ lors de la construction de plusieurs bicouches de (OsPAH/NP₁₀) pour obtenir un recouvrement surfacique maximal.

La construction des assemblages (OsPAH/NP₁₀)_n a été suivie par spectroscopie UV-Visible, dont les spectres obtenus pour des nombres de bicouches n allant de 0,5 à 3, sont représentés sur la figure 4.29.

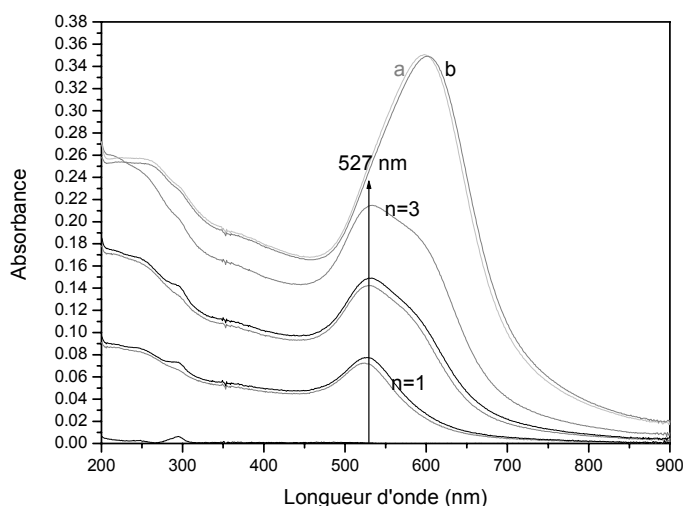


Figure n°4.29 :

Spectres d'absorption d'un assemblage (OsPAH/NP₁₀)_n avec n=0,5 à 3, avec 90 minutes d'adsorption pour les nanoparticules (trait gris) et 15 minutes d'adsorption pour l'OsPAH (trait noir) à partir d'une solution à 0,75 mg.mL⁻¹ dans du tampon TRIS 0,025M pH=7,5 ; Assemblage réalisé sur les parois d'une cuve de quartz de 1 mm de trajet optique ; Balayage réalisé dans le tampon TRIS 0,025M pH=7,5 ; Séchage du film Quartz/(OsPAH/NP₁₀)₃ déposé sur les 2 parois de la cuve grâce à un flux d'Argon pendant 5 minutes puis réhydratation à t=0 (a) et au bout d'une nuit (b)

Dès la première couche de NP₁₀, le spectre obtenu présente une bande d'absorption centrée sur 527 nm, correspondant à la bande d'absorption de résonance plasmonique de surface des NP₁₀, au sein d'un autoassemblage²¹. Ce léger déplacement en longueur d'onde de cette bande entre la solution colloïdale et un autoassemblage provient d'un

changement de l'environnement diélectrique des NP_{10}^{21} . Au fur et à mesure de l'assemblage, on voit apparaître un épaulement à 586 nm. Lorsque l'on sèche le film, on obtient une bande d'absorption centrée sur 600 nm. Cette bande a été attribuée à l'agrégation des NP_{10}^{22} , comme avec le $PDDA^+$. Cependant, l'agrégation des NP_{10} est moins importante dans un assemblage avec l'OsPAH qu'avec le $PDDA^+$. La figure 4.30 montre l'évolution de l'absorbance mesurée à 527 nm en fonction du nombre de bicouches, n allant de 0,5 à 3.

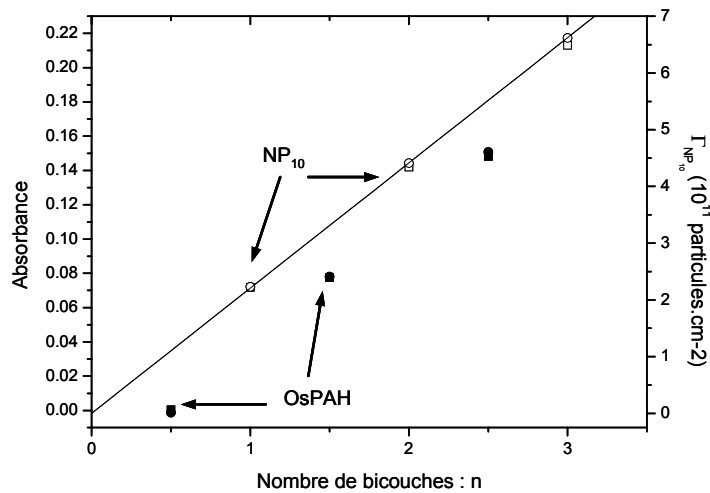


Figure n°4.30 : Evolution de l'absorbance mesurée à 527 nm (\square , échelle de gauche) et de la concentration surfacique $\Gamma_{NP_{10}}$, calculée à partir de la relation (1) (\circ , échelle de droite) pour l'assemblage $(OsPAH/NP_{10})_n$ en fonction du nombre de bicouches, n, allant de 0,5 à 3, d'après le spectres de la figure 4.29. Pour n demi-entier (symbole fermé), l'assemblage se termine par une couche d'OsPAH et par une couche de NP_{10} pour n entier (symbole ouvert).

On remarque que l'absorbance augmente linéairement avec n, ce qui traduit la reproductibilité des étapes d'adsorption de deux espèces autoassemblées et une quantité constante de NP_{10} incorporées à chaque couche. La pente de la droite obtenue nous permet de calculer une quantité moyenne de $\Gamma_{NP_{10}}=2,08.10^{11}$ particules.cm $^{-2}$ par couche, calculée selon la relation (1). Cette valeur correspond à un recouvrement surfacique de 16,35%, légèrement plus élevé que celui obtenu avec le PV_1 , indiquant une légère préférence des NP_{10} pour s'adsorber avec l'OsPAH mais moindre qu'avec le $PDDA^+$. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'influence de la densité de charge des PE utilisés.

4.3.2.2.2 Etude microgravimétrique par QCM-D

Nous avons suivi *in situ* la croissance de l'assemblage entre l'OsPAH (solution à 0,75 mg.mL⁻¹ dans le tampon TRIS 0,025 M à pH=7,5) et les NP₁₀ (solution colloïdale) par microbalance à quartz avec suivi de la dissipation (QCM-D). Plus particulièrement, nous avons mesuré l'évolution de $\Delta F_x/x$ et de ΔD_x (pour x=3, 5 et 7) en fonction du temps lors des différentes étapes de l'assemblage.

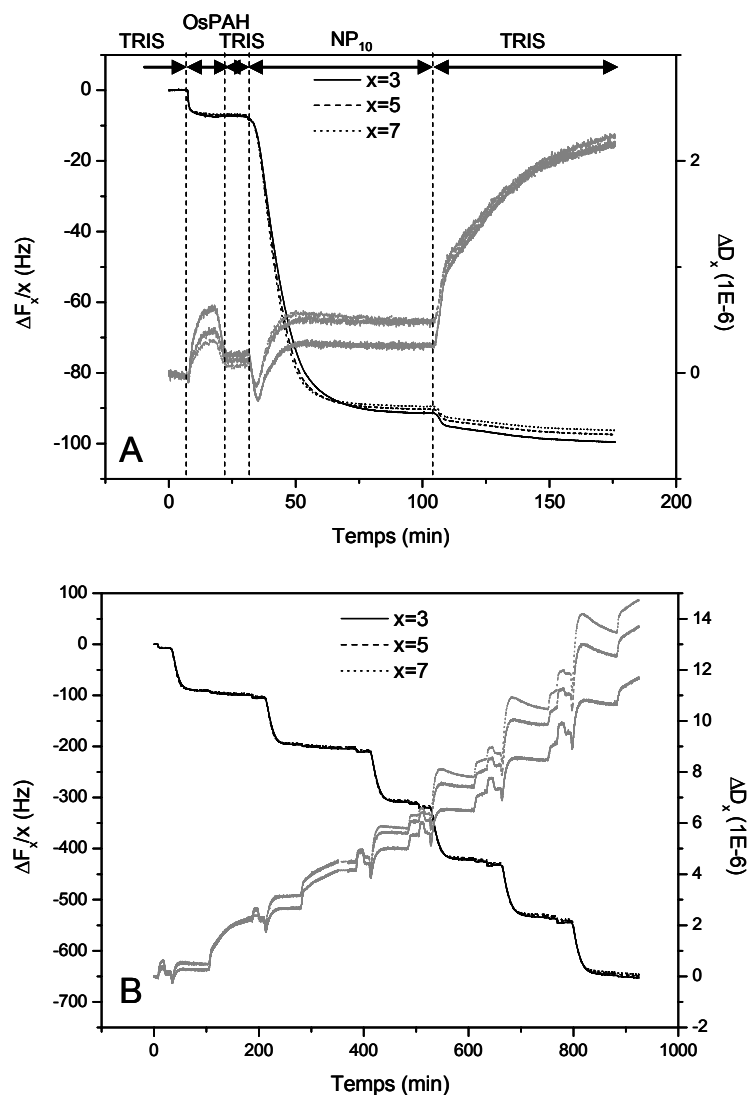


Figure n°4.31 : Evolutions de $\Delta F_x/x$ (en noir) et ΔD_x (en gris) (pour x=3, 5 et 7) en fonction du temps lors de l'assemblage (OsPAH/NP₁₀)₁ (A) et de (OsPAH/NP₁₀)₆ (B) ; Adsorption de l'OsPAH à partir d'une solution à 0,75 mg.mL⁻¹ dans du TRIS 0,025M pH=7,5 et des NP₁₀ à partir de la solution colloïdale commerciale, sur un quartz recouvert d'une surface d'or modifiée par une monocouche de MPS, sous un flux de 50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$

La figure 4.31 présente les variations $\Delta F_x/x$ et ΔD_x pour l'assemblage d'une bicouche (A) et de six bicouches (B) de (OsPAH/NP₁₀), réalisé sur un quartz recouvert d'or modifié par une monocouche rigide de MPS.

On remarque, d'après la figure 4.31A, que l'adsorption du PE redox est relativement rapide puisque les fréquences et les dissipations d'énergie atteignent un palier au bout de 10 minutes. De plus $\Delta F_x/x$ ne varie pas avec x . Les sauts des dissipations ΔD_x , entre avant et après adsorption, sur le palier de tampon TRIS, sont faibles. Ces observations indiquent que la couche d'OsPAH est rigide.

Quant à l'adsorption des NP₁₀, elle est beaucoup plus lente et conduit à une variation des fréquences plus importante. Ce processus d'adsorption pour une bicouche est le même pour l'adsorption de six bicouches (figure 4.31B), traduisant la reproductibilité des étapes de l'autoassemblage.

En relevant les sauts de fréquence et de dissipation d'énergie sur les paliers de tampon TRIS, nous avons pu construire les graphes de la figure 4.32, qui montrent les évolutions de $\Delta F_x/x$ et de ΔD_x en fonction du nombre de bicouches.

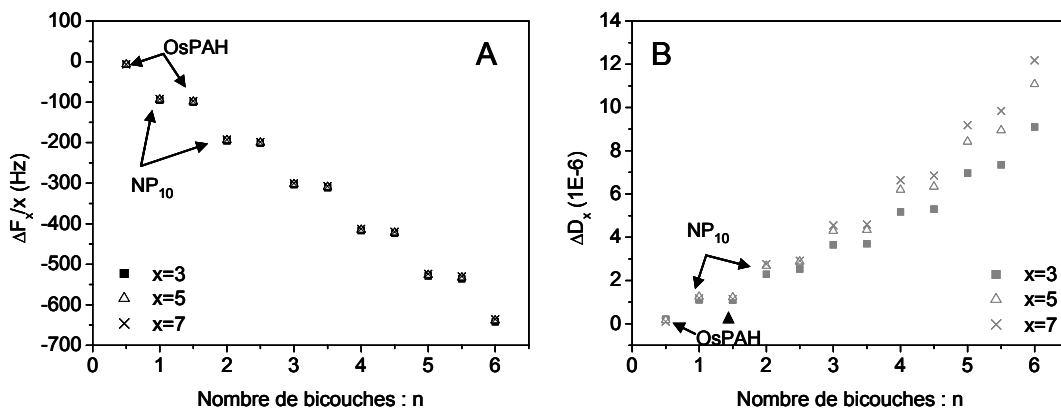


Figure n°4.32 : Evolutions de $\Delta F_x/x$ (A) et de ΔD_x (B) en fonction du nombre de bicouches, n , d'un assemblage (OsPAH/NP₁₀)_n, réalisé sur une surface Au/MPS. Pour n demi-entier, l'assemblage se termine par une couche d'OsPAH et pour n entier, par une couche de NP₁₀. Les valeurs des sauts de fréquence et de dissipation d'énergie sont relevées sur les paliers de tampon TRIS.

Les graphiques A et B de la figure 4.32 confirment les observations que nous avons pu faire par rapport aux mesures en temps réel. Le graphe A nous indique que la croissance

du film est linéaire. De plus, les sauts de fréquence sont identiques pour les différentes harmoniques. Ceci indique que le film construit est rigide. Ce résultat est confirmé par les valeurs de dissipations qui restent peu élevées, d'environ $11 \cdot 10^{-6}$, au bout de 6 bicouches. Ces valeurs ont été utilisées pour modéliser ce film et obtenir la masse surfacique adsorbée à chaque couche. Nous avons utilisé le modèle de Sauerbrey et le modèle viscoélastique (grâce au logiciel QTools) pour effectuer ces calculs. L'évolution de la masse surfacique en fonction de la couche adsorbée, est représentée sur la figure 4.33.

Comme on peut le constater, le modèle de Sauerbrey (courbe a de la figure 4.33) est en parfait accord avec le modèle viscoélastique (courbe b de la figure 4.33), plus complexe. Sachant que la relation de Sauerbrey n'est applicable que dans le cas d'un film rigide, ce résultat confirme que l'assemblage d'OsPAH et de NP₁₀, conduit à un matériau rigide, à croissance linéaire.

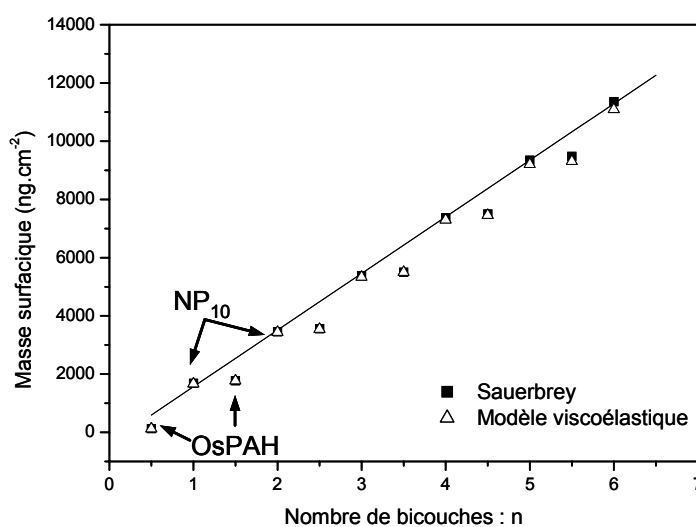


Figure n°4.33 :

Evolution de la masse surfacique, Γ , en fonction du nombre de couches bicouches, n , d'un assemblage $(OsPAH/NP_{10})_n$, réalisé sur une surface Au/MPS, obtenue par modélisation des valeurs mesurées de $\Delta F_n/n$ et de ΔD_n , présentées en figure 4.32, par le modèle de Sauerbrey (■) et par le modèle viscoélastique (△) (logiciel QTools). Pour n demi-entier, l'assemblage se termine par une couche d'OsPAH et pour n entier, par une couche de NP₁₀.

La contribution principale à l'augmentation de masse surfacique provient de l'étape d'adsorption des NP₁₀.

La pente de la droite de variation de masse surfacique en fonction du nombre de bicouches, n , est de 1945 ng.cm⁻². Nous avons aussi noté une croissance linéaire lors de l'étude de cet assemblage par spectroscopie UV-Visible, dont la quantité moyenne de NP₁₀ incorporée dans une bicouche (OsPAH/NP₁₀) avait été déterminée à $\Gamma_{NP10}=2,08.10^{11}$ particules.cm⁻².

Nous avons calculé, précédemment, la masse d'une nanoparticule d'or de 10 nm : 2,76.10⁻¹⁸ g. La masse d'une couche de NP₁₀ dans cet assemblage est donc de 574 ng.cm⁻² en moyenne. Ce type d'assemblage, dans les conditions d'adsorption utilisées, est donc constitué de 70% ((1-574/1945)x100) d'eau et d'anions. De plus, cette quantité d'eau et d'anions est rigidement associée aux couches constitutives de l'assemblage.

Etant donné que l'assemblage d'OsPAH et de NP₁₀ constitue un film rigide de croissance linéaire, on peut penser que ce film possède une certaine stratification, à la différence de films viscoélastiques de chitosane et d'enzyme, vus aux chapitres 2 et 3 de ce mémoire.

4.3.2.2.3 Etude électrochimique

Différentes mesures électrochimiques ont été réalisées sur ces autoassemblages en vue d'obtenir des informations sur les propriétés de tels films. Nous avons suivi la construction de l'assemblage couche par couche par voltampérométrie cyclique, dans du tampon TRIS 0,025 M à pH=7,5. Nous avons également évalué la réponse de différents assemblages vis-à-vis du catéchol et la perméabilité des films obtenus.

4.3.2.2.3.1 Suivi de la construction de l'autoassemblage

La présence d'un groupement redox rend possible le suivi par VC de l'autoassemblage entre l'OsPAH, à partir d'une solution à 0,75 mg.mL⁻¹ dans une solution de TRIS 0,025 M à pH=7,5, et les NP₁₀, à partir de la solution colloïdale commerciale.

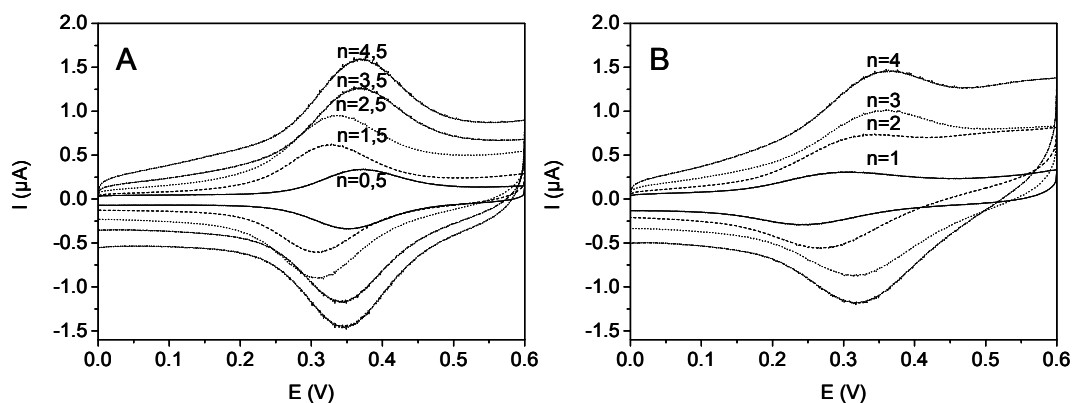


Figure n°4.34 : Courbes de VC ($0,1 \text{ Vs.}^{-1}$) d'une électrode Au/MPS/(OsPAH/NP₁₀)_n en fonction de n (0,5 à 4,5), enregistrées dans une solution électrolytique de TRIS 0,025 M à pH=7,5. Si n est demi-entier (A), les courbes correspondent à une électrode dont la dernière couche est une couche d'OsPAH et si n est entier (B), la dernière couche est constituée de NP₁₀.

La figure 4.34 présente l'évolution des voltampérogrammes obtenus en fonction du nombre de couches d'une électrode Au/MPS/(OsPAH/NP₁₀)_n et on peut remarquer que le courant faradique et le courant capacitif augmentent avec le nombre de couches, indiquant la croissance de l'assemblage.

A partir des courbes obtenues, il est possible de déterminer la quantité d'électricité nécessaire à l'oxydation de l'Os(II) en Os(III), par intégration de la surface du pic anodique. Cette quantité d'électricité est directement reliée à la quantité de sites redox électriquement connectés, Γ_{Os} , selon la relation (3). De plus, pour chaque électrode modifiée (pour n=0,5 à 3), nous avons fait varier la vitesse de balayage. On obtient une variation linéaire du courant anodique en fonction de la vitesse de balayage, jusqu'à 20 V.s^{-1} , ce qui signifie que les films construits ont un comportement en couche mince. La droite obtenue permet d'appliquer la relation (3) et de déterminer aussi Γ_{Os} . Ces études nous permettent de construire le graphe de la figure 4.35, qui décrit l'évolution de Γ_{Os} , calculé à partir des deux méthodes, en fonction du nombre de bicouches, n, d'un assemblage (OsPAH/NP₁₀)_n.

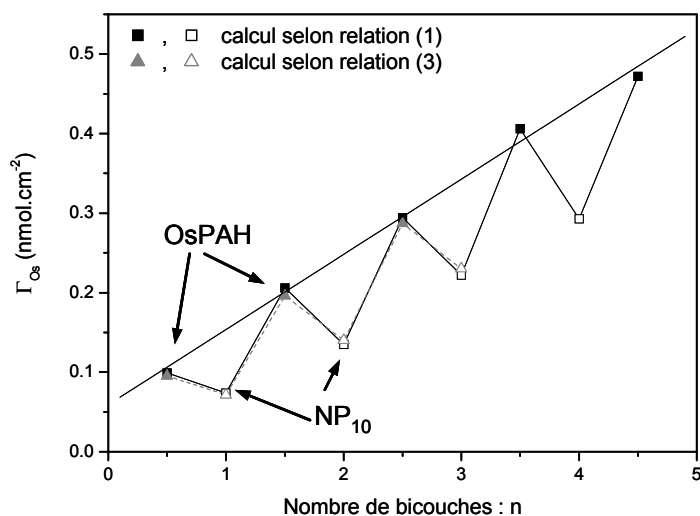


Figure n°4.35 : Evolution de la concentration surfacique en sites redox actifs, Γ_{Os} , pour une électrode modifiée de type $Au/MPS/(OsPAH/NP_{10})_n$, calculée selon les relations (1) (■) et (3) (▲), en fonction du nombre de bicouches, n . Pour n demi-entier (symbole fermé), la dernière couche est une couche d'OsPAH et pour n entier (symbole ouvert), une couche de NP_{10} termine l'assemblage.

La figure 4.35 nous montre que ces deux méthodes de calculs sont valables puisque les résultats sont en accord. On remarque que lorsque la dernière couche correspond à une couche d'OsPAH, Γ_{Os} est plus grande que quand la dernière couche est constituée de NP_{10} . Schlenoff et al³⁴ ont montré qu'il n'y a pas de désorption de PE lors de l'immersion du substrat modifié dans une solution contenant l'espèce de charge opposée. Cette diminution est sans doute due à un empêchement de l'oxydation des sites d'osmium. Il faut rappeler que, lors de l'oxydation de l'Os(II) en Os(III), un excès de charges positives se crée. Pour garder l'électroneutralité du film, des anions diffusent de la solution dans le film pour compenser l'excès de charge. Lorsque l'assemblage est terminé par une couche de NP_{10} , il comporte une surface négativement chargée. Donc, des répulsions électrostatiques entre ces anions et les NP_{10} , se créent et ralentissent la diffusion des anions compensant l'excès de charge produit lors de la réaction d'oxydation de l'osmium. L'électroneutralité dans le film est donc plus difficilement conservée. De ce fait, certains sites d'osmium ne pourront pas être oxydés pour éviter que l'excès de charge ne puisse être compensé. Comme, par électrochimie, on ne détecte que les sites redox électriquement connectés, la quantité de sites redox détectée est donc plus faible.

On remarque que la variation de la concentration surfacique avec le nombre de bicouches est linéaire et on peut déterminer une quantité moyenne d'osmium électroactif incorporé à chaque couche, $\Gamma_{Os}=9,46.10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$.

En comparant un assemblage $(PV_1/NP_{10})_n$ et un assemblage $(OsPAH/NP_{10})_n$, on remarque que l'augmentation de la quantité de sites redox actifs est 25% plus importante avec les sites osmium qu'avec les sites viologène ($\Gamma_{V2+}=7,55.10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$). Ce résultat peut être attribué à une meilleure communication électronique entre les sites d'osmium qu'entre les groupes viologènes dans les assemblages respectifs. On sait que le taux de substitution en complexe d'osmium dans le PAH est plus faible (5%) que celui du groupe viologène (30%). De plus, la quantité de NP_{10} incorporées dans ces assemblages est quasiment la même, donc, on peut s'attendre à ce que la distance entre deux couches de PE redox, séparées par une couche de NP_{10} , soit quasi identique dans ces deux types d'assemblages. Nous avons vu que les sites viologènes communiquaient très peu via les NP. On peut donc penser que dans le cas d'un assemblage $(OsPAH/NP_{10})_n$, les NP_{10} participent à la communication électronique entre les sites redox d'osmium des différentes couches.

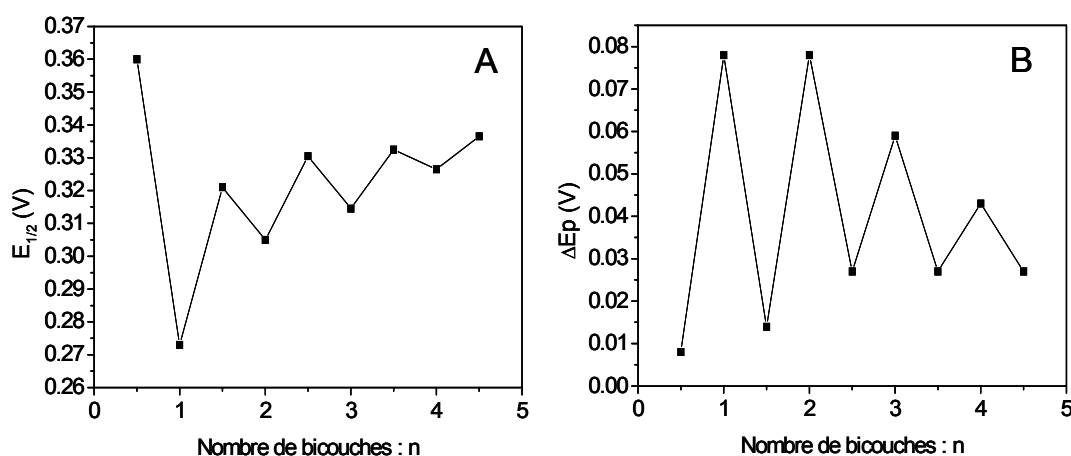


Figure n°4.36 : Evolution du potentiel de demi-vague, $E_{1/2}$, (A) et de la différence de potentiel, ΔE_p , (B), mesurés sur des courbes de VC ($0,1 \text{ V.s}^{-1}$) avec des électrodes modifiées $Au/MPS/(OsPAH/NP_{10})_n$ (présentées en figure 4.34), en fonction de n. Si n est demi-entier, la dernière couche est une couche d'OsPAH et si n est entier, la dernière couche est constituée de NP_{10} .

De plus, on peut noter, d'après la figure 4.36, que le potentiel de demi-vague, $E_{1/2}$, et la différence de potentiel, ΔE_p , varient en fonction de la nature de la dernière couche de l'assemblage étudié et aussi du nombre de couches autoassemblées, n . Si n est demi-entier, la dernière couche est une couche d'OsPAH et si n est entier, la dernière couche est constituée de NP_{10} .

La différence observée entre $E_{1/2}$ pour $n=0,5$ et $n=1$ (figure 4.36A) a été attribuée, par Calvo et al⁷, au phénomène de potentiel de membrane, selon le principe d'exclusion de Donnan. Puis, ce phénomène s'atténue avec l'augmentation du nombre de bicouches, n . Ceci peut s'expliquer par une interpénétration des couches d'OsPAH et de NP_{10} de plus en plus importante avec la croissance du film, résultat qui a été observé dans plusieurs travaux décrivant des assemblages de deux PE^{35,36}. L'interpénétration des couches de NP_{10} étant plus importante pour n plus grand, cela favorise la communication électronique entre les sites redox d'osmium, ce qui est vérifié par la diminution de la différence de ΔE_p entre n demi-entier et n entier (figure 4.36B).

De plus, le ΔE_p mesuré pour différentes bicouches (OsPAH/ NP_{10}) est plus faible que pour différentes bicouches (OsPAH/PSS⁻). Une couche de PSS⁻, malgré son épaisseur plus faible que celle d'une couche de NP_{10} , ralentit la communication électronique entre les sites redox d'osmium. Cette observation confirme que les nanoparticules jouent un rôle dans la communication électronique entre les sites d'osmium.

Nous avons également mesuré, à partir de voltampérogrammes comme ceux présentés sur la figure 4.34 à différentes vitesses de balayage, les courants capacitifs des électrodes modifiées, de type Au/MPS/(OsPAH/ NP_{10}) _{n} . La figure 4.37A présente la variation du courant capacitif, mesuré pour $n=1$, en fonction de la vitesse de balayage. Les mêmes mesures ont été réalisées pour différents nombres de bicouches, n , allant de 0,5 à 3.

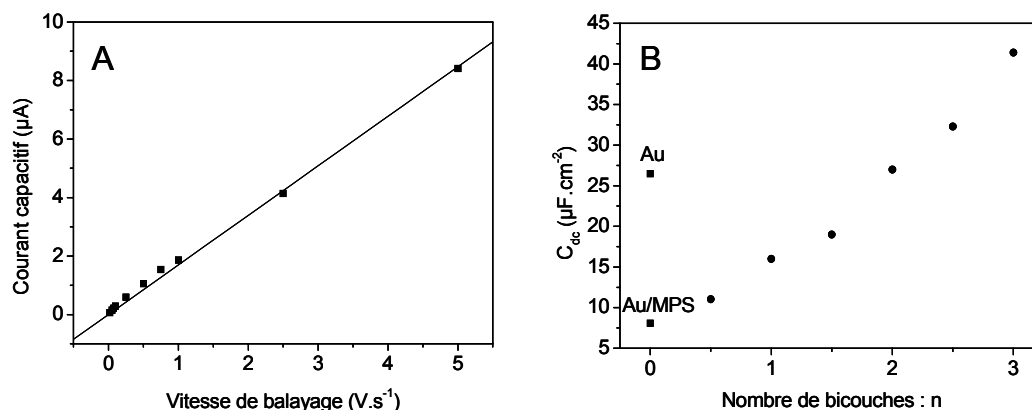


Figure n°4.37 : Evolution du courant capacitif, I_{cap} , mesuré sur des courbes de VC d'une électrode Au/MPS/(OsPAH/NP₁₀)₁, en fonction de la vitesse de balayage de potentiel, v , (A) et évolution de la capacité de double, C_{dc} , calculée selon la relation (5), en fonction du nombre de bicouches, n , d'une électrode modifiée de type Au/MPS/(OsPAH/NP₁₀)_n (B). Si n est demi-entier, la dernière couche est une couche d'OsPAH et si n est entier, la dernière couche est constituée de NP₁₀.

D'après la figure 4.37A, le courant capacitif, I_{cap} , varie linéairement avec la vitesse de balayage, v . Cela nous permet d'appliquer la relation (5), pour calculer la capacité de double couche à partir de la pente des droites obtenues pour différents nombres de bicouches, n .

$$I_{cap} = C_{dc} Av \quad (5)$$

Où A est la surface réelle de l'électrode.

La figure 4.37B présente l'augmentation de la capacité de double couche en fonction de l'électrode étudiée. On remarque que la contribution à l'augmentation de la capacité de double couche est plus importante avec l'ajout de NP₁₀. Murray et al³⁷ ont attribué l'augmentation du courant capacitif, lors de l'ajout de nanoparticules d'or, à un courant de charge de la double couche des nanoparticules métalliques présentes à la surface de l'électrode. Dans notre cas, le courant capacitif (ou la capacité de double couche) augmente avec le nombre de couches. Cela signifie que les NP₁₀, de différentes couches, communiquent entre elles et que les sites redox participent à cette communication.

On peut aussi noter que la capacité de double couche obtenue pour une électrode modifiée par deux bicouches (OsPAH/NP₁₀) est quasiment égale à celle obtenue sur une électrode d'or nu. Ceci nous amène à penser que le comportement électrochimique de

cette électrode modifiée peut être proche de celui de l'électrode d'or nu, vis-à-vis du transfert électronique du processus électrochimique d'une espèce redox en solution par exemple.

4.3.2.2.3.2 Comportement des films $(\text{OsPAH}/\text{NP}_{10})_n$ autoassemblés sur électrode d'or vis-à-vis du catéchol

Nous avons vu, dans le chapitre 3 de ce mémoire, qu'une monocouche de MPS, autoassemblée à la surface d'une électrode d'or, bloque le transfert électronique du processus électrochimique du système catéchol/orthoquinone. Nous avons décrit, dans le paragraphe précédent, une communication électronique entre les sites redox d'osmium et les nanoparticules d'or. Des mesures par voltampérométrie cyclique ont été réalisées sur des électrodes modifiées de type $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{OsPAH}/\text{NP}_{10})_n$, avec différentes valeurs de n (de 0,5 à 3) pour connaître le comportement de tels films vis-à-vis du catéchol en solution. La figure 4.38 présente les voltampérogrammes obtenus, lors de ces mesures, pour des électrodes Au , Au/MPS , $\text{Au}/\text{MPS}/\text{OsPAH}$, $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{OsPAH}/\text{NP}_{10})_1$ et $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{OsPAH}/\text{NP}_{10})_2$.

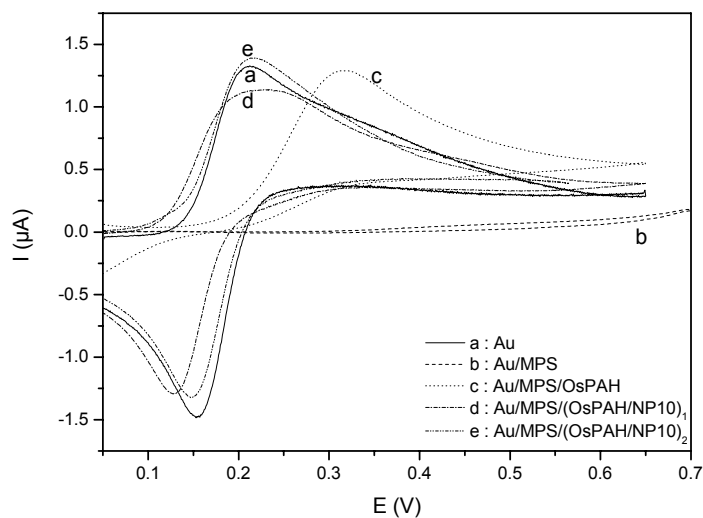


Figure n°4.38 :

Courbes de VC ($0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) enregistrées, auxquelles ont été soustraites le courant capacitif mesuré dans le tampon TRIS $0,025 \text{ M}$ à $\text{pH}=7,5$, sur des électrodes Au (a), Au/MPS (b), $\text{Au}/\text{MPS}/\text{OsPAH}$ (c), $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{OsPAH}/\text{NP}_{10})_1$ (d) et $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{OsPAH}/\text{NP}_{10})_2$ (e) dans le tampon TRIS $0,025 \text{ M}$ à $\text{pH}=7,5$ en présence de 10^{-4} M de catéchol

D'après la courbe c de la figure 4.38, lors de l'ajout d'une couche d'OsPAH, on retrouve un courant d'oxydation du catéchol. La différence de potentiel ΔE_p mesurée pour cette électrode modifiée indique que le transfert électronique est plus lent que sur électrode d'or nu. Cependant, le potentiel de demi-vague, $E_{1/2}$, reste le même. Le système redox catéchol/orthoquinone n'est pas encore réversible du fait de la grande valeur de ΔE_p mais aussi du fait que le rapport du courant anodique, i_{pa} , sur le courant cathodique, i_{pc} , est supérieur à 1. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les sites d'osmium exerce une activité catalytique vis-à-vis de l'oxydation du catéchol.

L'ajout d'une couche de NP_{10} (courbe d de la figure 4.38) améliore considérablement l'étape de transfert électronique du processus électrochimique du système catéchol/orthoquinone. On peut dire que les NP_{10} jouent un rôle de conducteur électronique entre la solution et la surface de l'électrode d'or. Le catéchol s'oxyde à la surface des NP_{10} , puis il y a communication électronique via les NP_{10} , jusqu'à la surface de l'électrode d'or. Le transfert électronique est encore amélioré avec deux bicouches de NP_{10} car le ΔE_p est plus faible et i_{pa} est plus élevé que pour une bicouche. D'ailleurs, on peut noter que la courbe de VC obtenue pour Au/MPS/(OsPAH/ NP_{10})₂ (courbe e de la figure 4.38) est quasiment identique à celle obtenue sur Au (courbe a de la figure 4.38). Ceci permet de dire que ces deux types d'électrodes ont un comportement quasi-identique, comme cela avait pu être prévu par les mesures de capacité de double couche.

4.3.2.2.3.3 Etudes de perméabilité

Ce type d'étude peut nous donner des informations sur la conduction électronique, si le transfert électronique a lieu à l'interface film/solution ou s'il existe une étape de type diffusionnel lors du processus électrochimique d'une espèce redox en solution. Nous avons utilisé une électrode d'or tournante avec laquelle nous avons mesuré le courant limite d'oxydation du ferrocène méthanol (FcMeOH) (sonde redox dont le système est monoélectronique à sphère externe, réversible et dont le transfert électronique n'est pas perturbé par la présence de la couche de MPS) en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode tournante. La figure 4.39A montre les courbes obtenues pour une électrode Au/MPS/(OsPAH/ NP_{10})₃ pour différentes vitesses de rotation.

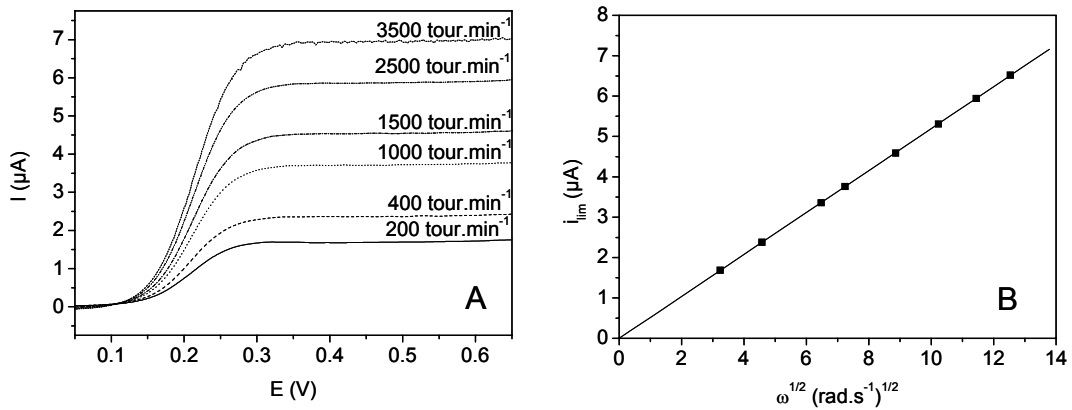


Figure n°4.39 : Courbes intensité-potential ($0,01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) tracées sur une électrode tournante Au/MPS/(OsPAH/NP₁₀)₃ pour différentes vitesses de rotation, enregistrées dans du tampon TRIS 0,025 M à pH=7,5, en présence de FcMeOH $4\cdot 10^{-4}$ M (A) et évolution du courant limite de diffusion i_{lim} , du FcMeOH à $4\cdot 10^{-4}$ M dans le tampon TRIS 0,025 M à pH=7,5, à 0,5 V, en fonction de la racine carrée de la vitesse de rotation, $\omega^{1/2}$, pour une électrode Au/MPS/(OsPAH/NP₁₀)₃ (B)

Le courant limite d'oxydation, i_{lim} , est mesuré sur le palier, à 0,5 V, d'après la figure 4.39A, pour différentes vitesses de rotation de l'électrode, ω . La figure 4.39B présente l'évolution de i_{lim} mesuré en fonction de la racine carrée de la vitesse de rotation, $\omega^{1/2}$. Le tracé de la courbe de Levich, $i_{\text{lim}}=f(\omega^{1/2})$, donne une droite. Cela signifie que le critère de Levich est respecté, c'est-à-dire que le processus électrochimique mis en jeu est uniquement limité par le transport de matière, la diffusion de l'espèce redox depuis la solution jusqu'à l'interface film/solution ou que le film est très perméable.

Nous avons montré qu'un autoassemblage électrostatique de polyélectrolyte redox et de nanoparticules d'or peut constituer une matrice conductrice électronique, en fonction du polyélectrolyte utilisé et des conditions d'adsorption du PE et des nanoparticules. Ces films conducteurs électroniques peuvent être utilisés comme transducteurs, en particulier pour des applications de biodétection.

4.4 Application à la transduction d'un processus électroenzymatique : Assemblage de polydiallyldiméthylammonium, de nanoparticules d'or et de polyphénol oxydase

Nous avons vu dans le premier paragraphe de ce chapitre qu'un film $(PDDA^+/NP_{10})_6$ constitue une matrice conductrice électronique. On utilisera donc cet assemblage comme sous-couche conductrice d'un film enzymatique à base de polydiallyldiméthylammonium et de polyphénol oxydase (PPO). Ces assemblages ont été caractérisés, du point de vue structural par spectroscopie UV-Visible et par microgravimétrie, et du point de vue des propriétés du biocapteur ainsi construit, par électrochimie.

4.4.1 Caractérisation structurale

4.4.1.1 Etude spectroscopique

Comme pour l'assemblage de $PDDA^+$ et de NP_{10} , nous avons suivi la construction du film enzymatique composé de $PDDA^+$ et de polyphénol oxydase, par spectroscopie UV-Visible. Les valeurs de l'absorbance à la longueur d'onde caractéristique de la PPO, à 278 nm, nous ont permis de calculer la concentration surfacique en PPO, Γ_{PPO} pour chaque couche, à partir de la relation (1) et avec $\epsilon_{278}=2,39 \text{ mL.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $M_{PPO}=128 \text{ kDa}$. La figure 4.40 représente l'évolution de l'absorbance à 278 nm et celle de Γ_{PPO} , en fonction du nombre de couches.

On remarque que Γ_{PPO} varie linéairement avec le nombre de couches de PPO. Ceci nous a permis de calculer une concentration surfacique moyenne par couche de PPO, de $3,49.10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$. De plus, on peut noter que, lors de l'adsorption d'une couche de $PDDA^+$, la concentration surfacique en PPO diminue, indiquant une désorption partielle de molécules de PPO. Ce résultat avait déjà été observé avec l'assemblage (CHI^+/PPO) décrit dans le chapitre 2 de ce mémoire.

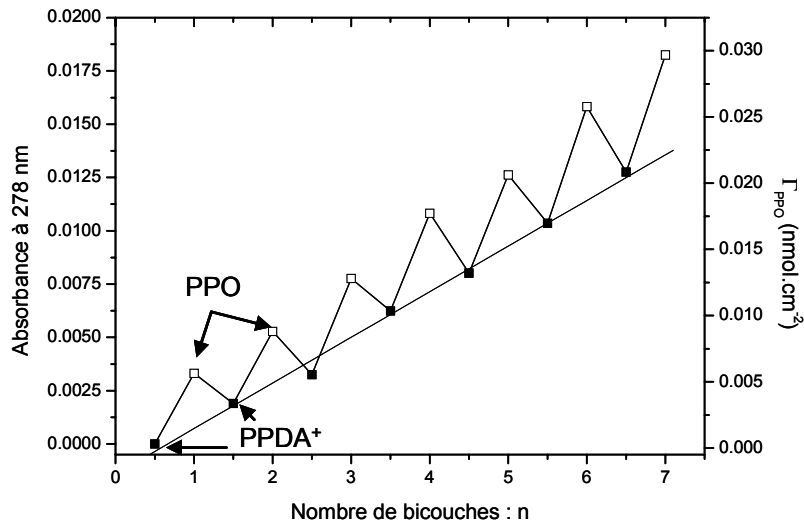


Figure n°4.40 : Evolution de l'absorbance mesurée à 278 nm (échelle de gauche) et de la concentration surfacique en PPO (échelle de droite) en fonction du nombre de bicouches, n , d'un film de $(PDDA^+/PPO)_n$ (réalisé par l'adsorption de $PDDA^+$ à partir d'une solution à 2 mg.mL^{-1} et de PPO à partir d'une solution à 1 mg.mL^{-1} dans le tampon TRIS $0,01 \text{ M}$ à $\text{pH}=6,3$) sur les parois d'une cuve de quartz. Pour n entier (\square), la couche externe est composée de PPO et si n est demi-entier (\blacksquare), la dernière couche correspond à une couche de $PDDA^+$.

4.4.1.2 Etude microgravimétrique

Des assemblages de $(PDDA^+/PPO)_n$ ont été construits sur un quartz recouvert d'or, modifié soit par une monocouche de MPS, soit par un assemblage $MPS/(PDDA^+/NP_{10})_6$ pour pouvoir suivre leur construction en temps réel par QCM-D. De la même façon que pour toutes les mesures qui ont été faites par QCM-D, nous avons suivi l'évolution de $\Delta F_x/x$ et ΔD_x en fonction du temps, pour $x=3, 5$ et 7 . Nous avons ensuite relevé les sauts de $\Delta F_x/x$ et de ΔD_x pour chaque couche adsorbée avant et après adsorption de chaque espèce, sur les paliers de tampon. La figure 4.41 montre l'évolution de $\Delta F_x/x$ (graphe A) et de ΔD_x (graphe B) en fonction du nombre de bicouches, n , sachant que si n est demi-entier, la dernière couche est une couche de $PDDA^+$ et que si n est entier, la couche externe est constituée de PPO.

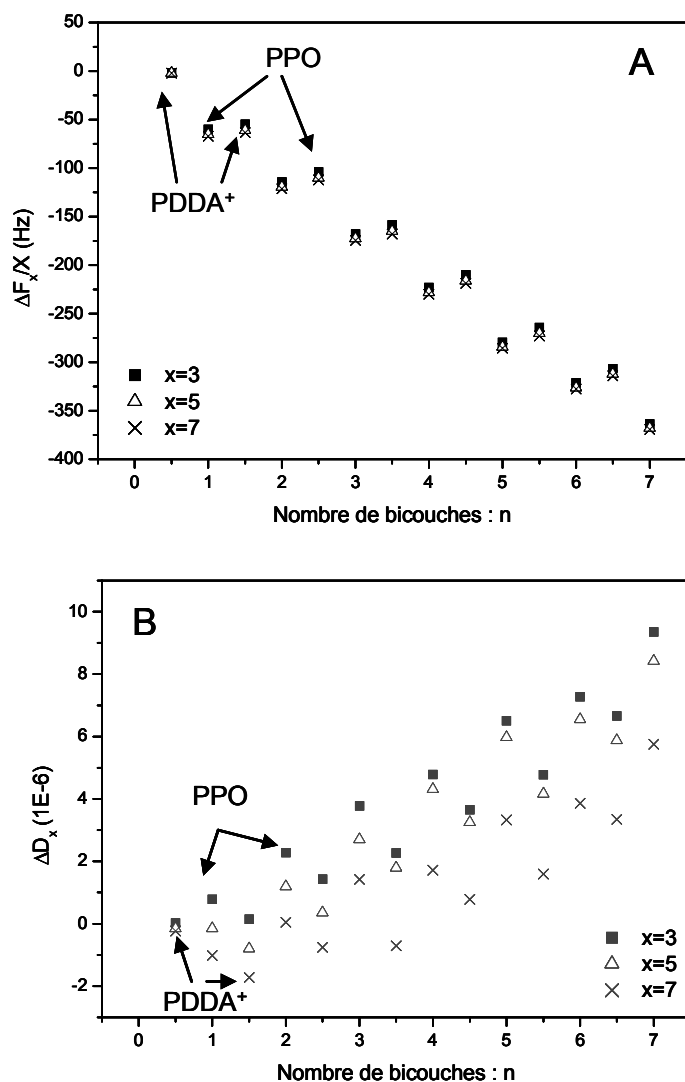


Figure n°4.41 :

Evolution de $\Delta F_x/x$ (A) et de ΔD_x (B), mesurés sur les paliers de tampon TRIS 0,01 M pH=6,3, en fonction du nombre de bicouches, n, d'un film de $(PDDA^+/PPO)_n$ (réalisé par l'adsorption de $PDDA^+$ à partir d'une solution à 2 mg.mL^{-1} et de PPO à partir d'une solution à 1 mg.mL^{-1} dans le tampon TRIS 0,01 M à pH=6,3) sur $Au/MPS/(PDDA^+/NP_{10})_6$ (construit dans les mêmes conditions qu'auparavant). Pour n demi-entier, la couche externe est une couche de $PDDA^+$ et si n est entier, une couche de PPO termine l'assemblage.

De même que pour $(PDDA^+/NP_{10})_6$, $\Delta F_x/x$ ne dépend pas de x pour les différentes couches de $(PDDA^+/PPO)$. De plus, les valeurs de dissipations restent peu élevées, de l'ordre de $8 \cdot 10^{-6}$ environ pour 7 bicouches. Ceci nous informe de la rigidité de l'assemblage $(PDDA^+/PPO)_7$. Les mêmes observations ont pu être faites pour ce même assemblage mais construit directement sur Au/MPS .

Les valeurs de la figure 4.41 ont été modélisées par le modèle viscoélastique. Ainsi, nous avons pu déterminer la masse surfacique des films $(PDDA^+/PPO)_n$ en fonction du nombre de bicouches, n , dont l'évolution est représentée par la figure 4.42.

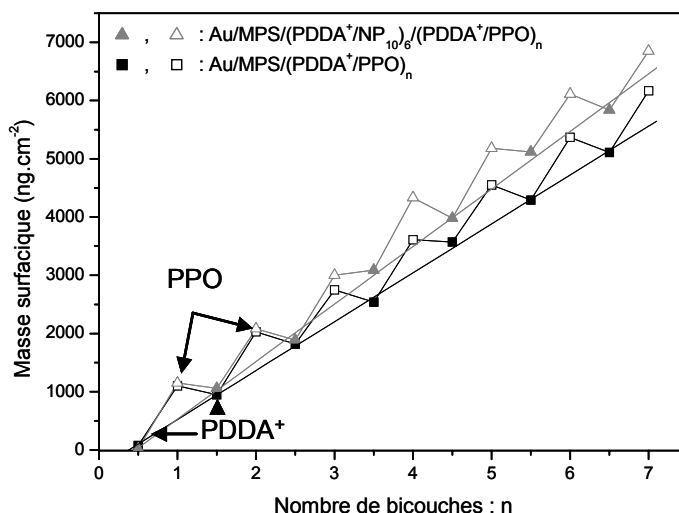


Figure n°4.42 : Evolution de la masse surfacique d'un film $(PDDA^+/PPO)_n$ en fonction de n , assemblé sur $Au/MPS/(PDDA^+/NP_{10})_6$ (▲) ou sur Au/MPS (■), obtenue par modélisation des valeurs de $\Delta F_x/x$ et de ΔD_x mesurées (figure 4.41). Pour n demi-entier (symbole fermé), la couche externe est une couche de $PDDA^+$ et si n est entier (symbole ouvert), une couche de PPO termine l'assemblage.

La contribution principale à l'augmentation de la masse surfacique est due à l'adsorption de PPO. Lors de l'ajout d'une couche de $PDDA^+$ (pour $n > 1$), la masse surfacique diminue, indiquant que des molécules de PPO se désorbent, phénomène que nous avons observé lors de l'étude spectroscopique. On peut aussi noter que la masse surfacique varie linéairement avec le nombre de couches de PPO, dans les deux cas. Cela nous a permis de calculer une masse surfacique moyenne par couche de PPO.

Si le film $(PDDA^+/PPO)_7$ est adsorbé directement sur Au/MPS , une quantité moyenne par couche de PPO a été calculée $\Gamma_{PPO} = 840 \text{ ng.cm}^{-2}$. Connaissant la quantité de PPO adsorbée par spectroscopie UV-Visible (529 ng.cm^{-2}), nous en avons déduit que le pourcentage d'eau et d'ions, incorporés à chaque adsorption de PPO, est de 37% $((1 - 529/840) \times 100)$. Or nous avons calculé que, dans un assemblage de (CHI^+/PPO) , ce pourcentage d'eau était de 88%. Ce résultat montre bien que le CHI^+ est beaucoup plus hydrophile que le $PDDA^+$ et explique qu'un assemblage $(PDDA^+/PPO)_n$ est rigide alors

qu'un assemblage $(\text{CHI}^+/\text{PPO})_n$ est viscoélastique à cause de la grande quantité d'eau présente.

Si l'assemblage $(\text{PDDA}^+/\text{PPO})_7$ est adsorbé sur une sous-couche $(\text{PDDA}^+/\text{NP}_{10})_6$, $\Gamma_{\text{PPO}}=988 \text{ ng.cm}^{-2}$ par couche. La différence entre les deux cas n'est pas très significative mais peut venir du fait que la rugosité de Au/MPS est plus faible que celle de la sous-couche contenant les NP_{10} , ce qui induit l'adsorption d'une quantité plus faible de la première couche PDDA^+ du film enzymatique et par conséquent de celles des couches suivantes des deux espèces assemblées.

Ces résultats nous montrent que la quantité de PPO adsorbée par couche est très peu différente si l'assemblage est adsorbée sur une sous-couche constituée de nanoparticules ou directement sur une monocouche de MPS.

4.4.2 Sensibilité des bioélectrodes construites vis-à-vis du catéchol

Quelques tests préliminaires ont été effectués dans l'objectif de connaître l'activité enzymatique des bioélectrodes réalisées à partir d'autoassemblages de PDDA^+ , de NP_{10} et de PPO. Pour cela, nous avons mesuré la réponse ampérométrique de ces bioélectrodes vis-à-vis du catéchol en solution, pour déterminer la sensibilité de la bioélectrode. Les conditions de mesure de la sensibilité d'un biocapteur à base de PPO ont été détaillées dans le chapitre 2 de ce mémoire.

Nous avons vu que six bicouches de $(\text{PDDA}^+/\text{NP}_{10})$ sont nécessaires pour obtenir un transfert d'électrons rapide du processus électrochimique mis en jeu dans le système catéchol/orthoquinone. L'oxydation du catéchol a lieu à la surface des NP_{10} puis il y a communication électronique (facilitée par l'augmentation de la quantité de NP_{10} adsorbées) entre les NP_{10} jusqu'à la surface de l'électrode.

Sur une surface d'électrode tournante, nous avons construit des électrodes $\text{Au/MPS}/(\text{PDDA}^+/\text{PPO})_n$ et $\text{Au/MPS}/(\text{PDDA}^+/\text{NP}_{10})_6/(\text{PDDA}^+/\text{PPO})_n$, dont la sensibilité a été mesurée.

Puis les courants mesurés ont été traités selon le modèle développé au chapitre 2 et adapté à ce système.

La figure 4.43 présente l'évolution de la sensibilité, S , mesurée pour un film enzymatique constitué de 5 bicouches de $(PDDA^+/PPO)$, adsorbé sur Au/MPS et sur Au/MPS/ $(PDDA^+/NP_{10})_6$, en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode.

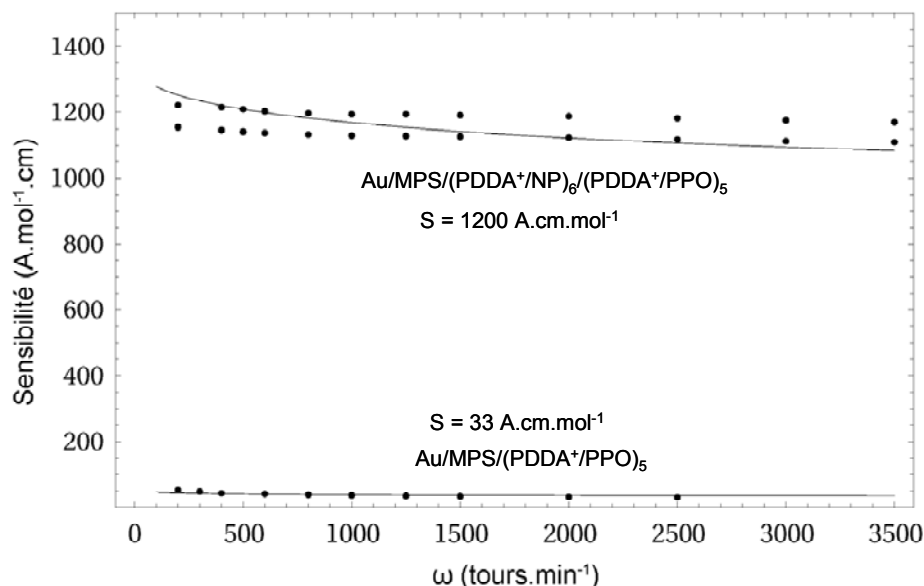


Figure n°4.43 : Evolution de la sensibilité, S , mesurée pour un film enzymatique constitué de $(PDDA^+/PPO)_5$, adsorbé sur Au/MPS et sur Au/MPS/ $(PDDA^+/NP_{10})_6$, en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode, ω . Les valeurs expérimentales correspondent aux points alors que les valeurs théoriques déterminées, selon le modèle développé dans le chapitre 2 et adapté au système étudié, correspondent aux courbes continues.

La première remarque que l'on peut faire est que les points expérimentaux sont en bon accord avec les valeurs théoriques, obtenues à partir de l'ajustement paramétrique du modèle. Ce sont les résultats d'un test préliminaire mais il faut noter qu'ils sont encourageants. En effet, la sous-couche conductrice électronique composée de NP_{10} améliore considérablement l'étape de transduction du biocapteur puisque la sensibilité mesurée est améliorée d'un facteur 40, comme le montre la figure 4.45. Pour déterminer tous les paramètres cinétiques de tels films, les études cinétiques doivent être complétées pour comprendre le transfert électronique au sein de ces films.

4.5 Conclusion chapitre

Il a été démontré par les études décrites dans ce chapitre que la nature du polyélectrolyte redox utilisé a une influence sur le processus de transfert électronique au sein des assemblages. En effet, nous avons montré que la communication électronique a lieu entre les nanoparticules d'or par l'intermédiaire de sites redox. Dans le cas du viologène, le transfert électronique se fait uniquement par saut d'électrons entre les sites redox car la longueur de la chaîne du groupe viologène greffé, réduit la distance entre deux couches de polyviologène, séparées par une couche de nanoparticules d'or. Cependant, en remplaçant le groupement viologène par un complexe bipyridinique d'osmium sur la chaîne polymère du polyallylamine, nous avons remarqué que les nanoparticules et les sites redox communiquent entre eux par saut d'électrons. Ces études ont permis de démontrer que des autoassemblages avec des nanoparticules d'or constituent une matrice conductrice électronique.

Si le PE ne contient pas de sites redox actifs dans sa chaîne polymère, la communication électronique entre les NP₁₀ devient plus difficile et il est nécessaire d'avoir un plus grand nombre de bicouches (PE/NP₁₀) pour obtenir une matrice conductrice électronique.

Cette matrice a ensuite été utilisée comme sous-couche d'une bioélectrode enzymatique, améliorant l'étape de transduction d'un tel biocapteur ampérométrique. Les résultats obtenus sont très prometteurs pour la réalisation de biocapteurs à usage unique, en construisant ces assemblages sur un support isolant.

Références Chapitre 4

- [1] Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, K.; Bartlett, P. N. *Langmuir* **1997**, *13*, 2708-2716.
- [2] Sun, Y.; Sun, J.; Zhang, X.; Sun, C.; Wang, Y.; Shen, J. *Thin Solid Films* **1998**, *327-329*, 730-733.
- [3] Sirkar, K.; Revzin, A.; Pishko, M. V. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2930-2936.
- [4] Forzani, E. S.; Otero, M.; Perez, M. A.; Teijelo, M. L.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 4020-4029.
- [5] Forzani, E. S.; Perez, M. A.; Teijelo, M. L.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 9867-9873.
- [6] Stepp, J.; Schlenoff, J. B. *J. Electrochem. Soc.* **1997**, *144*, L155-L157.
- [7] Calvo, E. J.; Wolosiuk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8490-8497.
- [8] Liu, A.; Anzai, J. *Langmuir* **2003**, *19*, 4043-4046.
- [9] Liu, A.; Anzai, J.-i. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 98-103.
- [10] Liu, A.; Kashiwagi, Y.; Anzai, J.-i. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1139-1142.
- [11] Hempenius, M. A.; Peter, M.; Robins, N. S.; Kooij, E. S.; Vancso, G. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 7629-7634.
- [12] Calvo, E. J.; Danilowicz, C.; Lagier, C. M.; Manrique, J.; Otero, M. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1219-1228.
- [13] Tognalli, N.; Fainstein, A.; Bonazzola, C.; Calvo, E. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 1905-1911.
- [14] Sun, J. Q.; Sun, Y. P.; Zou, S.; Zhang, X.; Sun, C. Q.; Wang, Y.; Shen, J. C. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 840-844.
- [15] Bonazzola, C.; Calvo, E. J.; Nart, F. C. *Langmuir* **2003**, *19*, 5279-5286.
- [16] Pishko, M. V.; Revzin, A.; Simonian, A. L. *Sensors* **2002**, *2*, 79-90.
- [17] Zotti, G.; Zecchin, S.; Vercelli, B.; Berlin, A.; Grimoldi, S.; Bertoncetto, R.; Milanese, L. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *580*, 330-339.
- [18] DeLongchamp, D. M.; Kastantin, M.; Hammond, P. T. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1575-1586.
- [19] Schlenoff, J. B.; Laurent, D.; Ly, H.; Stepp, J. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)* **1998**, *10*, 347-349.

- [20] Slot, J. W.; Geuze, H. J. *Eur. J. Cell Biol.*, **38**, 87-93.
- [21] Mulvaney, P. *Langmuir* **1996**, *12*, 788-800.
- [22] Liao, J.; Zhang, Y.; Yu, W.; Xu, L.; Ge, C.; Liu, J.; Gu, N. *Colloid Surface A* **2003**, *223*, 177-183.
- [23] Decher, G.; Schlenoff, J. B. *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, 2003.
- [24] Ostrander, J. W.; Mamedov, A. A.; Kotov, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1101-1110.
- [25] Ferreyra, N. F.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P.; Calvo, E. J.; Solis, V. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 3864-3874.
- [26] Factor, A.; Heinsohn, G. E. In *Polymers Letters*; Sons, J. W., Ed., 1971; Vol. 9, pp 289-295.
- [27] Liu, Y.; Wang, Y.; Claus, R. O. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *298*, 315-319.
- [28] Gregg, B. A.; Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5976-5980.
- [29] Gregg, B. A.; Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5970-5975.
- [30] Kober, E. M.; Caspar, J. V.; Sullivan, B. P.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 4587-4598.
- [31] Danilowicz, C.; Corton, E.; Battaglini, F. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *445*, 89-94.
- [32] Lay, P. A.; Sargeson, A. M.; Taube, H. *Inorg. Synth.* **1986**, *24*, 291-299.
- [33] McAloney, R. A.; Sinyor, M.; Dudnik, V.; Goh, M. C. *Langmuir* **2001**, *17*, 6655-6663.
- [34] Schlenoff, J. B.; Ly, H.; Li, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7626-7634.
- [35] Schmitt, J.; Gruenewald, T.; Decher, G.; Pershan, P. S.; Kjaer, K.; Loesche, M. *Macromolecules* **1993**, *26*, 7058-7063.
- [36] Tarabia, M.; Hong, H.; Davidov, D.; Kirstein, S.; Steitz, R.; Neumann, R.; Avny, Y. *J. Appl. Phys.* **1998**, *83*, 725-732.
- [37] Hicks, J. F.; Young, S.-S.; Murray, R. W. *Langmuir* **2002**, *18*, 2288-2294.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Ce travail de thèse est basé sur la modification de surfaces de carbone vitreux et d'or par la technique d'autoassemblage électrostatique couche par couche et leur caractérisation physico-chimique. Ces films sont constitués de polyelectrolytes redox ou non, d'enzymes et de nanoparticules d'or.

L'électrochimie est un outil particulièrement bien adapté à la caractérisation de ces films. En effet, l'utilisation de plusieurs méthodes électrochimiques permet de quantifier les processus de transfert d'électrons au sein de ces films. Elle permet aussi d'étudier la cinétique électroenzymatique d'une bioélectrode. De plus, si le film est construit à partir d'un polyelectrolyte contenant un groupement redox, il est possible de suivre la croissance des couches de l'autoassemblage.

La sous-couche d'ancrage de l'assemblage électrostatique joue un rôle prépondérant dans la structure et les propriétés finales du matériau. En effet, la nature et la structure de la monocouche anionique peut influencer les propriétés de la surface d'électrode. Nous avons vu, par exemple, qu'une monocouche de 3-mercaptopropanesulfonate (MPS) autoassemblée sur une surface d'électrode d'or bloque le transfert d'électrons vis-à-vis du processus électrochimique du système catéchol/orthoquinone.

Nous avons montré que la modification d'une électrode de carbone vitreux par une monocouche immunologique, négativement chargée, permet de construire un autoassemblage électrostatique sans perturber les propriétés de la surface de l'électrode de carbone vitreux. Cette sous-couche a servi de plateforme pour les films constitués de chitosane quaternisé et de polyphénol oxydase. Ces assemblages ont été caractérisés du point de vue structural par spectroscopie UV-Visible et par QCM-D et par électrochimie pour déterminer les propriétés électroenzymatiques des films obtenus. Ces études ont montré que le chitosane, utilisé comme polycation dans l'assemblage de la PPO, permet d'obtenir un biocapteur au catéchol stable et d'une grande sensibilité. Ce résultat a été interprété par le fait que le chitosane favorise l'accessibilité des sites actifs de l'enzyme. De telles bioélectrodes ont été modélisées sur la base du processus électroenzymatique PPO – catéchol. L'influence du transport de masse et du transfert électronique sur la réponse de la bioélectrode a été démontrée. Les résultats expérimentaux sont en

excellent accord avec la théorie. Ceci nous a permis d'extraire les paramètres cinétiques, comme la perméabilité et l'activité enzymatique du film.

Pour pouvoir mieux contrôler la surface de l'électrode, nous avons ensuite travaillé avec des surfaces d'électrodes d'or. Ce type d'électrode a été modifié par une monocouche autoassemblée de 3-mercaptopropanesulfonate. Cette plateforme négative a fait l'objet d'une étude cinétique et structurale complète. En effet, la présence de thiol a une influence sur les propriétés de la surface vis-à-vis du transfert électronique. Nous avons remarqué que les molécules de MPS s'assemblent de façon non dense mais recouvrent la quasi-totalité de la surface car nous avons obtenu un taux de recouvrement proche de 100%. Cette valeur indique que peu de défauts sont présents à la surface et que ces défauts ont une taille inférieure à la taille moléculaire des espèces redox dont nous avons étudié le processus électrochimique sur ce type de surface. Cette monocouche de MPS est perméable aux cations mais agit comme une barrière cinétique vis-à-vis du transfert d'électrons pour des sondes redox neutres et anioniques. Dans le cas du catéchol, pour lequel le processus électrochimique implique l'échange de deux électrons et de deux protons, le transfert électronique est complètement bloqué. Nous avons montré que la perméation d'espèces neutres et anioniques n'est pas possible à travers la monocouche de MPS et que le transfert électronique a lieu par effet tunnel. Etant donné que l'électrochimie du catéchol est fortement ralentie, un assemblage direct à base de PPO sur ce type de film ne peut constituer un biocapteur performant. Mais comme le transfert électronique du ferrocène méthanol est très peu perturbé par la présence de MPS, nous avons utilisé cette sonde redox en solution comme médiateur dans la réaction enzymatique de la glucose oxydase, assemblée avec le chitosane quaternisé. La caractérisation de tels films a démontré un mode de croissance linéaire. Nous avons également montré que l'on peut obtenir un biocapteur d'une sensibilité très élevée sur une électrode d'or modifiée par une monocouche de MPS.

Nous avons ensuite construit des assemblages à base de nanoparticules d'or (NP) sur cette surface d'or ainsi modifiée. Ces NP ont été assemblées avec le polydiallyldiméthylammonium et nous avons noté que six bicouches étaient nécessaires pour constituer une matrice conductrice électronique et pour améliorer le transfert électronique dans le cas du catéchol. Grâce à cette propriété, nous avons construit un biocapteur à base de PPO sur cette sous-couche de nanoparticules. Ceci nous a permis d'obtenir une sensibilité particulièrement améliorée.

Puis, nous avons remarqué que l'utilisation de polyélectrolytes contenant une sonde redox sur leur chaîne polymère, pouvait influencer le processus de transfert électronique. Nous avons montré que l'on peut obtenir des informations structurales complémentaires grâce à l'utilisation de trois techniques indépendantes : la spectroscopie UV-Visible, la QCM-D et l'électrochimie. En particulier, il a été noté que ces films ont une croissance linéaire en fonction du nombre de couches. Il a aussi été remarqué que, selon le motif redox, le transfert électronique au sein des films pouvait impliquer les nanoparticules d'or. De plus, un nombre plus petit de bicouches de PRedox/NP est nécessaire à la réalisation d'une matrice conductrice électronique, malgré une densité de nanoparticules plus faible dans le cas où un motif redox est présent.

Nous avons également remarqué que tous les films que nous avons caractérisés contiennent une grande proportion d'eau et d'anions intégrés lors de l'assemblage. Dans le cas des films de chitosane et d'enzymes, les films obtenus sont viscoélastiques et possèdent un taux d'hydratation proche des films rigides contenant les nanoparticules. Ce résultat surprenant pourrait être mis à profit pour la réalisation de matériaux dont on modulerait les propriétés de conduction et de perméabilité à façon, pour l'application visée.

La combinaison de tous les résultats obtenus (ayant d'ailleurs fait l'objet de publications) dans ce travail original s'avère prometteuse quant à la fabrication de nouveaux transducteurs. Il sera possible de construire des assemblages contenant une sous-couche conductrice électronique sur des supports isolants. Ceci permettrait, par exemple, la réalisation de biocapteurs performants à usage unique.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale :

P.1 : Modes opératoires des synthèses de polyélectrolytes redox

P.1.1 : Polyviologène PV₁

(schéma 4.1 page 133)

P.1.1.1 : Synthèse du composé a_v

7 g de 4,4'-bipyridine sont dissous dans 45 mL de dibromo-1,4-éthane. Le mélange est mis sous agitation magnétique, pendant 4 heures, à la température de 86°C. On laisse refroidir à température ambiante pendant 1 heure. Ce produit brut est filtré par de l'éthanol bouillant pour dissoudre notre composé a_v. On ajoute de l'éther au filtrat, ce qui forme un précipité jaune, que l'on filtre et que l'on lave à l'éther.

Caractérisation par spectrométrie RMN ¹H (250 MHz) dans CD₃OD :

δ(ppm)=8,75 (4d, 8H, H_{bpy}) ; δ(ppm)=5,15 (t, 2H, H_{CH₂N}) ; δ(ppm)=4,1 (t, 2H, H_{CH₂Br})

Cette caractérisation nous a permis de déterminer un rendement de 31 % (car le produit a_v contient environ 7 molécules d'eau)

P.1.1.2 : Synthèse du composé b_v

6,5 g de a_v sont dissous dans 10 mL (excès) de CH₃I et 60 mL de DMF et chauffés (T=76°C) sous agitation magnétique, pendant 70 heures. On laisse ensuite refroidir à température ambiante. On filtre et lave par de l'éther le précipité rouge-orange. Le composé b_v est obtenu avec un rendement de 73 %.

Caractérisation par RMN ¹H (250 MHz) dans CD₃OD :

δ(ppm)=8,85 (2dd, 8H, H_{bpy}) ; δ(ppm)=5,1 (t, 2H, H_{CH₂N}) ; δ(ppm)=4,5 (s, 3H, H_{CH₃}) ; δ(ppm)=3,85 (t, 2H, H_{CH₂Br})

P.1.1.3 : Synthèse du composé c_v

Les ions I^- sont échangés par des ions BF_4^- .

Le composé b_v est dissous dans de l'eau puis passe sur une résine préalablement traitée par HBF_4 pour réaliser cet échange d'ion. Le solvant est évaporé pour récupérer le composé c avec un rendement de 60 %.

Caractérisation par RMN 1H (250 MHz) dans CD_3OD :

$\delta(\text{ppm})=9,05$ (2dd, 8H, H_{bpy}) ; $\delta(\text{ppm})=5,45$ (t, 2H, $H_{\text{CH}_2\text{N}}$) ; $\delta(\text{ppm})=4,45$ (s, 3H, H_{CH_3}) ;
 $\delta(\text{ppm})=3,85$ (t, 2H, $H_{\text{CH}_2\text{Br}}$)

P.1.1.4 : Synthèse de PV_1

2,1576 g (10 équivalents) de c_v sont mélangés à 50 mg de polyvinylpyridine. Ce mélange est ensuite dissout dans 10 mL de DMF et mis à chauffer à 80°C pendant 64 heures.

Le polymère précipite en y ajoutant goutte-à-goutte de l'acétone. Le précipité obtenu est filtré et lavé à l'acétone. Puis, il est redissous dans de l'eau pour être dialysé, puis lyophilisé.

La caractérisation de ce polymère en solution dans le DMSO D_6 par spectrométrie RMN 1H (voir figure n°4.11 page 134) nous donne le pourcentage de substitution, qui est de 30 %.

P.1.2 : Polyviologène PV_2

(schéma 4.2 page 137)

1 g de 4,4'-bipyridine et 1,7 g de dibromoxylène sont dissous dans 75 mL d'acétonitrile.

Le mélange est agité pendant 18 heures à température ambiante.

Le précipité jaune orangé obtenu est ensuite filtré, puis redissous par du méthanol. Il est ensuite reprécipité à l'éther. Le précipité jaune floconneux est lavé par de l'éther et de l'acétonitrile. Ce polymère est ensuite ultrafiltré sur une membrane de cellulose dont le seuil de coupure est de 1000, puis lyophilisé. Un solide jaune hygroscopique et photosensible est récupéré.

Pour ne garder que les chaînes polymères de masses importantes, la solution est dialysée avec une membrane d'un seuil de coupure de 12000-14000, puis de nouveau lyophilisé. Ceci a donné un solide verdâtre.

La caractérisation par RMN ^1H a été réalisée dans D_2O et est présentée sur la figure n°4.14 page 138.

P1.3 : Complexes d'osmium

(schéma 4.3 page 146)

P.1.3.1 : Synthèse du ligand pyridine-4-acétal

On mélange 0,9 mL de pyridine 4-aldéhyde (soit 10^{-3} mol) avec 0,73 mL d'éthylène glycol (soit $13 \cdot 10^{-3}$ mol) dans 100 mL de toluène contenant 200 mg d'acide *p*-toluène sulfonique. Ce mélange est porté à reflux à l'aide d'un montage Dean-Stark pendant 4 heures. Puis, le solvant est évaporé. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice en utilisant un mélange chloroforme - méthanol 100:4 comme éluant. Ce ligand a été obtenu avec un rendement de 47 %.

Caractérisation par RMN ^1H (250 MHz) dans CDCl_3 :

$\delta(\text{ppm})=8,6$ (d, 2H, $\text{H}_{\beta\text{Npy}}$) ; $\delta(\text{ppm})=7,3$ (d, 2H, $\text{H}_{\alpha\text{Npy}}$) ; $\delta(\text{ppm})=5,75$ (s, 1H, H_{CO_2}) ; $\delta(\text{ppm})=4$ (t, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{O}}$)

P.1.3.2 : Formation du complexe b

Un mélange de 1 g de K_2OsCl_6 et de 0,72 g de 2,2'-bipyridine (soit 2 équivalents) dans 50 mL d'éthylène glycol est chauffé à reflux pendant 45 minutes sous azote. Après avoir refroidi à température ambiante, les quelques cristaux de KCl qui se sont formés sont éliminés par filtration. Un volume identique d'une solution aqueuse saturée de dithionite de sodium est ajoutée au mélange réactionnel pour réduire l'Os(III) en Os(II). Un précipité pourpre se forme lors du refroidissement dans un bain de glace. Ce solide est filtré et lavé à l'eau pour éliminer les espèces ioniques restantes puis à l'éther. Cette réaction a donné lieu à un rendement de 60%.

Caractérisation par RMN ^1H (250 MHz) dans DMSO deutéré :

$\delta(\text{ppm})=9,5$ (m, 2H, H_{bpy}) ; $\delta(\text{ppm})=8,5$ (m, 4H, H_{bpy}) ; $\delta(\text{ppm})=7,6$ (m, 4H, H_{bpy}) ;
 $\delta(\text{ppm})=7,1$ (m, 4H, H_{bpy}) ; $\delta(\text{ppm})=6,6$ (m, 2H, H_{bpy})

Caractérisation par spectroscopie UV-Visible : voir tableau 4.2 page 148.

Caractérisation par spectrométrie de masse (electrospray) :

$M^+=573,9$ g.mol $^{-1}$ pour une masse calculée de 573,58 g.mol $^{-1}$.

P.1.3.3 : Formation du complexe c

Dans 20 mL de mélange eau/éthanol 1:1, on mélange 150 mg de complexe d'osmium **b** (soit $2,4 \cdot 10^{-4}$ mol) avec 600 mg de pyridine-4-acétal (soit $4 \cdot 10^{-3}$ mol, ou 16 équivalents). Ce mélange est porté à reflux pendant 9 heures, sous azote. Cet échange de ligand est suivi par spectroscopie UV-Visible. Au bout de 9 heures de réaction, on laisse refroidir à température ambiante, et on filtre ensuite l'excès de ligand sur fritté. Le solvant est évaporé à sec et le produit brut est ensuite purifié par chromatographie sur alumine neutre, avec un mélange éluant acétonitrile/méthanol 2:1. Le complexe **c** est précipité à l'éther, ce qui nous donne un produit pur avec un rendement de 93 %.

Caractérisation par RMN ^1H (250 MHz) dans DMSO D6 :

$\delta(\text{ppm})=9,6$ (m, 1H, H_{bpy}) ; $\delta(\text{ppm})=7,9$ (m, 19H, $\text{H}_{\text{bpy+py}}$) ; $\delta(\text{ppm})=5,4$ (s, 1H, H_{CO_2}) ;
 $\delta(\text{ppm})=3,9$ (t, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{O}}$)

Caractérisation par spectroscopie UV-Visible : voir tableau 4.2 page 148.

Caractérisation par spectrométrie de masse (electrospray) :

$(\text{M-Cl})^+=690$ g.mol $^{-1}$ pour une masse calculée de 690,13 g.mol $^{-1}$.

P.1.3.4 : Formation du complexe d

Pour passer de la forme acétal à aldéhyde, on dissout 100 mg de complexe **c** dans 17 mL d'une solution aqueuse de HCl 1M. Ce mélange est chauffé à 55°C pendant une heure. L'avancement de la réaction est suivi par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

On laisse ensuite le mélange refroidir à température ambiante pour pouvoir neutraliser l'excès d'acide par une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . Le produit est extrait au chloroforme, puis concentré, précipité à l'éther. On obtient le complexe **d** sous forme d'un précipité pourpre avec un rendement de 42 %.

Caractérisation par RMN ^1H (250 MHz) dans le DMSO D6 :

$\delta(\text{ppm})=10$ (s, 1H, H_{CHO}) ; $\delta(\text{ppm})=9,6$ (d, 1H, H_{bpy}) ; $\delta(\text{ppm})=8$ (m, 19H, $\text{H}_{\text{bpy+py}}$)

Caractérisation par spectroscopie UV-Visible : voir tableau 4.2 page 148.

Caractérisation par spectrométrie de masse (electrospray) :

$(\text{M}-\text{Cl})^+=646 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour une masse calculée de $646,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

P.1.4 Synthèse de OsPAH

(schéma 4.5 page 152)

Une quantité de 22,5 mg d'hydrochlorure de polyallylamine est dissoute dans 20 mL de méthanol sec par addition de triéthylamine. Une solution méthanolique de complexe **d** (30 mg de complexe dans 10 mL de méthanol sec) est ajoutée goutte-à-goutte à la solution de polymère pendant une heure et le mélange résultant est maintenu sous agitation et sous azote, pendant une heure supplémentaire. On ajoute ensuite au mélange réactionnel un excès de NaBH_4 et on laisse agiter encore pendant 45 minutes. Puis on évapore le méthanol. Le produit brut est ensuite dissous dans de l'eau et mis à dialyser pendant 2 jours, en utilisant une membrane dont le seuil de coupure est de 12000-14000 Mw.

Ce polymère a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible (voir figure 4.24 page 153).

P1.5 : OsPVP

(schéma 4.4 page 149)

Un mélange de 250 mg de complexe b et de 220 mg de polyvinylpyridine est dissous dans 10 mL d'éthylène glycol, puis chauffé à 200°C , sous azote et agitation magnétique, pendant 2 heures. On laisse ensuite refroidir à température ambiante avant d'ajouter 750

mg d'hydrobromure de 2-bromoéthylamine dissous dans 15 mL de DMF. Ce mélange est ensuite laissé sous agitation à 45°C pendant une nuit.

Puis on fait précipiter le polymère dans l'acétone, qui est filtré et lavé à l'acétone.

On resolubilise ce polymère dans l'eau en vue d'une dialyse, en utilisant une membrane avec un cut-off de 12000-14000 Mw.

Ce polymère a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible (voir figure 4.22 page 150).

P.2 : Réactifs et solvants

P.2.1 : Synthèse et caractérisation

| Produit | Fournisseur | Spécificité |
|--|------------------|---------------------------|
| 4,4'-bipyridine | RIEDEL-DE-MAENAG | |
| Dibromo-1,4-éthane | Aldrich | |
| Iodométhane | Acros Organics | 99 % |
| Dibromo- <i>p</i> -xylène | Fluka | 96 % |
| Polyvinylpyridine | Aldrich | 60000 g.mol ⁻¹ |
| Hexachloroosmate de potassium | Acros Organics | ≥ 39 % en osmium |
| Dithionite de sodium | Aldrich | 85 % |
| 2,2'-bipyridine | Acros Organics | 99 % |
| Hydrochlorure de polyallylamine | Aldrich | 70000 g.mol ⁻¹ |
| Pyridine 4-aldéhyde | Aldrich | 97 % |
| Acide tétrafluoroborique | Fluka | 50 % |
| Acide <i>p</i> -toluène sulfonique (monohydrate) | Acros Organics | 97,5 % |
| Ethylène glycol | MERCK | <i>pro analysis</i> |
| Hydrobromure de 2-bromoéthylamine | Janssen Chimica | 98 % |
| Triéthylamine | Aldrich | 99 % |

| | | |
|------------------------------|----------------|-----------------------|
| Hydrogénocarbonate de sodium | Prolabo | |
| Sulfate de sodium anhydre | Laurylab | |
| Tétrafluoroborate de sodium | Acros Organics | 98 % |
| Résine échangeuse d'ions | Fluka | Amberlite IRA 96 |
| Membrane de dialyse | SECTRIM | |
| Gel de silice | MERCK | |
| Alumine | Acros Organics | 50 -200 μm |
| Hydroxyde de sodium | Laurylab | |

P.2.2 : Electrochimie

| Produit | Fournisseur | Spécificité |
|---|----------------|---|
| 3-mercaptopropane sulfonate de sodium | Aldrich | 90 % |
| IgG de souris | Sigma | |
| AntiIgG de souris conjugué à la glucose oxydase | CAPPEL-ICN | |
| Chlorure de polydiallyldiméthylammonium | Aldrich | 20 % 100000 – 200000 g.mol^{-1} |
| Polystyrène sulfonate | Aldrich | 70000 g.mol^{-1} |
| Suspension colloïdale de nanoparticules | Sigma | 5 ou 10 nm |
| Polyphénol oxydase | Fluka | « Mushroom » Tyrosinase |
| Glucose oxydase | Sigma | <i>Aspergillus Niger</i> |
| Hydrogénophosphate de potassium (trihydrate) | Acros Organics | 99 % |
| Dihydrogénophosphate de potassium (trihydrate) | Acros Organics | |
| Nitrate d'argent | Fluka | |
| Perchlorate de tetrabutylammonium | Fluka | 99 % |
| Chlorure de sodium | Roth | |

| | | |
|-------------------------------|----------------|-------------------|
| Chlorure de potassium | Acros Organics | |
| Ferrocène méthanol | Aldrich | 98 % |
| Ferrocyanure de potassium | Prolaba | |
| Catéchol | Fluka | |
| D-(+)-glucose | Sigma | |
| Acide sulfurique | Roth | 97 % |
| Peroxyde d'hydrogène | SOYONS Labo | 130 volumes |
| Lubrifiant rouge de polissage | STUERS | DP Lubricant |
| Alumine de polissage | STUERS | 0,05, 0,3 ou 1 µm |

P.2.3 : Solvants

| Produit | Fournisseur | Spécificité |
|----------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Ethanol | SDS | 99 % |
| Méthanol | Chimie Plus | 99 % |
| Chloroforme | Carlo Erba | <i>pro analysis</i> |
| Ether | Chimie Plus | 99 % |
| Acétonitrile | Rathburn | Qualité HPLC |
| Toluène | Fluka | 99,5 % |
| Diméthylformamide | Prolabo | <i>pro analysis</i> |
| Acétone | Acros Organics | <i>pro analysis</i> |
| Diméthylsulfoxyde D6 | Euroisotop | Enrichissement isotopique 99,8 % |
| Méthanol deutéré | Euroisotop | Enrichissement isotopique 99,8 % |
| Chloroforme deutéré | Euroisotop | Enrichissement isotopique 99,8 % |
| Eau deutérée | Euroisotop | Enrichissement isotopique 99,97 % |
| Hellmanex II | Hellma | |
| Eau | ELGA Purolab UHQ | MilliQ |

P.3 : Appareillage et méthodes

P.3.1 : Electrochimie

P.3.1.1 : Appareillage

Le système conventionnel à trois électrodes a été utilisé pour l'enregistrement des courbes de voltampérométrie cyclique, à balayage linéaire et pour les courbes d'ampérométrie à potentiel contrôlé. L'appareil utilisé pour la majeure partie des expériences est un potentiostat de CH Instrument, modèle CHI 440. Les mesures sur électrode tournante à potentiel fixe ont été réalisées avec un potentiostat PAR modèle 273A et une table traçante Sefram TGM 164 XY/t.

Les potentiels d'électrode ont été donnés par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3M (Metrohm). L'électrode auxiliaire est un fil de platine.

La sonication est réalisée dans un bac à ultrasons « Elmasonic One » de chez Elma, à une fréquence ultrasonique de 35kHz.

L'unité d'asservissement utilisée pour le contrôle de la vitesse de rotation des électrodes tournantes est un appareil Tacussel CTV 101 T.

Les mesures avec les bioélectrodes enzymatiques ont été réalisées en milieu thermostaté à 30°C.

La modélisation des bioélectrodes enzymatiques a été effectuée avec le logiciel Mathematica version 4.0 de Wolfram.

P.3.1.2 : Polissage des électrodes

Les surfaces d'électrodes de carbone vitreux, de 3 mm de diamètre (CH Instrument), ont été polies avant utilisation sur un feutre DPNap (STUERS) et de la pâte diamantée de 1 µm (Presi).

Les surfaces d'électrodes d'or, de 2 mm de diamètre (CH Instrument), avant de subir une restructuration électrochimique, comme cela a été décrit dans le chapitre 3 de ce mémoire, ont été préparées de la façon suivante :

- 1) Feutre DPMol (STUERS) avec de la pâte diamantée 3 µm (Presi) et de l'éthanol absolu : 1 fois 2 minutes

Sonication 2 minutes dans de l'eau

2) Feutre rouge DPNap avec de la pâte diamantée 1 μm et du lubrifiant rouge : 1 fois 2 minutes

Sonication 2 minutes dans de l'eau

3) Feutre rouge DPNap avec de l'alumine 0,3 μm et de l'eau : 1 fois 2 minutes

Sonication 2 minutes dans de l'eau

4) Feutre rouge DPNap avec de l'alumine 0,05 μm et de l'eau : 3 fois 2 minutes

Sonication 2 fois 3 minutes dans de l'eau

5) Passage des électrodes dans une solution Piranha (solution très corrosive contenant un mélange 1:3 d'eau oxygénée 100 volumes et d'acide sulfurique concentré) pendant 5 minutes

Sonication 2 fois 3 minutes dans de l'eau

P.3.1.3 : Modification des surfaces d'électrodes

P.3.1.3.1 : Modification d'électrode de carbone vitreux

Les solutions d'antigène (1 mg.mL^{-1}), de gélatine (0,1 mg.mL^{-1}) et de l'anticorps conjugué à la glucose oxydase (dilution par 50 de la solution commerciale) ont été préparées en tampon composé de KH_2PO_4 0,01 M et de NaCl 0,15 M et ajusté à $\text{pH}=7,4$ avec une solution de soude 1 M.

L'adsorption de l'antigène, par trempage, est réalisée durant 2 heures. L'électrode est ensuite rincée abondamment à l'eau MilliQ et trempée 10 minutes dans la solution de gélatine. Après rinçage, la réaction antigène-anticorps a lieu durant une nuit par dépôt d'une goutte d'une goutte de la solution d'anticorps sur la surface d'électrode.

P.3.1.3.2 : Modification d'électrode d'or

Les surfaces d'électrode d'or sont mises en contact, par dépôt d'une goutte de 20 μL , avec une solution de MPS à 20 mM dans de l'acide sulfurique 16 mM durant 30 minutes, pour adsorber la monocouche de MPS.

P.3.1.3.3 : Autoassemblages sur électrode modifiée

Les autoassemblages ont été réalisés par adsorption alternée des différentes espèces, intercalée de rinçages par la solution de tampon correspondant. La mise en contact des électrodes a été effectuée par trempage dans le cas des électrodes de carbone vitreux et par dépôt d'une goutte de 15 μL pour les électrodes d'or à partir des solutions aqueuses tamponnées de chaque espèce.

P.3.2 : Spectroscopie UV-Visible

Les mesures de spectroscopie ont été réalisées avec un spectrophotomètre Varian, modèle Cary 100.

Les cuves de quartz (Hellma), de 0,1 ou 1 cm de trajet optique, sont préalablement nettoyées avec une solution Piranha, sous sonication, durant 15 minutes puis, sont rincées très abondamment à l'eau MilliQ. Cette procédure est réalisée deux fois minimum. Puis, un spectre de la cuve contenant de l'eau MilliQ est réalisé pour vérifier la propreté de la cuve.

Pour la construction des assemblages, les parois de la cuve sont ensuite activées par sonication durant 20 minutes dans une solution de base alcoolique (1% NaOH, 40% d'éthanol absolu et 59% d'eau MilliQ). Cette procédure a pour but de procurer une charge négative permanente aux surfaces de quartz.

Puis, les parois de la cuve sont mises en contact alternativement avec les solutions chargées positivement et négativement. Après rinçage, un spectre est enregistré après chaque étape de dépôt dans la solution tampon appropriée à l'expérience.

P.3.3 : Microbalance à Quartz avec suivi de la Dissipation d'énergie : QCM-D

Les expériences de QCM-D ont été effectuées grâce à un appareil Q-Sense D-300, à une température de 23°C.

Les quartz (QSX 301 de Q-Sense) utilisés sont recouverts d'or sur chaque face. La surface active de ces quartz est de 0,2 cm^2 . Chaque quartz a été prétraité par la mise en

contact d'une goutte de solution Piranha durant 2 minutes avant d'être rincé, séché et monté dans la cellule de mesure.

Les mesures ont été effectuées sous flux continu grâce à une pompe péristaltique à 12 galets, de chez Ismatec, modèle ISM 597.

Le principe de fonctionnement de la QCM-D a été développé dans le premier chapitre de ce mémoire.

La modélisation des données obtenues à chaque mesure a été réalisée grâce au logiciel Q-Tools au laboratoire mais aussi par Mr Bernard Senger de l'unité INSERM U595 de Strasbourg, que nous remercions vivement pour son aide et sa gentillesse.

P.3.4 : Autres méthodes de mesures

Les clichés de microscopie électronique à transmission (figure 4.1 page) des solutions colloïdales des nanoparticules d'or de 5 et 10 nm ont été pris par Jean-Luc Puteaux du CERMAV à Grenoble.

Les clichés de microscopie à force atomique (figure 3.3 page) ont été réalisés avec l'aide de Philippe Lavalle de l'unité INSERM U595 de Strasbourg, que nous remercions vivement aussi.

Abstract :

These works concern the physico-chemical characterization and the electroanalytical applications of new nanocomposites materials deposited onto electrode surfaces, as thin films, by the layer by layer electrostatic self-assembly technique. Spatially organized structures, composed by (redox) polyelectrolytes, enzymes and gold nanoparticles, have been characterized and applied to the construction of enzymatic electrodes.

The multilayer films growth has been studied *in situ* by UV-Visible spectroscopy, and by a microgravimetric technique: the Quartz Crystal Microbalance with Dissipation factor monitoring (QCM-D). Different electrochemical techniques (cyclic voltamperometry, amperometry on rotating disk electrode) have been used to quantify the electron transfer process, the film permeability and the electroenzymatic kinetics. Relationships between the structure and the properties have been established by the development of kinetic and structural models.

Several redox enzymes such as the glucose oxidase (Gox) and the polyphenol oxidase (PPO) have been self-assembled onto glassy carbon (GC) and gold (Au) electrode surfaces with cationic polyelectrolytes such as the polydiallyldimethylammonium (PDDA⁺) and a chemically modified chitosan (CHI⁺). Different methods for grafting an anionic monolayer have been used to generate negative charges on the electrode surfaces, which have been used as a platform for the electrostatic assembly build-up. Affinity reactions have been chosen to functionalize the GC by a negatively charged monolayer of Gox. The gold electrode surfaces have been modified by a self-assembled monolayer of 3-mercaptopropanesulfonate (MPS). Thanks to a detailed kinetic and structural study, we have demonstrated that, despite a disorganized and non dense structure, the Au/MPS monolayer acts as a high kinetic barrier towards the permeability of anionic and neutral species. The electron transfer towards diffusive species occurs mainly by tunnelling effect through the MPS monolayer.

Gold nanoparticles stabilized by citrate (NP) can be electrostatically assembled onto Au/MPS surfaces with cationic polyelectrolytes. We have shown that the nanoparticles assembled with PDDA⁺ into multilayers films aggregate themselves. On the other hand, multilayer films constituted by NP self-assembled with polyelectrolytes having a redox moiety, like an osmium complex or the viologen, show a density of nanoparticles smaller than in the case of the PDDA⁺. The electron transport in these redox-active films takes place by electron hopping between adjacent redox groups and by the NP for some redox moieties.

Keywords: self-assembled monolayer, multilayer films, electrostatic self-assembly, gold nanoparticles, redox polyelectrolytes, enzyme multilayers, modified electrodes, electrochemistry, Quartz Crystal Microbalance with Dissipation factor monitoring (QCM-D), kinetics modelization, electron transfer, membrane permeability.