



**HAL**  
open science

**Elaboration et études des propriétés de films minces de carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>) sur verre conducteur : vers l'élaboration de support en verre polarisable pour la détection électrochimique et/ou optique en puce microfluidique.**

Mathilde Faure

► **To cite this version:**

Mathilde Faure. Elaboration et études des propriétés de films minces de carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>) sur verre conducteur : vers l'élaboration de support en verre polarisable pour la détection électrochimique et/ou optique en puce microfluidique.. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), 2013. Français. NNT : 2013PA066820 . tel-02302169

**HAL Id: tel-02302169**

**<https://theses.hal.science/tel-02302169>**

Submitted on 1 Oct 2019

**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 DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Génie des procédés et technologie avancées

Présentée par

M<sup>lle</sup> Faure Mathilde  
Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Elaboration et études des propriétés de films minces de carbone  
amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>) sur verre conducteur : vers l'élaboration de  
support en verre polarisable pour la détection électrochimique et/ou  
optique en puce microfluidique**

soutenue le 22/10/2013

devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> Ferrigno Rosaria, Professeur, Université Claude Bernard Lyon1	Rapporteur
M. Lazerges Mathieu, Maître de conférence, Université Paris Descartes	Rapporteur
M <sup>me</sup> Arefi-Khonsari Farzaneh, Professeur UPMC	Examineur
M <sup>me</sup> Haghiri-Gosnet Anne Marie, Directrice de recherche, CNRS	Examineur
M. Pallandre Antoine, Maître de conférence, Université Paris Sud	Examineur
M. Gamby Jean, Chargé de recherche, CNRS	Directeur de thèse
M. Tribollet Bernard, Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse



# Remerciement

Je remercie Monsieur François Huet, directeur du LISE, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie vivement Madame Rosaria Ferrigno, professeur de l'Université Lyon 1, et Monsieur Mathieu Lazerges, maître de conférence à l'université Paris Descartes d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier Madame Farzaneh Arefi-Khonsari, Madame Anne Marie Haghiri-Gosnet et Monsieur Antoine Pallandre d'avoir accepté de l'examiner. Je remercie également ce dernier pour m'avoir aidé et formé pour la réalisation des puces microfluidiques.

J'exprime mes sincères remerciements à Bernard Tribollet et Jean Gamby, mes directeurs de thèse, pour la confiance qu'ils m'ont accordé en dirigeant ces travaux de thèse. J'exprime ma profonde gratitude à Jean Gamby qui m'a encadrée durant cette thèse, pour la sympathie, le soutien et la confiance qu'il m'a témoignée durant ces trois années de thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres du LISE pour leur aide durant ma thèse et notamment Claude Deslouis et Alain Pailleret pour les discussions sur les films de a - CNx. J'adresse également mes remerciements à ce dernier pour les mesures AFM sur ces films. J'exprime mes profonds remerciements à Emmanuel Maisonhaute et Vincent Vivier pour leurs conseils scientifiques avisés. Je remercie également Daniel Rose pour la réalisation des connecteurs de la puce microfluidiques. Je tiens à remercier Florence Billon pour la réalisation des dépôts de a-CNx et en qui j'ai trouvé une véritable amie.

Je remercie également Isabelle Le Potier et Sonia Korchane pour leur accueil lors de mon passage au LPNSS, pour l'optimisation des protocoles de dérivation en détection LIF.

Je tiens également à remercier tous mes collègues non permanents du LISE : mon « super » Abdès, ma « fillette » Emna, Nizar, Bea, Ronny-Rebeca, ma «petite» Huong,, Mohammed Dao, Peng, Pierre, Jonathan, Edgard, Freddy, Yanjia, Samar, Lili, Nour, Ahmed-Sara et à mes collègues de bureau Amine, Zineb, Sameer, Yasser et Syrine. Une mention

spéciale pour Flavie qui a toujours été là en cas de besoin et sans qui cette thèse aurait été beaucoup moins agréable.

Dans un autre registre je tiens à remercier mes parents et mon frère qui m'ont toujours encouragée et soutenue. Enfin je remercie Romain pour son soutien, ses encouragements et sa patience surtout dans les moments difficiles de la fin de thèse.

## TABLE DES MATIERES

<b>PREAMBULE.....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>11</b>
<b>I.1. La polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine.....</b>	<b>13</b>
I.1.1. La transthyrétine .....	13
I.1.2. Epidémiologie .....	14
I.1.3. Manifestations cliniques .....	15
I.1.4. Traitement de la maladie.....	15
I.1.5. Pronostic et diagnostic de la maladie.....	17
<b>I.2. Détection d'acides aminés, de peptides ou de protéines en microsystèmes.....</b>	<b>18</b>
I.2.3. Détection optique .....	19
I.2.4. Détection par chimiluminescence (CL) et électrochimiluminescence (ECL) .....	20
I.2.5. Détection par conductimétrie .....	21
I.2.6. Détection par spectrométrie de masse.....	22
I.2.7. Détection électrochimique .....	23
<b>I.3. Contrôle de la charge de surface dans un microcannal.....</b>	<b>24</b>
<b>I.4. Couches minces de carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>).....</b>	<b>29</b>
I.4.3. Le carbone dopé à l'azote.....	29
I.4.4. Différentes méthodes de synthèse des couches de carbone azoté amorphe .....	31
I.4.5. Propriétés générales des couches de carbone dopé à l'azote.....	32
I.4.6. Application des couches de carbone amorphe azoté .....	36
<b>I.5. Conclusions.....</b>	<b>38</b>
<b>I.6. Références.....</b>	<b>39</b>
<b>CHAPITRE II -TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1. Principe d'analyse électrochimique.....</b>	<b>52</b>
II.1.3. Voltammétrie cyclique .....	52
II.1.4. Voltammétrie à impulsion différentielle .....	55
II.1.5. Spectroscopie d'impédance.....	58
II.1.6. Appareillage .....	63
<b>II.2. Préparation des films de carbone amorphe azoté sur verre/ITO .....</b>	<b>63</b>
II.2.3. La pulvérisation cathodique diode magnétron en courant continu .....	63
II.2.4. Conditions de dépôts des couches minces de carbone azoté amorphe .....	66
II.2.5. Fabrication des électrodes de a-CN <sub>x</sub> sur verre/ITO .....	67
<b>II.3. Principe d'analyse des dépôts .....</b>	<b>68</b>
II.3.3. Spectrométrie photoélectronique X (XPS : X-Ray Photoelectron Spectrometry).....	68
II.3.4. Microscopie à force atomique .....	70
<b>II.4. Références.....</b>	<b>74</b>
<b>CHAPITRE III - CARACTERISATION DES DEPOTS DE A-CN<sub>x</sub> SUR ITO . 77</b>	

<b>III.1.</b>	<b>Caractérisations microstructurales des couches de a-CN<sub>x</sub></b> .....	<b>79</b>
III.1.3.	Spectroscopie de photoélectrons X (XPS) .....	79
III.1.4.	Caractérisation des films par microscopie électronique (SEM-FEG) .....	86
III.1.5.	Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM) .....	87
<b>III.2.</b>	<b>Propriétés électrochimiques</b> .....	<b>97</b>
III.2.3.	Détermination des conditions optimales pour les dépôts a-CN <sub>x</sub> sur ITO .....	97
III.2.4.	Etude dans KCl .....	101
III.2.5.	Etude électrochimique d'un couple redox sur les dépôts de CN <sub>x</sub> sur ITO P15 .....	115
III.2.6.	Etude électrochimique d'un couple redox sur les dépôts de CN <sub>x</sub> sur ITO P30 .....	131
<b>III.3.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>137</b>
<b>III.4.</b>	<b>Références</b> .....	<b>140</b>
 <b>CHAPITRE IV - DETECTION DU PEPTIDE TTR EN MACROSYSTEME ..</b>		<b>145</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Marquage d'acides aminés ou de peptides.</b> .....	<b>147</b>
<b>IV.2.</b>	<b>Etude électrochimique du marqueur NDA</b> .....	<b>152</b>
IV.2.1.	Etude du mécanisme de réduction par voltammétrie cyclique .....	156
IV.2.2.	Détermination des concentrations de chaque forme .....	169
IV.2.3.	Détermination des constantes d'équilibre .....	180
IV.2.4.	Etude en fonction du temps .....	182
<b>IV.3.</b>	<b>Dérivation du peptide et des acides aminés</b> .....	<b>185</b>
IV.3.3.	Sur carbone vitreux .....	185
IV.3.4.	Sur CN <sub>x</sub> 15 % déposé sur ITO.....	199
IV.3.5.	Détection en système 2 électrodes.....	210
<b>IV.4.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>217</b>
<b>IV.5.</b>	<b>Références</b> .....	<b>220</b>
 <b>CHAPITRE V- DETECTION DU PEPTIDE TTR EN PUCE MICROFLUIDIQUE</b>		<b>225</b>
.....		<b>225</b>
<b>V.1.</b>	<b>Interet de la miniaturisation</b> .....	<b>227</b>
<b>V.2.</b>	<b>Hydrodynamique en microfluidique</b> .....	<b>228</b>
<b>V.3.</b>	<b>Elaboration de la puce microfluidique</b> .....	<b>231</b>
V.3.3.	Techniques de microfabrication .....	231
V.3.4.	Fabrication de la puce microfluidique .....	234
V.3.5.	Mesure des dimensions de la puce microfluidique.....	241
<b>V.4.</b>	<b>Optimisation des paramètres et conditions d'analyse</b> .....	<b>242</b>
V.4.3.	Analyse d'un système redox dans la puce microfluidique en mode statique .....	242
V.4.4.	Analyse d'un système redox dans la puce microfluidique en conditions hydrodynamique .....	246
<b>V.5.</b>	<b>Détection de la dérivation dans la puce microfluidique</b> .....	<b>256</b>
V.5.3.	Détection en mode statique .....	256
V.5.4.	Détection en mode dynamique .....	258
<b>V.6.</b>	<b>Conclusions</b> .....	<b>263</b>
<b>V.7.</b>	<b>Références</b> .....	<b>265</b>

<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>271</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>279</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES.....</b>	<b>280</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>285</b>
<b>Fabrication des électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur verre.....</b>	<b>287</b>
<b>Mesure de l'épaisseur des films de a-CN<sub>x</sub> sur verre par SEM-FEG.....</b>	<b>287</b>
<b>Mesure 4 pointes sur les électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur verre et sur verre/ITO.....</b>	<b>288</b>
Mesure sur verre.....	288
Mesure sur les films déposés sur verre/ITO.....	288
<b>Etude dans KCl.....</b>	<b>289</b>
Electrode P15.....	289
Electrode P30.....	290
<b>ANNEXE II-PUBLICATION.....</b>	<b>293</b>



# Préambule

Ma thèse se situe dans le cadre de l'ANR DIsopositifs MIcrofluidiques à interface POLarisables pour des séparations Electrophorétiques de haute résolution (DIMIPOLE). Le consortium formé autour de ce projet est composé de trois laboratoires : le laboratoire de photonique et nanostructures (LPN, UPR 20, Marcoussis), le laboratoire interfaces et systèmes électrochimiques (LISE, UPR15, Paris) et le laboratoire protéines et nanotechnologies en sciences séparatives (LPNSS, UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, Chatenay Malabry). Ce projet vise la réalisation de puces microfluidiques pour l'électrophorèse dites de « seconde génération » dont la charge de surface du canal de séparation est modulable physiquement en temps réel. En effet, dans les puces traditionnelles, la haute résolution pour des biomolécules ayant des mobilités électrophorétiques très proches ne peut être obtenue qu'en ajustant le flux électroosmotique (FEO) par des modifications de chimie de surface, telles que l'ajustement de pH du tampon de séparation ou par des fonctionnalisations de surface des canaux. La stratégie que propose DIMIPOLE consiste à mettre à profit les propriétés du carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>) en l'intégrant dans des microstructures pour contrôler physiquement la charge de surface. Cette étape induit une modulation du FEO grâce aux propriétés du matériau qui fonctionne comme une interface polarisable. Dans son application, les puces microfluidiques seront utilisées pour le diagnostic de maladies neurodégénératives telle que la polyneuropathie amyloïde familiale, sujet de recherche du LPNSS. En effet, le développement de ces puces permettra à moyen terme de pouvoir séparer d'identifier et de quantifier les formes natives et mutées de la protéine Transthyréline (TTR), la détection pouvant être électrochimique ou optique.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis focalisée sur deux tâches. La première tâche est la caractérisation et l'optimisation des conditions de synthèse du matériau a-CN<sub>x</sub> sur des substrats en verre suivant deux sous tâches. D'une part, pour l'utilisation du a-CN<sub>x</sub> comme interface idéalement polarisable dans les puces de séparation (LPN et LPNSS), et d'autre part, comme électrode de détection dans les puces de détection (LISE). La deuxième tâche est également subdivisée en deux sous tâches. D'une part, une étude en macrosystème pour la caractérisation électrochimique du marqueur fluorescent utilisé au LPNSS, le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA), ainsi que l'optimisation des protocoles de marquage pour la

détection électrochimique du peptide synthétique de la transthyréline TTR, et d'autre part, la réalisation d'une configuration à deux microélectrodes en puce microfluidique pour transférer et valider les protocoles de détection électrochimique de la TTR en microsysteme.

En résumé, les objectifs poursuivis au cours de ma thèse en relation avec les tâches mentionnées ci-dessus sont :

- la caractérisation des propriétés de films minces a-CNx (rugosité, épaisseur, composition, conductivité, réactivité),
- l'optimisation des propriétés du a-CNx pour ses utilisations comme une interface polarisable ou une microélectrode de détection,
- la caractérisation électrochimique du marqueur NDA,
- l'optimisation des conditions de marquage de la TTR en macrosystème,
- la détection en puce microfluidique à 2 microélectrodes.

J'ai fait le choix de présenter mes travaux de thèse suivant cinq chapitres.

Dans un premier chapitre, une introduction générale contenant une bibliographie multidisciplinaire sera exposée. Ce rappel se découpera en trois grandes sous parties. Une partie présentera le modèle biologique d'étude au LPNSS qui est la polyneuropathie amyloïde familiale, et notamment ses manifestations cliniques, son traitement et son diagnostic. Une deuxième partie s'attachera à la détection d'acides aminés, de peptides ou de protéines en puces microfluidiques à l'aide de plusieurs techniques de détection, quelles soient fluorométriques, électrochimiques, conductimétriques, et spectroscopiques. Une troisième partie abordera les aspects techniques de l'utilisation d'une interface polarisable pour moduler le flux électroosmotique en puce pour électrophorèse grâce au contrôle de la charge de surface du canal de séparation. Dans la dernière partie une large bibliographie est consacré aux films minces de carbone amorphe azoté, et ce abordant, les propriétés mécanique, optique, électrochimique, électrique, tribologique, ainsi que la biocompatibilité et les applications courantes du a-CNx.

Le deuxième chapitre détaille les techniques de caractérisations électrochimiques, microscopiques et spectroscopiques utilisées dans ma thèse. Cette partie comprendra également la technique de dépôt des films minces de a-CNx ainsi que les différents protocoles et conditions de synthèses utilisées. Un descriptif de l'élaboration des électrodes en verre/ITO/a-CNx sera aussi détaillé.

Le troisième chapitre expose les résultats des caractérisations morphologique, structurale et électrochimique des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>x</sub> pour leur future utilisation comme microélectrodes dans les puces microfluidiques en verre ou PDMS verre, ou comme interface idéalement polarisable en puce pour électrophorèse. Une première partie présentera les résultats de la caractérisation morphologique. La caractérisation électrochimique sera effectuée tout d'abord en milieu KCl sans traceur redox pour déterminer les fenêtres de polarisabilité en fonction des protocoles de dépôt, ainsi que des différents paramètres caractéristiques des films minces en solution tels que : la capacité de double couche, la capacité non idéale modélisée par un élément de phase constant (CPE), la résistance de transfert de charge et la résistance à très haute fréquence. La caractérisation électrochimique en milieu KCl et en présence d'un traceur redox permettra de déterminer la réactivité hétérogène des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>x</sub> vis-à-vis de ce traceur en fonction de la stoechiométrie en azote entrant dans la composition des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>x</sub> ainsi que du rôle du pré-traitement mis au point pour activer/ réactiver les électrodes sans détérioration du dépôt.

Le quatrième chapitre se concentre sur une approche en électrochimie moléculaire avec des aspects mécanistiques sur la réduction du marqueur NDA sur électrode de carbone (carbone vitreux, CN<sub>x</sub>). En effet, le dialdéhyde est présent sous trois formes en solution aqueuse. La concentration en chaque forme du NDA a été déterminée ainsi que la stabilité de celle-ci. Dans un second temps, les conditions de dérivaison du peptide synthétique de la TTR (PN) avec le NDA qui forme un dérivé cyanobenzoisoindole (CBI) ont été optimisés suivant le pH du tampon, le temps de dérivaison, et le ratio NDA/peptide. Les réponses électrochimiques des dérivés du peptide et d'acides aminés rentrant dans la séquence du peptide ont été comparées. La stabilité du marquage, la limite de détection, et le nombre d'électrons échangés lors de l'oxydation du CBI ont également été étudiés. Une fois l'optimisation des conditions réalisée sur carbone vitreux, la détection de la dérivaison est menée sur électrode verre/ITO/a-CN<sub>x</sub>. Enfin, cette dérivaison sera adaptée en montage classique à 2 électrodes à titre de comparaison avec un système classique à trois électrodes.

Le cinquième et dernier chapitre présente les résultats préliminaires pour le marquage et la détection de la dérivaison du peptide synthétique de la TTR dans en puce microfluidique. Je présenterai les procédures et méthodologies utilisées pour la fabrication de la puce microfluidique au LPN, l'optimisation des conditions d'analyse sans écoulement et en mode

hydrodynamique. Enfin, les derniers résultats mis en forme pour la détection en puce microfluidique du peptide avec les caractéristiques de la détection seront présentés.

Ce travail de thèse a donné lieu à un article paru [1] et une déclaration d'invention (DI) en cours au CNRS. Ceci explique la raison pour laquelle les articles concernant spécifiquement la préparation des substrats verre/ITO/a-CN<sub>x</sub> ainsi que l'application en détection électrochimique n'aient pas été soumis. Une partie des travaux a aussi été présentée à l'occasion d'une conférence internationale [2] ainsi que deux conférences nationales [3,4].

- [1] M. Faure, S. Korchane, I. Le, A. Pallandre, C. Deslouis, A. Haghiri-gosnet, and J. Gamby, "Investigating of labelling and detection of transthyretin synthetic peptide derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde," *Talanta*, vol. 116, pp. 8–13, 2013.
- [2] Labelling and detection of transthyretin TTR by electrochemistry ISE 63<sup>th</sup> Annual Meeting, 19-24 Août 2012, Prague, République Tchèque
- [3] Marquage et détection de la Transthyréine TTR par Electrochimie, Journée électrochimie 2011, 4-8 juillet 2011, Grenoble, France
- [4] Détection par électrochimie d'un peptide marqué dans une puce microfluidique à deux électrodes, JE2013 juillet 2013, Paris, France





# Chapitre I. Etude bibliographique

---

<b>I.1.</b>	<b>La polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine.</b>	<b>13</b>
I.1.1.	La transthyrétine	13
I.1.2.	Epidémiologie	14
I.1.3.	Manifestations cliniques	15
I.1.4.	Traitement de la maladie	15
I.1.5.	Pronostic et diagnostic de la maladie.	17
<b>I.2.</b>	<b>Détection d'acides aminés, de peptides ou de protéines en microsystèmes.</b>	<b>18</b>
I.2.3.	Détection optique	19
I.2.3.1	Détection par fluorescence	19
I.2.3.2	Détection par absorbance UV	19
I.2.4.	Détection par chimiluminescence (CL) et électrochimiluminescence (ECL)	20
I.2.5.	Détection par conductimétrie	21
I.2.6.	Détection par spectrométrie de masse.	22
I.2.7.	Détection électrochimique	23
I.2.7.1	Détection sans marquage préalable	23
I.2.7.2	Détection avec marquage préalable	24
<b>I.3.</b>	<b>Contrôle de la charge de surface dans un microcanal.</b>	<b>24</b>
I.3.3.1	Interfaces polarisables	25
I.3.3.2	Contrôle du flux électroosmotique (FEO)	25
I.3.3.2.1	Premières expériences du contrôle du FEO grâce à une interface polarisable	26
I.3.3.2.2	Amélioration apporter au montage PWF	28
<b>I.4.</b>	<b>Couches minces de carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>)</b>	<b>29</b>
I.4.3.	Le carbone dopé à l'azote.	29
I.4.3.1	Liaison de l'azote dans le carbone azoté.	29
I.4.3.2	Différents types de dépôts azotés	30
I.4.4.	Différentes méthodes de synthèse des couches de carbone azoté amorphe	31
I.4.4.1	Dépôts CVD	31
I.4.4.2	Dépôts PVD	31
I.4.5.	Propriétés générales des couches de carbone dopé à l'azote.	32
I.4.5.1	Propriété mécanique	32
I.4.5.2	Propriété tribologique	32
I.4.5.3	Propriété optique	33
I.4.5.4	Propriété électrochimique	34
I.4.5.5	Résistance à la corrosion	35
I.4.5.6	Propriété électrique	35
I.4.5.7	Biocompatibilité des films.	36
I.4.6.	Application des couches de carbone amorphe azoté	36
I.4.6.1	Application dans le domaine médicale.	36
I.4.6.2	Greffage sur CN <sub>x</sub>	36
I.4.6.3	Application pour la détection.	37
I.4.6.4	Autres applications	37
<b>I.5.</b>	<b>Conclusions.</b>	<b>38</b>
<b>I.6.</b>	<b>Références.</b>	<b>39</b>

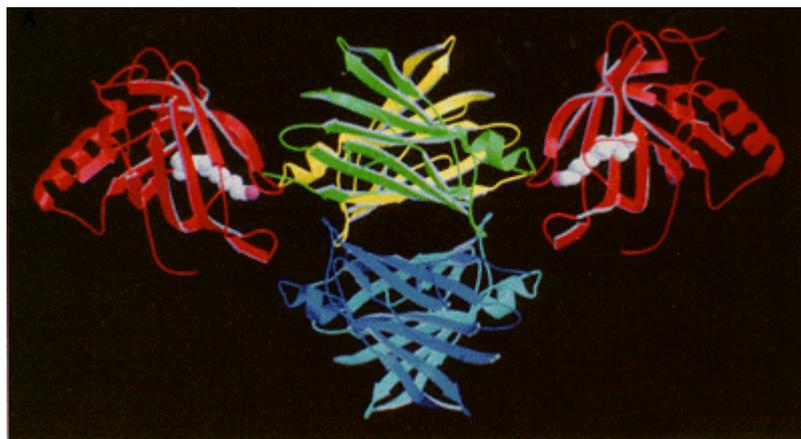


## ***I.1. La polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine.***

### **I.1.1. La transthyrétine**

La transthyrétine (TTR) est un biomarqueur dont les modifications post-traductionnelles peuvent causer de graves maladies neurologiques comme la polyneuropathie amyloïde familiale [1][2]. La TTR a été initialement appelée préalbumine (thyroxine binding préalbumine). En effet, lors d'une électrophorèse, le temps de migration de la TTR est plus petit que celui de l'albumine. Le site majeur de la synthèse de la TTR est le foie (95%), les autres sites étant le plexus choroïdes et la rétine. Cette protéine est donc présente dans le fluide cérébral spinal et dans le plasma (à une concentration de  $0,20 \text{ g.L}^{-1}$  à  $0,40 \text{ mg.dL}^{-1}$ ). Elle permet le transport de l'hormone thyroïdienne thyroxine et de la protéine de liaison du rétinol. Le chromosome 18 possède le gène qui code pour la TTR, ce gène est de petite taille et possède 4 exons et 3 introns. Le premier exon code pour un peptide et les 3 premiers acides aminés de la protéine. Le deuxième exon code pour les résidus de 4 à 47, l'exon 3 pour les acides aminés allant de 48 à 92 et de 93 à 127 pour le dernier exon [3].

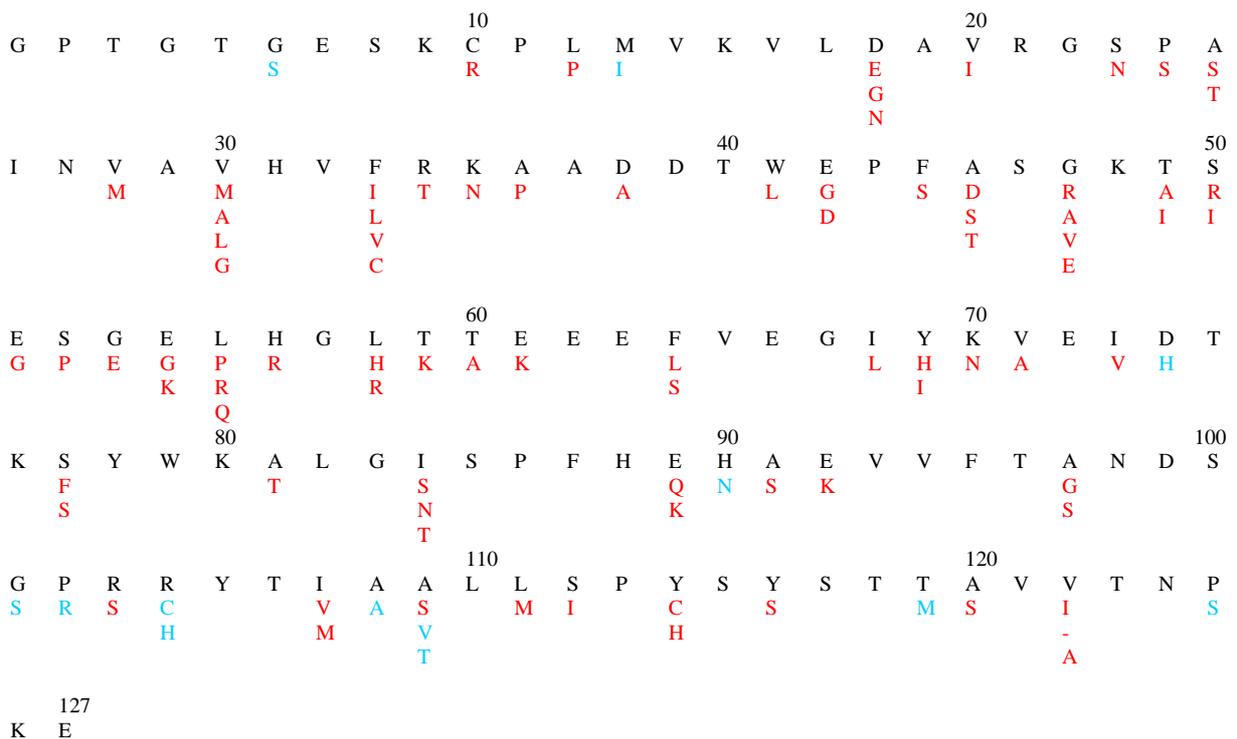
La TTR normale est un tétramère soluble composé de 4 sous unités identiques. Un monomère est constitué de 127 acides aminés et chaque monomère a une masse de 14kDa. Les monomères sont structurés en feuillets bêta plissés. Deux feuillets  $\beta$  composent un monomère et interagissent pour former un dimère, grâce à des liaisons hydrogène. Le tétramère contient deux sites de liaison de la thyroxine au centre de la molécule (Figure I-1).



**Figure I-1 : Structure du complexe TTR –protéine de liaison du rétinol. En bleu, bleu clair, vert et jaune le tétramère TTR, en gris le rétinol et en rouge la protéine de liaison du rétinol [3].**

### I.1.2. Epidémiologie

La polyneuropathie amyloïde familiale (FAP) est une maladie à transmission autosomique dominante. Cependant environ 15% des personnes porteuses de la mutation sur le gène ne présenteront aucun symptôme. La FAP est caractérisée par des dépôts de substance amyloïde. Ces dépôts peuvent être dus à 3 protéines : la transthyretine TTR, la gelsoline et la lipoprotéineA-1 [1][4]. La plus fréquente étant la polyneuropathie amyloïde familiale à transthyréine. Cette maladie a été identifiée en 1952 au Portugal par Corino Andrade [5]. Cette maladie tout d'abord appelée amylose portugaise a par la suite été identifiée au Japon et en Suède. Ces trois pays sont de nos jours les principaux foyers de polyneuropathie à transthyréine [6]. En 1978, Costa *et al.* découvrent que la transthyréine est un constituant des dépôts amyloïdes. Il faut attendre 1983 pour que la première mutation de la TTR soit reportée. En 1989, 12 mutations sont connues, 60 en 1995, une centaine de nos jours (mutations simples ou doubles ou délétions dans le gène de la TTR). Parmi ces 100 mutations, 13 sont des mutations non pathologiques [7] (Figure I-2).



**Figure I-2 : Gène TTR et ses mutations possibles en rouge les mutations pathologiques et en bleu les non pathologiques.**

Certaines de ces mutations sont non pathogènes comme la mutation Gly6Ser présente dans une population caucasienne à 12% [8]. Les mutations pathologiques provoquent la déstabilisation du tétramère entraînant la formation de fibres amyloïdes puis des dépôts

amyloïdes. Ces dépôts gênent le fonctionnement des organes touchés. Quelques études ont été réalisées sur le mécanisme d'amyloïdogenèse de la TTR. Dans ces études, la première étape est la déstabilisation de la forme native de la TTR en raison des mutations amyloïdogéniques. Ces mutations provoquent la formation de monomères. Ces monomères peuvent s'agréger et former des espèces oligomériques. Ces espèces peuvent par la suite former des fibrilles amyloïdes puis des dépôts amyloïdiques. La formation de monomères est liée à la stabilité thermodynamique des formes de la TTR. La région entre des résidus 45 et 58 est le site de la plupart des mutations amyloïdogéniques [7].

La maladie touche des personnes de 18 à 83 ans avec un âge moyen de 35,3 ans. En 2012, en France, il a été recensé 386 patients atteints de la FAP. En France, celle-ci est causée par 29 mutations différentes, avec 66% des patients atteints de la FAP due à la mutation Val30Met [9].

La mutation Thr49Ala située sur l'exon 3 est présente en France et en Italie. Cette mutation entraîne une perte de masse molaire de  $30 \text{ g.mol}^{-1}$ . Cette mutation entraîne comme symptômes prédominants une neuropathie périphérique, une cardiomyopathie ainsi qu'un syndrome du canal carpien [10][11].

### **I.1.3. Manifestations cliniques**

Cette maladie se manifeste par des atteintes au niveau des nerfs, du cœur, du rein (10 à 20%) ou de l'œil. L'atteinte neurologique commence par se manifester au niveau des mains et des pieds, puis se développe dans tous les membres. Deux types de FAP existent : la FAP de type I (ou la neuropathie est seule), et la FAP de type II (il y a aussi un syndrome du canal carpien). D'autre part, il peut y avoir une atteinte du système nerveux autonome. Cette atteinte se manifeste par des problèmes gastro-intestinaux (diarrhées, constipation) et génitaux-urinaire. Les personnes touchées par cette maladie peuvent aussi présenter des problèmes oculaires, tels qu'une opacité vitreuse, des glaucomes ainsi que des anomalies pupillaires. L'atteinte cardiaque, quant à elle, se manifeste par une insuffisance cardiaque et des troubles de la conduction cardiaque. Sur les différentes mutations du gène, quatre entraînent une atteinte oculaire, onze une cardiomyopathie et dix une atteinte leptoméningée [4][1].

### **I.1.4. Traitement de la maladie**

La prise en charge de la maladie s'effectue en traitant les symptômes et en limitant le développement de la maladie ainsi que par le traitement des symptômes.

Le traitement pour stopper la maladie est la transplantation hépatique, la variante amyloïdogénique de la TTR n'est alors plus fabriquée. La première transplantation dans le cadre d'une FAP a été pratiquée en 1990 en Suède. De nos jours plus de 1400 transplantations ont été effectuées. Pour 90% des patients transplantés, la FAP était liée à la variante VAm30Met. Après transplantation, une diminution des dépôts amyloïdes est observée. Dans le cas de patients greffés à un stade précoce de la maladie pour une mutation Val30Met, la progression de celle-ci est stoppée dans 70% des cas. Pour cette mutation, l'espérance de vie est multipliée par deux après transplantation. Cependant, la guérison n'est pas assurée. Cette évolution dépend de plusieurs facteurs, tels que l'âge du patient, la durée de la maladie, l'indice de masse corporelle modifié (produit de la masse corporelle sur la concentration en albumine), le stade de la maladie et le type de mutations. D'autre part, une greffe foie-cœur est parfois pratiquée sur un patient présentant une atteinte cardiaque. En effet, si seule la greffe du foie est accomplie le pronostic de réussite est mauvais, l'atteinte cardiaque évoluant après la greffe. De nos jours, 1% des patients ont eu cette double greffe. Pour des patients atteints de problèmes rénaux, une greffe rein-foie est faite (3% des patients). Pour les patients ne pouvant pas subir une greffe, des médicaments sont en cours de développement. Le but de ces médicaments comme le Tafamidis est d'empêcher la déstabilisation de la TTR en monomères et en intermédiaires toxiques [1][12][13][14] (Figure I-3). D'autres axes de recherche biochimique sont également en cours de développement comme ceux de Pepys *et al.* qui ont développé des analogues aux substances P qui ralentissent le développement des substances amyloïdes [15].

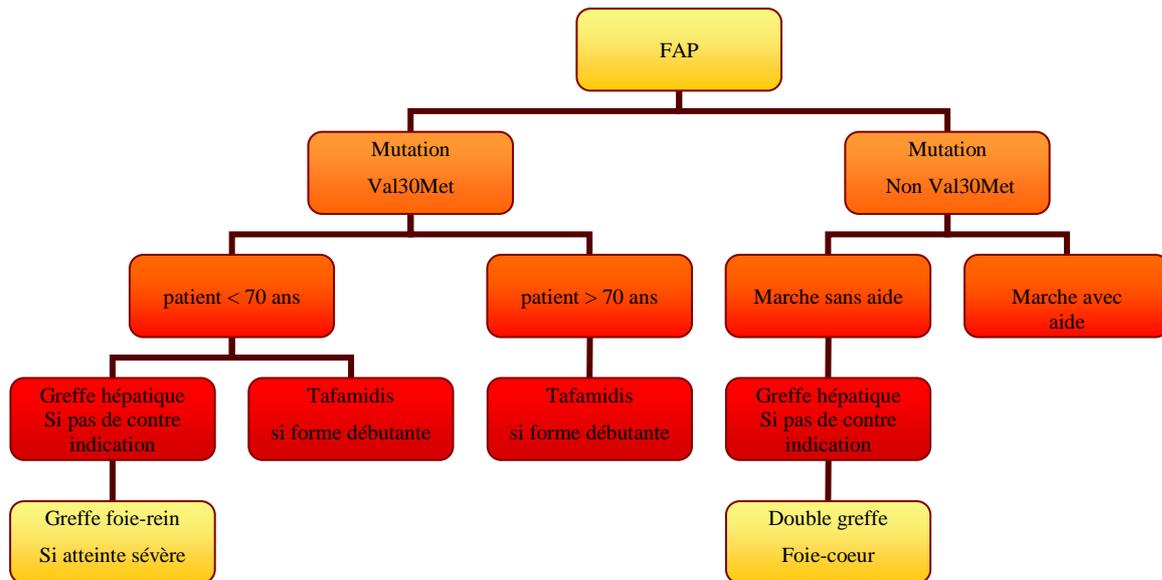


Figure I-3 : Diagramme du traitement de la FAP. Adapté de Adams *et al.* [13]

### I.1.5. Pronostic et diagnostic de la maladie.

Le pronostic vital d'un patient atteint de FAP varie selon l'âge d'apparition des premiers symptômes et le type de mutation. Celui-ci est meilleur si les symptômes arrivent tardivement. En l'absence de traitement, un décès intervient une dizaine d'années après le début des symptômes [1]. Les études de Gertz *et al.* ont montré que pour des patients présentant des symptômes neurologiques et cardiaques, la moyenne de survie était de 5,8 ans. Pour 40% des patients, le décès était dû à l'insuffisance cardiaque [16].

Dans le cadre d'une suspicion de personne atteinte de FAP, une biopsie est effectuée. Celle-ci est réalisée sur des sous-muqueuses rectales, des graisses sous-cutanées et des glandes salivaires et ne peut pas être exécutée sur un tissu pathologique. En effet les biopsies de tissus amyloïdes présentent un caractère hémorragique. Cette biopsie permet de mettre en évidence des dépôts de TTR. Les dépôts amyloïdes étant parfois minimes, plusieurs biopsies peuvent être réalisées. Les dépôts sont mis en évidence par histologie, grâce à l'utilisation de colorant tel que la coloration Rouge Congo (ou par la thioflavine T ou le bleu Alcian). Lors de l'utilisation de la coloration au Rouge Congo, la substance amyloïde présente une biréfringence verte comme sous lumière polarisée. Les biopsies nerveuses sont sensibles de 68 à 80%. Celles des glandes salivaires sont sensibles à 91% dans le cas d'une mutation TTRMet30. Ce diagnostic est confirmé par immunohistochimie. Ceci permet d'identifier le précurseur des dépôts. Cette méthode utilise des anticorps dirigés contre les protéines formant des dépôts. Elle peut être réalisée sur tous les tissus mais est cependant plus facilement

interprétable dans le cas de l'analyse d'un prélèvement de graisse sous-cutanée. Cependant cette méthode ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'une amylose à TTR mutée ou d'une amylose sénile. Cette détermination est réalisée grâce à une biologie moléculaire. Celle-ci permet le diagnostic précis de la mutation responsable. Dans ce cas deux situations sont possibles. Soit l'historique familial permet de connaître le type de mutation, soit la mutation n'est pas connue. Dans le premier cas, des tests ADN sont réalisés sur du sang, des tissus ou sur un frottis salivaire. Ceux-ci sont réalisés par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) ou par séquençage nucléotidique. Pour tester une famille dont la mutation est connue, la méthode RFLP est la plus couramment utilisée. Dans le cas où la mutation est non connue, un polymorphisme non-spécifique de l'ADN est réalisé. La type de mutation sera confirmé par RFLP [1][13]. Des techniques de diagnostic utilisant la spectrométrie de masse sont aujourd'hui développées. Ces techniques permettent l'identification des différentes formes de la TTR dans le sérum. En effet, la modification d'un acide aminé de la chaîne peptidique change la masse moléculaire de la TTR [17][18]. Cependant cette technique ne permet pas de quantification. De plus cette technique est relativement coûteuse.

Une puce microfluidique permettant la séparation et la détection des espèces mutées et natives pourrait fournir des indications sur le diagnostic. Ces espèces ne se différencient que par un seul acide aminé. Ces puces microfluidiques auront l'avantage d'utiliser un très faible volume d'échantillon. De plus, les puces microfluidiques avec un système de détection adaptée pourront être quantitatives et avoir des temps d'analyses relativement courts avec une bonne précision de mesure [19],[20].

## ***1.2. Détection d'acides aminés, de peptides ou de protéines en microsystèmes.***

Les puces microfluidiques peuvent regrouper toutes les étapes d'analyses des acides aminés : préconcentration, calibration, dérivation, séparation et la détection. De nombreuses techniques peuvent être utilisées en puce microfluidique pour la détection de molécules biologiques comme les techniques optiques, électrochimiques. Cette détection peut également se faire par spectrométrie de masse, par conductimétrie et par électrochimiluminescence. Selon les techniques de détection une étape de dérivation des molécules biologiques peut être nécessaire pour leur détection.

### **I.2.3. Détection optique**

#### **I.2.3.1 Détection par fluorescence**

La détection par fluorescence est couramment utilisée pour la détection en microsystème. Cependant, cette détection n'est pas universelle pour toutes les protéines. En effet, la plupart des protéines ne sont pas fluorescentes naturellement exceptées celles possédant des cycles aromatiques.

La plupart des détections sont réalisées par fluorescence induite par laser (LIF). Dans cette technique, un laser généralement d'argon est utilisé comme source d'excitation. Le rayon du laser est alors collecté par une lentille de microscope à travers un tube photomultiplicateur. Dans le cas d'une détection par LIF, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission (fluorescence) sont différentes. La détection par fluorescence induite par laser nécessite donc un marquage des protéines. Wang *et al.* ont utilisé la fluorescéine isothiocyanate (FITC) comme marqueur pour la détection de  $\beta$ -casomorphines avec une limite de détection de l'ordre de  $50 \text{ nmol.L}^{-1}$  [21]. D'autres agents dérivants peuvent également être utilisés comme l'orthophthalaldehyde (OPA). Celui-ci a été utilisé pour une dérivation en colonne d'acides aminés dans une puce en PDMS. La limite de détection est d'environ  $60 \text{ nM}$  [22]. Cet agent dérivant a également été utilisé par Sandin *et al.* pour l'analyse de neurotransmetteur d'un cerveau de rat avec une limite de détection de  $200 \text{ nM}$ . Pour réaliser des mesures *in vivo*, la puce utilisée a été couplée à une microdialyse [23]. Huynh *et al.* ont également couplé une puce microfluidique en PDMS avec un système de microdialyse. Ce système a été utilisé pour la détection d'acides aminés et d'un peptide après dérivation en colonne par le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) [24].

La détection peut aussi être réalisée par fluorescence induite par une diode électroluminescente (LED) [25]. Dans le cas de l'analyse d'acides aminés, une LED violette est utilisée. Les acides aminés doivent également être dérivés avant détection. Cette technique a été utilisée pour la détection d'acides aminés, après dérivation avec le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA), dans le sérum humain et dans celui du rat ainsi que dans le fluide cérébro-spinal. La limite de détection obtenue est de l'ordre de  $10^{-8} \text{ M}$ .

#### **I.2.3.2 Détection par absorbance UV**

Les protéines peuvent être détectées par absorbance UV. L'absorbance UV directe est couramment utilisée du fait de la forte absorption des protéines chromophores autour de  $280$

nm. Cette forte absorbance est due au cycle aromatique des acides aminés tyrosine, tryptophane et phénylalanine.

Dans le cas de l'utilisation de microsystèmes fabriqués à base de polymères, ceux-ci doivent être transparents pour les longueurs d'onde allant de 214 à 280 nm.

Zhu *et al.* ont étudié l'intégration de photodiodes UV dans un système microfluidique en PDMS pour la détection de la protéine albumine sérique bovine (BSA). Le signal généré par le photodétecteur est amplifié et converti en tension grâce à un amplificateur transimpédance. Des limites de détection de 15 nM et 9,8 amol ont été obtenues avec ce microsystème. L'utilisation de la loi de Beer-Lambert  $A = \epsilon C$  montre une variation linéaire de l'intensité avec la concentration en BSA [26].

#### **I.2.4. Détection par chimiluminescence (CL) et électrochimiluminescence (ECL)**

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent également être détectés par chimiluminescence et électrochimiluminescence.

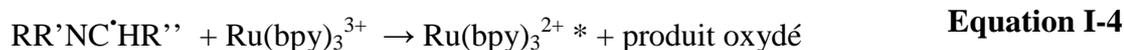
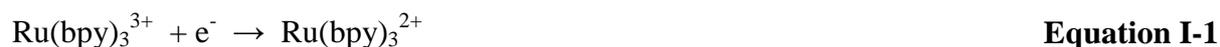
La molécule produite lors de la réaction de chimiluminescence se trouve dans un état excité. Son retour à son état fondamental provoque la production de lumière.

Zhao *et al.* ont détecté dans un microsystème en PDMS/verre trois acides aminés : le tryptophane, la glycine et l'alanine sans dérivation pré-colonne en présence de luminol. Ils ont montré que l'intensité de chimiluminescence augmente avec le pH. Le système a une limite de détection de l'ordre du micromolaire [27].

Ye *et al.* ont détecté cinq acides aminés : l'alanine, la glycine, le tryptophane, l'acide glutamique et l'arginine [28]. La détection est basée sur l'effet des acides aminés sur la réaction de chimiluminescence du luminol avec  $H_2O_2$  et  $Cu^{2+}$ . La molécule  $H_2O_2$  est l'oxydant et le cation  $Cu^{2+}$  un catalyseur. L'augmentation du pouvoir catalytique de  $Cu^{2+}$  après interaction avec des acides aminés est due à la formation de complexe  $Cu^{2+}$ -acide aminé.

Dans le cas de l'électrochimiluminescence, la luminescence est produite durant une réaction chimique en solution. Cette détection présente l'avantage par rapport à la chimiluminescence de générer la luminescence dans une zone localisée sur la surface de l'électrode et de pouvoir contrôler cette réaction en modifiant le potentiel appliqué. L'électrochimiluminescence présente également l'avantage par rapport à la fluorescence de ne pas nécessiter l'utilisation d'une source lumineuse, et donc d'avoir une instrumentation plus simple. De plus, cette technique permet d'avoir un bruit de fond très faible, voir nul.

Qiu *et al.* ont réalisé la détection de la proline en se basant sur l'électrochimiluminescence du tris(2,2'-bipyridil)-ruthénium (II) ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) dans une puce microfluidique en PDMS avec une limite de détection de 1,2  $\mu\text{M}$  [29]. Dans cette étude l'électrode est en étain dopé à l'indium (ITO : Indium Tin Oxide). Ils ont montré que les valeurs importantes de champs électriques n'avaient pas d'influence sur le détecteur ECL. L'électrochimiluminescence est causée par la réaction de l'acide aminé avec le  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  après que le  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ait été oxydé. Le mécanisme d'ECL peut être exprimé selon la réaction :



### I.2.5. Détection par conductimétrie

La détection par conductimétrie permet de s'affranchir de l'étape de marquage cependant les limites de détection sont généralement moins bonnes que celles obtenues par détection électrochimique ou par fluorescence. De plus, l'utilisation en mode non-contact des microélectrodes permet d'avoir une stabilité du détecteur, contrairement au détecteur en mode contact avec où le vieillissement ou détérioration reste un inconvénient majeur.

Gallaway *et al.* ont développé une puce microfluidique en polyméthylméthacrylate (PMMA) pour la détection de molécule mono ou polyanionique. La détection est réalisée par conductivité en mode contact à l'aide d'électrode en platine. Une limite de détection de 8 nM est obtenue pour l'alanine [30]. Shadpour *et al.* ont réalisé la détection de peptides, d'acides aminés et de protéines dans une puce microfluidique en polycarbonate à 16 canaux. La détection est également réalisée en mode contact à l'aide d'électrode d'or. Dans leurs conditions d'analyses, la limite de détection pour l'alanine est de 7,1  $\mu\text{M}$  [31].

La plupart des détections par conductimétrie dans les microsystèmes sont réalisées en mode non contact. Ce type de détection est fait sans marquage préalable. La détection de 12 acides aminés et de peptides a été réalisée dans un microsystème en (PMMA) dans une

géométrie « double T » [32]. Cette même équipe a détecté l'immoglobuline humaine M (IgM) avec une limite de détection de 34 ng/mol, comparable à celle obtenue par une détection ampérométrique [33]. Liang-Bo *et al.* ont effectué la détection de l'albumine sérique humaine (HSA) et de la transferrine humaine dans des échantillons d'urine dans une puce microfluidique en verre-PDMS [34]. La détection de 12 acides aminés dans une puce en verre a été optimisée par Tanyanyiwa *et al* [35]. Cette détection a été opérée dans un milieu acide (pH = 2,5) et puis basique. Dans le premier cas, la limite de détection des acides aminés est de  $10^{-5}$  M sauf pour trois acides aminés (la lysine, l'arginine et l'histidine) où elle est de  $10^{-7}$  M. Lorsque l'étude est réalisée en milieu basique (pH = 10,5), la ligne de base est plus stable et la sensibilité est meilleure. En effet la limite de détection tombe à  $10^{-6}$  M. La détection de la protéine  $\beta$ -lactoglobuline a été réalisée par Gamby *et al.* dans une puce microfluidique en polyéthylène terephthalate (PET). Pour cela, la surface du PET est fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or (NPs-Au) et de la Poly(L-lysine) (PLL). La protéine est adsorbée sur une interface fonctionnalisée PET/NPs-Au/PLL. La détection de la  $\beta$ -latoglobuline est réalisée par admittance en mode non contact avec une limite de détection de  $4,5 \cdot 10^{-16}$  M [36]. Faure *et al.* ont aussi utilisé une géométrie de microélectrodes en non-contact dans une puce en PET pour suivre la cinétique enzymatique d'hydrolyse de monoesterphosphate catalysée par l'alcaline phosphatase (ALP). Il a été montré que la stratégie utilisant le non contact tout aussi sensible et sélective qu'une géométrie de microélectrodes en contact. En effet, une limite de détection de  $10 \times 10^{-15}$  M en ALP a été trouvée [37].

### **I.2.6. Détection par spectrométrie de masse.**

Beaucoup d'analyses de protéines en microsystème utilisent une détection couplée à un spectromètre de masse.

Kim *et al.* ont microfabriqué un système ionisation electrospray (ESI ) à 16 canaux dans une puce microfluidique en PDMS. Cette puce couplée à un spectromètre de masse a permis la détection de peptide (angiotensin I et III) avec une limite de détection de 1  $\mu$ M [38]. Gobry *et al.* ont également réalisé le couplage d'une puce microfluidique en polymère avec un spectromètre de masse à ionisation électrospray. Le nanospray est directement produit à la sortie de la puce microfluidique positionnée à l'entrée du capillaire du spectromètre de masse. Dans ces conditions, aucun signal du polymère n'est observé et une limite de détection pour l'angiotensin II de 40 fmol/ $\mu$ L est obtenue [39]. Lion *et al.* ont créé une procédure de désalage des échantillons pour le couplage d'une puce microfluidique avec le spectromètre de masse.

Les protéines sont adsorbées sur une membrane en poly(vinylidène difluoride) (PVDF). Lorsque le spray est appliqué, les protéines sont éluées et préconcentrées. Ce système a été appliqué sur des drogues, des peptides et des protéines dilués dans un tampon phosphate [40], [41].

Plusieurs études ont permis la détection de peptides par spectroscopie de masse avec une ionisation électrospray après digestion de protéines dans la puce microfluidique et leur séparation par électrophorèse capillaire [42],[43]. L'identification de la protéine peut se faire en une minute [42]. D'autres études réalisent l'analyse de protéines avec un système MS/MS avec une ionisation électrospray [44],[45],[46]. Figeys *et al.* montrent que la limite de détection est alors de  $5 \text{ fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  [45]. Fritzche *et al.* ont couplé une puce microfluidique avec un spectromètre de masse à temps de vol avec une ionisation électrospray. Ce système permet la séparation électrophorétique et l'établissement du spectre de masse en 1 seconde [47]. Li *et al.* ont couplé une puce microfluidique en verre avec un spectromètre de masse à temps de vol quadripole avec une ionisation électrospray pour la séparation et la détection de différents peptides [48]. Des métabolites de drogues et des biomarqueurs ont été caractérisés en utilisant une puce microfluidique avec une nanochromatographie liquide intégrée et couplée à un spectromètre de masse [49]. Girault *et al.* ont développé le marquage électrochimique des cystéines des protéines à l'aide d'une puce microfluidique couplée avec un spectromètre de masse à ionisation électrospray. L'application d'une tension entraîne l'oxydation de l'hydroquinone en benzoquinone qui elle-même réagit avec les groupements cystéines pour former une hydroquinone-cystéine [50–52].

### **I.2.7. Détection électrochimique**

La détection électrochimique la plus couramment utilisée en microsystème est la détection ampérométrique. Pour une détection par ampérométrie, le courant de transfert d'électrons suite à la réaction faradique est utilisé pour détecter l'espèce produite. Pour cela, un potentiel d'oxydation ou de réduction de l'espèce électroactive d'intérêt est appliqué. Le potentiel appliqué doit être optimisé pour améliorer la sélectivité de la détection. Le signal obtenu est proportionnel à la concentration. Cependant cette technique de détection, en utilisation directe, n'est applicable que pour des espèces électroactives, ou qui nécessitent un marquage préalable pour les rendre électroactives.

#### **I.2.7.1 Détection sans marquage préalable**

Xu *et al.* ont étudié la détection d'acides aminés non électroactifs par ampérométrie indirecte. Ils ont montré que la différence de potentiel induit par le champ électrique de séparation de l'électrophorèse capillaire provoque le changement de potentiel de réduction de l'oxygène dissout et permet de détecter des espèces non électroactives. La différenciation des espèces électroactives et non électroactives peut se faire en modifiant le potentiel de détection [53]. La détection peut être réalisée pour des concentrations en acides aminés de 500  $\mu\text{M}$  à 5,0 mM avec une limite de détection de 10  $\mu\text{M}$ . Cependant cette technique n'a pas été appliquée à la détection de peptide ou de protéine.

La détection par ampérométrie dans un microsysteme à deux électrodes en cuivre de 3 acides aminés a été faite par Scharwz *et al.*[54]. Dans un environnement neutre ou basique, les acides aminés forment des complexes chélatés stables. La production des ions Cu(II) à la surface des électrodes de cuivre entraîne l'apparition d'un courant. Ils ont également montré que les résultats obtenus sont similaires à ceux dans un système capillaire conventionnelle avec une détection ampérométrique [55][56].

Wang *et al.* ont étudié la détection d'acides aminés dans une puce microfluidique avec une électrode composite de nanotubes de carbone/cuivre par ampérométrie. L'utilisation de ces composites permet d'améliorer le signal comparé au signal obtenu avec des électrodes de cuivre ou de nanotubes de carbone seul. De plus, ces électrodes sont moins sensibles à la passivation. La détection de carbohydrate et d'acides aminés est effectuée à +0,50V vs Ag/AgCl. Une limite de détection de 20  $\mu\text{M}$  d'acide gluconique a été obtenue [57].

### **I.2.7.2 Détection avec marquage préalable**

Wang *et al.* ont réalisé le marquage d'acides aminés et d'un peptide pour former un produit électroactif qui peut par la suite être détectable par ampérométrie [58]. La même équipe a fabriqué une puce en verre permettant de réaliser la dérivation électrochimique, la séparation électrophorétique ainsi que la détection ampérométrique de huit acides aminés avec une limite de détection de l'ordre de  $10^{-6}$  M avec une bonne reproductibilité (écart type de 2,2 à 2,7%) [59]. Cependant ces deux expériences ont permis de détecter des acides aminés ou des petits peptides.

## ***I.3. Contrôle de la charge de surface dans un microcannal.***

Pour optimiser la séparation en canal microfluidique, un contrôle précis de la charge de surface du microcanal est nécessaire. De nos jours, le contrôle de la charge de surface se fait généralement par voie chimique. La surface du canal est alors traitée grâce à des revêtements physisorbés ou chimisorbés. Pour cela des chaînes polymériques ou brosses polymériques sont introduits dans le canal pour interagir avec celui-ci. Cependant ces fonctionnalisations entraînent ou favorisent une adsorption non spécifique des analytes sur la surface. Un simple revêtement de surface ne permet pas de contrôler la charge de surface et de limiter l'adsorption des analytes [60–62]. Pour palier ce problème, Plecis *et al.* ont montré que ce contrôle de charge de surface pouvait se faire également de façon active en utilisant une interface polarisable [63].

### I.3.3.1 Interfaces polarisables

Une interface polarisable est une interface pour laquelle l'application d'une tension différente de la tension d'équilibre n'entraîne pas de changement de composition chimique des phases en contact, c'est-à-dire sans passage de courant faradique (Figure I-4). L'interface est polarisable et donc aucun courant ne sera observé jusqu'au potentiel où une réduction ou une oxydation auront lieu. Cette zone est appelée fenêtre de polarisabilité.

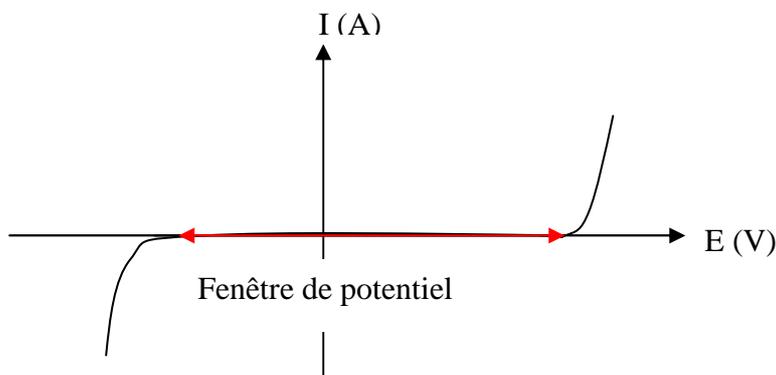


Figure I-4 : Fenêtre de polarisabilité d'une électrode.

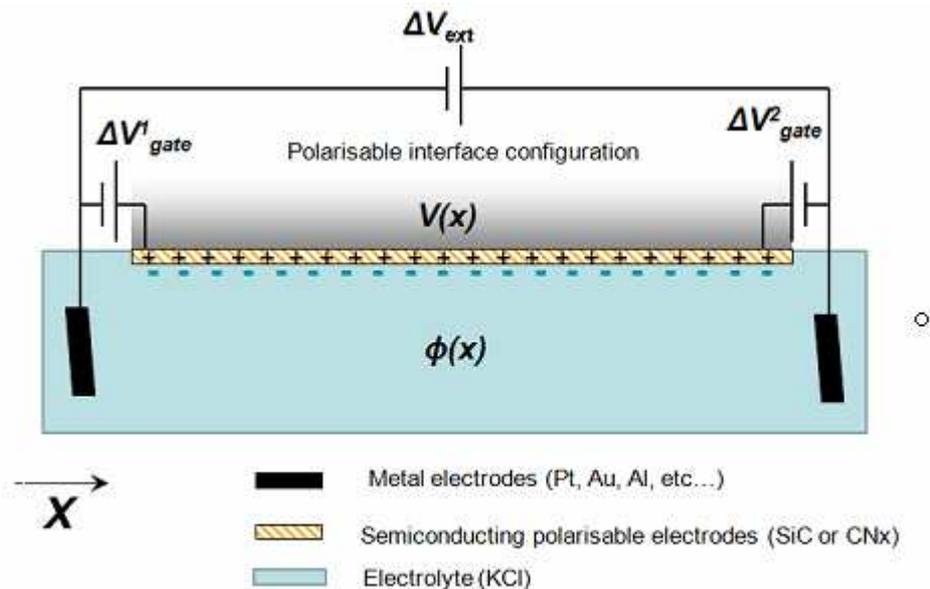
### I.3.3.2 Contrôle du flux électroosmotique (FEO)

Les interfaces polarisables intégrées dans le microsystème sur la surface interne des microcanaux permettent d'ajuster le flux électroosmotique (FEO) indépendamment des conditions d'analyse et du traitement de surface du dispositif. Ces interfaces polarisables

électriquement vont permettre un contrôle fin de la charge de surface et favoriser la séparation hautement résolue de biomolécules ayant des mobilités électrophorétiques trop proches.

### ***I.3.3.2.1 Premières expériences du contrôle du FEO grâce à une interface polarisable.***

L'efficacité du contrôle du FEO grâce à une interface polarisable a été démontrée par Plecis *et al.* les études réalisées dans la configuration d'un pont Wheastone  $\mu$ fluidique (PWF) [63]. C'est à cette époque qu'une collaboration avec le LISE a commencée. En effet, le carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>) de part ses propriétés, sur lesquelles je reviendrai, c'est révélé être un candidat idéal. Dans cette étude, deux matériaux comme interface polarisable ont été testés : le carbure de silicium (SiC) et l'aluminium. Les interfaces polarisables sont directement en contact avec la solution (Figure I-5).



**Figure I-5 : Microcanal dans le cas d'une interface polarisable [63].**

Dans cette configuration, le contrôle du potentiel zêta est réalisé en appliquant directement une différence de potentiel entre la couche conductrice et l'électrolyte en contact. La couche conductrice étant une interface polarisable, le potentiel faradique est négligeable tant que la surtension reste dans la fenêtre de potentiel  $|\gamma| < \gamma_0$ . La surtension est contrôlée en appliquant une différence de potentiel,  $\Delta V_{gate}$ , d'avec l'électrode externe, ce qui instaure un potentiel homogène le long de cette interface. Lorsque le gradient de potentiel est appliqué le long du canal, une surtension constante peut être instaurée et donc un potentiel de surface homogène le long de cette interface.

La variation locale du potentiel zêta est donc directement proportionnelle à la surtension  $\gamma$  et la capacité de la couche de Stern  $C_s$  est supérieure à la capacité de la couche de diffusion électrique  $C_{EDL}$ .

$$\Delta\zeta_{PI}(\gamma) = \frac{C_s}{C_s + C_{EDL}}(\gamma) \approx \gamma \quad \text{Equation I-6}$$

$$\Delta\zeta_{PI}(\gamma) \approx \Delta V_{gate} \quad \text{Equation I-7}$$

Les expériences menées en utilisant une interface en SiC ont montré une dépendance linéaire de la mobilité en fonction de la surtension appliquée pour de faibles valeurs de surtension. Dans le cas où la valeur de la surtension est proche d'une borne de la fenêtre de potentiel, le contrôle du FEO est limité et l'interface se détériore. Dans les cas d'une force ionique importante, les interfaces en Al et a-CNx montrent une plus forte détérioration que les interfaces SiC. Il a été montré que le contrôle du flux électroosmotique augmente avec la conductivité de l'électrolyte, la conductivité des interfaces et leur polarisabilité. Cette étude a permis de vérifier que le a-CNx est le matériau le plus prometteur pour le contrôle du flux électroosmotique. En effet, pour des concentrations en KCl de 100  $\mu\text{M}$ , le contrôle du FEO est meilleur lors de l'utilisation des interfaces en a-CNx par rapport aux deux autres matériaux. Le contrôle du FEO augmentant avec la polarisabilité des matériaux, il est normal que le matériau le plus polarisable (le a-CNx) donne les meilleurs résultats.

La longueur de contrôle  $L\gamma$  peut être exprimée comme un ratio des résistances « virtuelles » comprenant la résistance de transfert de charge faradique,  $R_t$ , la résistance électrique de l'interface polarisable,  $R_I$ , et la résistance électrique du microcanal,  $R_C$ .

$$L\gamma = \sqrt{\frac{R_t}{R_I + R_C}} \quad \text{Equation I-8}$$

avec

$$R_t = \frac{\gamma_0}{I_0} \quad R_I = \frac{1}{S_I \sigma_I} \quad R_C = \frac{1}{S_C \sigma_C}$$

$I_0$  est le courant relatif à la densité de courant d'échange,  $\sigma_c$  et  $\sigma_I$  sont respectivement les conductivités électriques du microcanal et de l'interface polarisable. La section de l'électrolyte dans le microcanal et celle de l'interface polarisable sont respectivement  $S_c$  et  $S_I$ . Cette longueur de contrôle augmente avec la résistance de transfert faradique et avec la conductivité de l'électrolyte.

Cependant, les détériorations observées étaient plutôt dues aux conditions non optimisées du a-CNx sur verre ainsi qu'une électronique non adaptée pour mesurer de façon précise le potentiel aux interfaces.

### ***1.3.3.2 Amélioration apporter au montage PWF***

L'ANR DIpositifs MIcrofluidiques à interfaces POLarisables pour des séparations Electrophorétiques de haute résolution (DIMIPOLE) a pour but d'améliorer la modulation en temps réel de la charge de surface du canal. Cette ANR à trois partenaires : le laboratoire photonique et nanostructures (LPN), le laboratoire des protéines et nanotechnologie en sciences séparatives (LPNSS) et le laboratoire interfaces et systèmes électrochimiques (LISE)

Pour déterminer la valeur de la mobilité électrophorétique de la surface, la différence de potentiel entre les électrodes latérales et celle à l'entrée du canal doit être connue. Pour ceci des électrodes de référence en platine associées à des potentiostats suiveurs de tension réalisés au LISE par Daniel Rose sont introduites à l'entrée du microcanal. Ceci permet de connaître précisément le potentiel du liquide à chaque extrémité du microcanal central.

Un nouveau banc expérimental pour le PWF a été mis au point LPN comprenant : des nouvelles géométries de puces, des conditions optimisées pour le a-CNx, et des appareillages pour une électronique adaptée développés au LISE. Pour des raisons de confidentialités (demande de brevet en cours), je ne m'étendrai pas sur les nouveaux résultats obtenus au LPN.

Le carbone amorphe azoté a-CNx étant le matériau que j'ai optimisé dans ma thèse pour deux applications différentes et complémentaires en puce microfluidique: le contrôle du FEO, et la détection électrochimique, un résumé non exhaustif de ses propriétés et de ses applications est présenté dans le chapitre suivant.

## ***I.4. Couches minces de carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>)***

### **I.4.3. Le carbone dopé à l'azote.**

Le carbone possède 4 électrons de valence tandis que l'azote en possède 5. L'azote est donc en position de donneur et constitue un dopant de type n.

#### **I.4.3.1 Liaison de l'azote dans le carbone azoté.**

Dans les dépôts de carbone azoté, plusieurs configurations de liaisons carbone-azote sont possibles, il peut se former trois types de liaisons  $sp^3$ , cinq types de liaisons  $sp^2$  et une liaison  $sp^1$  [64].

Dans la configuration trivalente  $N_3$ , l'azote forme trois liaisons  $\sigma$  et possède un doublet libre (Figure I-6a). Si l'azote engage 4 électrons dans des liaisons  $\sigma$  et possède un électron libre, la configuration est de type  $N_4^+$  (Figure I-6b). La présence d'un azote va favoriser les liaisons intercouches. La substitution d'un carbone  $sp^2$  entraîne la rupture de la liaison  $\pi$  et permet de former une liaison  $\sigma$  avec la couche adjacente (Figure I-6 c).

L'azote peut également se substituer au carbone dans un benzène pour donner une configuration où l'azote est engagé dans une liaison  $\pi$ , deux liaisons  $\sigma$  et possède un électron libre (Figure I-6 d). La Figure I-6e, montre qu'il peut également former une configuration type pyridine, ou former un cycle à cinq atomes type pyrrole (Figure I-6 f). Dans cette dernière configuration, l'azote utilise trois électrons dans des liaisons  $\sigma$  et possède deux électrons libres. L'azote peut également utiliser un électron dans une liaison  $\sigma$ , un électron dans une liaison  $\pi$  et garder un doublet libre (Figure I-6 g). Dans la dernière configuration type  $sp^2$  (Figure I-6 h), l'azote peut engager deux électrons dans des liaisons  $\sigma$ , un électron dans une liaison  $\pi$  et garder un électron libre.

L'azote peut également former des liaisons type  $sp^1$  en engageant trois électrons dans une triple liaison et garder un doublet libre.

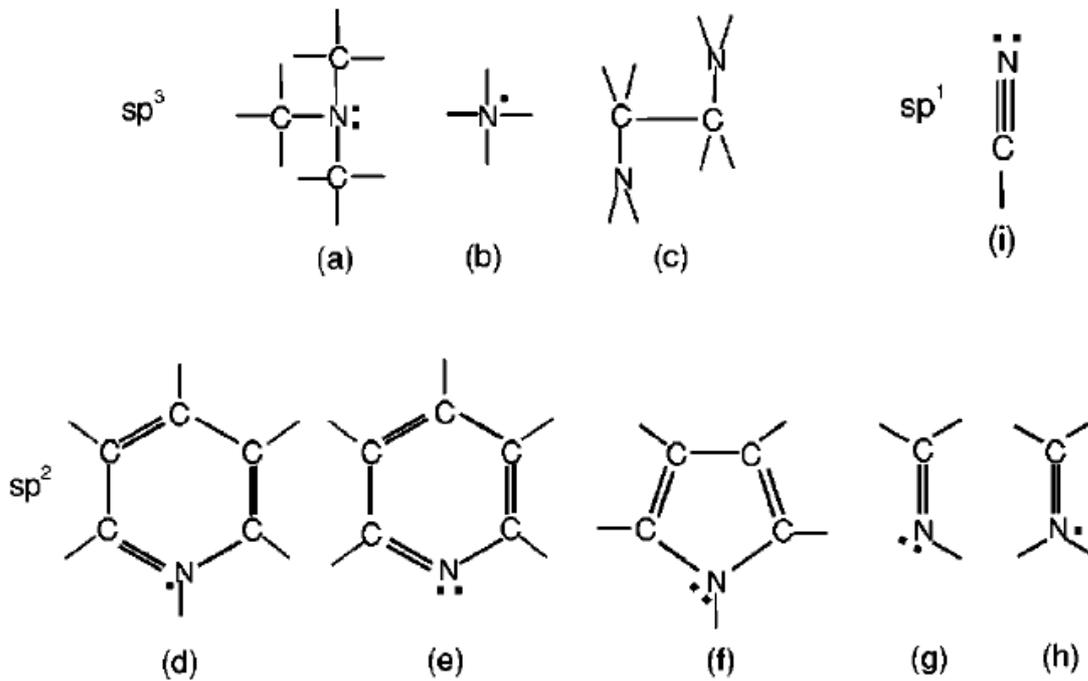


Figure I-6 : Différents types de liaisons carbone azote [65]

### I.4.3.2 Différents types de dépôts azotés

Quatre types de film de carbone azoté peuvent être rencontrés, deux sans hydrogène et deux avec de l'hydrogène [64]. La Figure I-7, montre les diagrammes ternaires des différents types de couche en fonction du pourcentage de  $sp^2$  et du pourcentage d'azote dans le cas non hydrogéné et dans le cas hydrogéné.

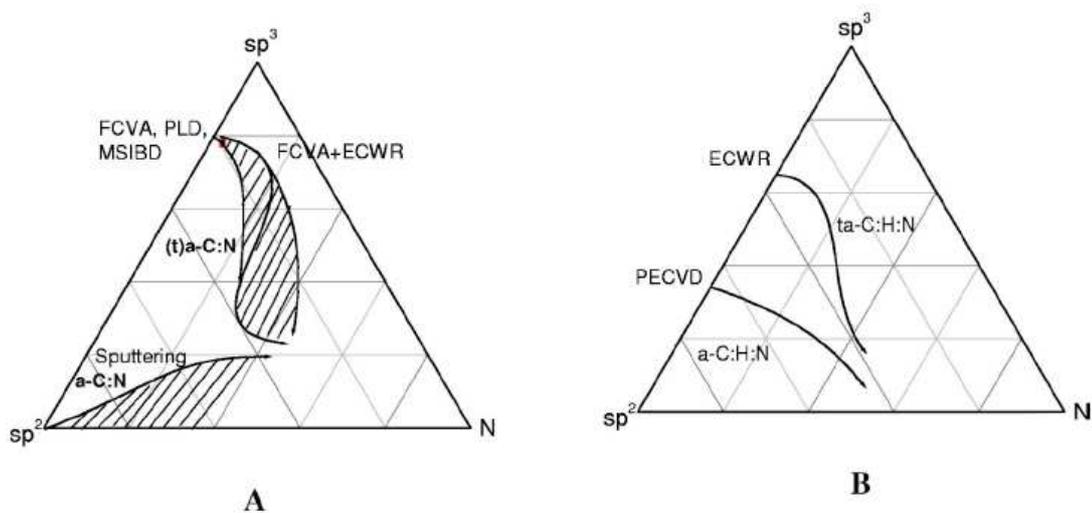


Figure I-7 : Diagramme binaire. A) pour des couches non hydrogénées. B) pour des couches hydrogénées [64].

Quatre types de films de carbone azoté peuvent être obtenus (deux types de films non hydrogénés et deux types de films hydrogénés) :

a-CN : le carbone amorphe azoté possède une grande proportion de  $sp^2$ .

ta-CN : le carbone amorphe tétraédrique. Ce film est obtenu pour des pourcentages d'azote dans le film inférieurs à 12%, les liaisons  $sp^3$  sont présentes à hauteur de 80 à 90%.

a-CHN: le carbone amorphe azoté hydrogéné. Ces films sont généralement réalisés par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma.

ta-CHN : le carbone amorphe azoté hydrogéné tétraédrique.

#### **I.4.4. Différentes méthodes de synthèse des couches de carbone azoté amorphe**

Il existe différentes méthodes pour synthétiser les couches de carbone amorphes. Cette grande variété de procédés possibles entraîne des propriétés différentes pour chaque conditions et techniques de dépôts. Alibert *et al.* ont comparé les propriétés des films de CNx selon la technique de dépôt [65]. D'autre part, les paramètres de déposition (température du substrat, pression des gaz...) ont également une influence sur les propriétés des films. Les techniques de dépôt peuvent être classées en deux familles : les dépôts chimiques en phase vapeur (CVD) et les dépôts physiques en phase vapeur (PVD).

##### **I.4.4.1 Dépôts CVD**

Les films de CNx sont déposés par voie chimique assistée par PECVD (plasma enhanced chemical vapor deposition). Ces dépôts sont effectués à l'aide d'un générateur radiofréquence. Les films de a-CNx peuvent être réalisés avec du méthane  $CH_4$  et de l'azote  $N_2$  comme gaz précurseurs [66]. Ils peuvent également être obtenus avec une cible graphique et un gaz précurseur  $N_2$  [67]. Les dépôts peuvent être effectués à température ambiante ou en chauffant.

##### **I.4.4.2 Dépôts PVD**

Cette famille de dépôts englobe plusieurs techniques de fabrication :

- la photoablation laser pulsée (PLD). Zheng *et al.* ont déposé sur de l'acier par cette technique à partir d'une cible de graphite avec un laser KrF sous flux d'azote [68],
- les techniques par faisceaux d'ions (IBAD). Les couches de a-CNx peuvent être réalisées avec des faisceaux alternatifs de carbone et d'azote [69], où un

bombardement de la cible de graphite avec par un flux d'azote d'une énergie de 3 keV [70]. Elles peuvent être également faites par évaporation de la cible de carbone par un faisceau d'ions accompagné d'un bombardement du substrat par un flux d'azote [71] [72],

- les techniques de pulvérisation cathodique. Les films de a-CN<sub>x</sub> sont réalisés par pulvérisation cathodique en courant continu ou en radiofréquence à 13,56 MHz. [73][74][75].

Nos dépôts seront effectués par pulvérisation cathodique magnétron en courant continu. Cette technique sera explicitée au chapitre II.2.

## **I.4.5. Propriétés générales des couches de carbone dopé à l'azote**

### **I.4.5.1 Propriété mécanique**

Selon les conditions et techniques de dépôt, les couches de a-CN<sub>x</sub> possèdent une valeur de dureté allant de 7 à 36 GPa [66] [76] [77][67].

L'origine du stress sur la surface de l'échantillon sur lequel les films de a-CN<sub>x</sub> déposés par pulvérisation magnétique radio fréquence (RF) est étudiée par Durand-Drouhin *et al.* [76]. Ils ont montré que le stress intrinsèque résulte de la compétition entre un stress extensible dû à la technique de dépôt et à un stress compressible dû à l'inclusion d'azote et de vapeur d'eau dans le film.

Kim *et al.* [66] ont également montré que la dureté des dépôts de a-CN<sub>x</sub> diminue avec le pourcentage d'azote. Cette diminution est expliquée par l'augmentation de l'incorporation d'atomes dans le film qui entraîne la graphitisation. La dureté est liée au nombre de liaison sp<sup>3</sup>. Plus ces liaisons sont importantes plus la dureté est grande. Les études de Gilvarry *et al.* ont également montré une dépendance de la dureté avec le pourcentage d'azote [77].

### **I.4.5.2 Propriété tribologique**

Des valeurs de coefficient de friction des films de a-CN<sub>x</sub> sont référencées dans le Tableau I-1.

Auteur	Méthode de dépôts	substrat	Valeur de coefficient de friction
Kato [789]	par faisceaux d'ions	Si	0,001 dans N <sub>2</sub> 0,2 dans l'air

			0,4 dans O <sub>2</sub>
Wei [79]	par faisceaux d'ions	Acier 316L	0,25 dans l'air
Yasui [80]	Photo ablation laser	Acier AISI304	0,072 dans l'air
Zhou [712]	par faisceaux d'ions	Si <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	0,04 dans l'eau
Wang [81]	RF PECVD	Si(100)	0,17 -0,19 dans l'air 0,33-0,42 dans N <sub>2</sub>

**Tableau I-1: Valeurs des coefficients de friction selon la techniques de dépôts et le substrat.**

Tous ces dépôts de a-CN<sub>x</sub> présentent des valeurs basses de coefficients de friction. D'autre part, le coefficient de friction varie dans le même sens que le ratio  $sp^2/sp^3$  [79]. Ce coefficient diminue avec la puissance du générateur radiofréquence et la température du substrat et également lorsque l'on augmente la pression lors du dépôt [68]. Cependant, les études de Wang *et al.* ont montré une faible dépendance entre les valeurs de friction et le ratio N<sub>2</sub>/Ar [81].

### I.4.5.3 Propriété optique

Le gap optique des films de a-CN<sub>x</sub> est attribué à la transition entre les états faiblement localisés des états  $\pi$ -  $\pi^*$  qui proviennent des configurations  $sp^2$  [65]. Les valeurs de E<sub>g</sub> varient de 0,5 à 2,1eV selon les études [65] [67] [82].

Cameron *et al.* ont montré que les films hydrogénés possèdent un gap optique plus important. En effet, une augmentation du gap optique de 0,1 à 1eV lorsque le pourcentage d'hydrogène augmente de 0 à 17% dans le film de carbone azoté a été observée. De plus, l'incorporation d'azote dans ces films de 0 à 14% n'entraîne pas une modification de ce gap optique. Les dépôts réalisés sans hydrogène possèdent une valeur du gap optique proche de 0. Cette étude suppose que l'azote joue un rôle moindre dans la valeur du gap optique [82].

Les films déposés par PECVD sur Si montrent que le gap optique augmente lorsque l'on augmente la pression partielle en N<sub>2</sub> [67].

Cependant, pour les films de a-CN<sub>x</sub> déposés sur silice (Si(100)) par pulvérisation magnétique magnétron en courant continu (DC), la valeur de E<sub>g</sub> diminue lorsqu'on augmente le pourcentage de N<sub>2</sub> (en moles) jusqu' à 3% puis reste constante. Cette diminution est liée à l'augmentation de la taille des clusters  $sp^2$  [65].

#### I.4.5.4 Propriété électrochimique

Le a-CN<sub>x</sub> présente de bons avantages pour son utilisation comme matériau d'électrodes. En effet, il possède une large fenêtre de potentiel supérieure à 3 V [73]. Le LISE a étudié la réactivité électrochimique des films de CN<sub>x</sub> sur Si dopé n et p en présence de ferricyanure/ ferrocyanure de potassium [83]. Cette étude a montré que la réactivité électrochimique dépend du pourcentage d'azote dans le film. En effet, la réactivité électrochimique diminue lorsque le pourcentage d'azote augmente dans les films. La réactivité électrochimique peut être augmentée en réalisant un prétraitement électrochimique dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La différence de potentiel est égale alors à 72 mV pour une constante  $k_0$  de  $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  après traitement alors que cette différence vaut 320 mV avant traitement. Des études par spectroscopie d'impédance électrochimique ont également été effectuées et ont permis de déterminer un circuit équivalent pour l'interface a-CN<sub>x</sub>/ Electrolyte [84].

Cette réactivité électrochimique dépend de la composition chimique en surface et notamment du nombre de liaisons CN sp<sup>3</sup>. En effet, les travaux menés par Cachet et *al.*, ont montré que les liaisons sp<sup>3</sup> agissent comme des sites isolants. L'augmentation de la réactivité électrochimique après activation électrochimique est due à la modification de la composition surfacique atomique des films de carbone. En effet, avant traitement les analyses XPS ont montré un pourcentage en carbone et en azote de respectivement 87% et 13%, ce pourcentage devient 91% en carbone et 9% en azote après traitement [85].

L'étude par spectroscopie d'impédance électrochimique sur des films de a-CN<sub>x</sub> déposés par pulvérisation cathodique RF a montré une dépendance de la résistance de transfert de charge en fonction du protocole de prétraitement des électrodes. En effet, la valeur de la résistance de transfert de charge est maximale au potentiel de circuit ouvert lorsqu'on modifie le potentiel pour lequel sont réalisés les spectres d'impédances électrochimiques des valeurs positives vers les potentiels négatifs. La résistance de transfert de charge est cependant très peu modifiée lorsque le potentiel varie des potentiels négatifs vers les potentiels positifs. Cette étude tend à montrer qu'un prétraitement cathodique en milieu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> augmente la réactivité électrochimique comme c'est le cas pour les électrodes diamant dopées bore [86].

Adamopoulos *et al.* ont montré une réponse différente de l'électrode selon les substrats, silicium, titane, acier. La réactivité électrochimique et l'adhérence des dépôts dépendent du substrat utilisé [83].

### **I.4.5.5 Résistance à la corrosion**

Le comportement des films de a-CN<sub>x</sub> déposé sur p-Si(100) par pulvérisation magnétron en courant continu vis-à-vis de la corrosion est étudié dans une solution de NaCl 0,6M. Les caractéristiques d'anti-corrosion dépendent de la structure des films et notamment de leur proportion en liaisons sp<sup>3</sup>. Une augmentation du rapport sp<sup>2</sup>/sp<sup>3</sup> entraîne une corrosion galvanique plus importante [87]. Cette tendance est en accord avec celle observée par Shi *et al.* [88].

### **I.4.5.6 Propriété électrique**

Derradji *et al.* ont étudié les variations de la résistivité avec le pourcentage d'azote. Les faibles valeurs de résistivité sont dues à la forte proportion de C sp<sup>2</sup>. Cette étude montre une diminution de la résistivité jusqu'à 12% en azote puis une augmentation de celle-ci. D'autre part, une diminution de la résistivité est observée avec l'augmentation de la température. Les films présentent un comportement semi-conducteur et la dépendance en température induit deux types de conduction. Pour des températures inférieures à 200K, le mécanisme de conduction est en accord avec le modèle de Mott. Aux fortes températures, la conduction est due aux charges excitées dans les états délocalisés [74].

Alibart *et al.* ont étudié des films de a-CN<sub>x</sub> sur Si(100) déposés par pulvérisation cathodique radiofréquence (RF) et en courant continu (DC). Les films déposés par pulvérisation cathodique DC et RF présentent une augmentation de la conductivité avec le pourcentage molaire en N<sub>2</sub> jusqu'à 2% en moles de N<sub>2</sub>. Pour les valeurs les importantes de pourcentage molaire, une stagnation de la conductivité est observée en pulvérisation DC tandis qu'une diminution de conductivité est obtenue en RF [65].

Les dépôts réalisés par pulvérisation cathodique RF par Demichalis *et al.* montrent une diminution de la conduction de 10<sup>-3</sup> à 10<sup>-11</sup> Ω<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> lorsqu'on augmente la pression partielle de N<sub>2</sub> de 0,6 à 3,3 Pa pour des films de a-CN<sub>x</sub> déposés sur silicium cristallin par PECVD [67].

Du fait de leurs caractéristiques électriques, les films de a-CN<sub>x</sub> sont considérés comme des matériaux semi-conducteurs [89]. Les mesures de Mott-Schottky dans une solution électrolytique montre que le CN<sub>x</sub> est un semi-conducteur de type n. De plus, cette étude a montré que les meilleures propriétés des films de CN<sub>x</sub> sont obtenues pour des films déposés à haute puissance et pour un pourcentage d'azote élevé dans le gaz.

#### **I.4.5.7 Biocompatibilité des films.**

Carrero-Sanchez *et al.* ont comparé la toxicité des tubes de carbone et des tubes de a-CN<sub>x</sub> [90]. Cette étude a montré que les nanotubes de CN<sub>x</sub> sont mieux tolérés que les nanotubes purement carbone.

La biocompatibilité des films de a-CHN sur Si(100) a été étudiée par Yang *et al.* [91]. Aucune toxicité des films n'a été observée. De plus, de meilleures propriétés antithrombotiques ont été obtenues pour les films de a-CHN comparés aux films de a-CH. L'incorporation d'azote dans des films de carbone augmente donc la biocompatibilité de ceux-ci. De même Zhao *et al.* ont montré que la biocompatibilité de nanotubes de carbone été modifiée en fonction du pourcentage d'azote. Les dépôts avec un ratio sp<sup>2</sup>C-N/sp<sup>3</sup>C-N important stimulent la prolifération des cellules et augmentent de temps de recalcification [92].

Wang *et al.* ont déposé des films de a-CN<sub>x</sub> sur des alliages biomédicaux de NiTi. Ces dépôts sont comparés à des dépôts de Ti/TiN. Les films de CN<sub>x</sub> présentent la biocompatibilité sanguine la plus importante et les meilleures propriétés antithrombotiques. Ceci rend les films de CN<sub>x</sub> très prometteurs pour des applications médicales [93].

L'adsorption de l'albumine humaine (HSA) sur CN<sub>x</sub> déposé sur Si a été étudiée par Berlind *et al.* Cette étude montre une plus grande adsorption des protéines pour des films azotés amorphes que pour des films nanostructurés [75].

#### **I.4.6. Application des couches de carbone amorphe azoté**

Les différentes propriétés du a-CN<sub>x</sub> permettent son utilisation dans différents domaines.

##### **I.4.6.1 Application dans le domaine médicale.**

L'augmentation de la résistance à la corrosion et la diminution du coefficient de friction des dépôts de CN<sub>x</sub> sur acier 316L par rapport à l'acier seul permettent une utilisation comme revêtement protecteur pour des applications en orthodontie [79].

Les films de a-CN<sub>x</sub> peuvent également être utilisés comme détecteur pour des ions lourds lors de la thérapie cancéreuse [94].

##### **I.4.6.2 Greffage sur CN<sub>x</sub>**

Les nanotubes de carbone peuvent être fonctionnalisés avec du polystyrène greffé de façon covalente [95]. De l'héparine a été greffée sur des films de CNx déposé sur du polytetrafluoroethylene par faisceaux d'ions (IBAD) [70]. Les études XPS ont montré un greffage covalent de l'héparine. Ce greffage permet d'augmenter l'hémocompatibilité et de diminuer la prolifération cellulaire.

### **I.4.6.3 Application pour la détection.**

Des films de a-CNx sur Ti déposés par pulvérisation cathodique magnétron en radio fréquence ont été utilisés pour la détection d'ions métalliques (Cadmium et cuivre) en solution. De meilleures propriétés analytiques (sensibilité et linéarité) ont été obtenues avec les couches de a-CNx par rapport à l'électrode de diamant dopé au bore [96].

Des dépôts de a-CNx sur de l'acier 316L ont également été utilisés pour la détection simultanée de la dopamine et de l'acide ascorbique. Dans ce cas, un prétraitement anodique est nécessaire pour une bonne séparation des pics d'oxydation [97].

D'autre part, des nanotubes de a-CNx peuvent être utilisés pour immobiliser l'enzyme de glucose oxydase (Gox). Cette étude réalisée par Jia *et al.* montre que les nanotubes de carbone peuvent faciliter le transfert direct des électrons entre le centre biocatalytique de l'enzyme et l'électrode [98].

Des nanotubes de a-CNx ont également été utilisés pour la détection d'isomères du dihydrobenzène (hydroquinone, catéchol, resornicol) par voltammétrie cyclique avec une bonne reproductibilité [99]. Comparativement aux nanotubes sans azote, les nanotubes de carbone dopé à l'azote entraînent un décalage vers les potentiels négatifs du pic d'oxydation de l'hydroquinone ainsi qu'une augmentation d'intensité des pics. Dans cette étude, une dépendance de la cinétique de transfert d'électrons est observée en fonction de la stoechiométrie des nanotubes de CNx.

### **I.4.6.4 Autres applications**

Les propriétés des films de CNx permettent leur utilisation dans différents domaines. Les propriétés optiques et mécaniques ainsi que leur résistance au décapage ionique peuvent permettre d'utiliser les films de a-CNx comme un nouveau matériau pour les masques photolithographiques [66]. Le CNx a également été utilisé pour la fabrication de microdétecteur pour l'humidité [100], ou pour de nouvelles jonctions p-n. [101]. Les films de CNx peuvent être une alternative aux fullerènes dans les cellules photovoltaïques [89].

## ***1.5. Conclusions***

La polyneuropathie amyloïde familiale est une maladie neurodégénérative grave qui entraîne un décès dans les dix années qui suivent le diagnostic. Celui-ci est réalisé de nos jours grâce à plusieurs techniques : les biopsies, les tests immunohistochimiques, le séquençage du gène de la TTR et les analyses par spectrométrie de masse. L'apport d'une puce microfluidique permettrait d'avoir un diagnostic fiable, rapide et peu coûteux de la maladie. La plupart des analyses en puce microfluidique de peptides ou d'acides aminés sont réalisées avec un détecteur optique ou électrochimique. Dans la plupart des cas, un marquage préalable de ces molécules est nécessaire pour leur détection. Cependant pour une meilleure séparation des molécules en amont, un contrôle précis du flux électroosmotique et donc de la charge de surface dans le microcanal doit être réalisée. Cette modulation peut être réalisée de façon active en utilisant une interface polarisable. Des études préliminaires ont montré que les meilleurs résultats ont été obtenus pour des interfaces polarisables de a-CNx [62]. Ces films grâce à leurs propriétés avantageuses, c'est-à-dire la bonne tenue mécanique, la résistance aux forces de frottement et à la corrosion ainsi que leur propriétés électrochimiques, optiques et électriques, sont de bons candidats pour diverses applications et notamment des applications en biodétection. Les films de a-CNx peuvent donc être à la fois utilisés comme interface polarisable pour la séparation électrophorétiques en microcanaux et comme électrode dans les puces de détection. Il est donc possible, en optimisant les conditions de synthèse des couches de a-CNx, de modifier les propriétés des films (conductivité, réactivité électrochimique...) selon l'application souhaitée.

## **I.6. Références**

- [1] V. Planté-Bordeneuve and G. Said, “Familial amyloid polyneuropathy,” *Lancet neurology*, vol. 10, no. 12, pp. 1086–97, Dec. 2011.
- [2] V. Planté-Bordeneuve, “Mise au point Neuropathies amyloïdes familiales: diagnostic et prise en charge,” *Rev Neurol*, vol. 162, no. 11, pp. 1138–1146, 2006.
- [3] M. D. Benson, “Transthyretin amyloidosis,” *Amyloid*, no. 317, pp. 44–56, 1996.
- [4] N. Magy-Bertrand, “Les amyloses à transthyréline,” *La Revue de médecine interne*, vol. 28, no. 5, pp. 306–13, May 2007.
- [5] C. Andrade, “A peculiar form of peripheral neuropathy,” *Acta psychiatrica et neurologica Scandinavica*, vol. 26, no. 3–4, pp. 251–7, Jan. 1951.
- [6] S. Araki and Y. Ando, “Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. Progress in Kumamoto, Japan (1967–2010),” *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, vol. 86, no. 7, pp. 694–706, 2010.
- [7] X. Hou, M.-I. Aguilar, and D. H. Small, “Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration,” *The FEBS journal*, vol. 274, no. 7, pp. 1637–50, Apr. 2007.
- [8] M. J. Saraiva, M. M. Sousa, I. Cardoso, and R. Fernandes, “Familial Amyloidotic Polyneuropathy,” *Journal of molecular neuroscience*, vol. 23, pp. 35–40, 2004.
- [9] D. Adams, P. Lozeron, and M. Theaudin, “Regional difference and similarity of familial amyloidosis with polyneuropathy in France,” *Amyloid*, vol. 19 Suppl 1, pp. 61–4, Jun. 2012.
- [10] M. D. Benson, J. Julien, J. Liepnieks, and S. Zeldenrust, “A transthyretin variant (alanine 49) associated with familial amyloidotic polyneuropathy in a French family,” *Journal of medical genetics*, vol. 30, no. 2, pp. 117–9, Feb. 1993.
- [11] L. H. Connors, A. Lim, T. Prokaeva, V. a Roskens, and C. E. Costello, “Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003,” *Amyloid*, vol. 10, no. 3, pp. 160–84, Sep. 2003.
- [12] D. Adams, “Actualités Huitièmes Journées des Maladies du Système Nerveux Périphérique Actualités dans le traitement des neuropathies amyloïdes héréditaires,” *Revue Neurologique*, pp. 1234–1238, 2004.
- [13] D. Adams and P. Lozeron, “Neuropathies amyloïdes : actualités diagnostiques et thérapeutiques,” *Pratique Neurologique - FMC*, vol. 2, no. 2, pp. 107–115, Apr. 2011.

- [14] D. Adams, M. Slama, and D. Samuel, "Liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy," *Presse médicale*, vol. 39, no. 1, pp. 17–25, Jan. 2010.
- [15] M. Pepys, J. Herbert, W. Hutchinson, G. Tennent, H. Lachmann, and J. Galimone, "Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis," *Nature*, vol. 417, p. 231, 2002.
- [16] M. Gertz, R. Kyle, and S. Thibodeau, "Familial amyloidosis: a study of 52 North American-born patients examined during a 30-year period," *Mayo Clinic proceedings*, vol. 67, no. 5, pp. 428–440, 1992.
- [17] C. Ribeiro-Silva, S. Gilberto, R. a Gomes, É. Mateus, E. Monteiro, E. Barroso, A. V. Coelho, G. da Costa, A. P. Freire, and C. Cordeiro, "The relative amounts of plasma transthyretin forms in familial transthyretin amyloidosis: a quantitative analysis by Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry," *Amyloid*, vol. 18, no. 4, pp. 191–9, Dec. 2011.
- [18] O. Trenchevska, E. Kamcheva, and D. Nedelkov, "Mass spectrometric immunoassay for quantitative determination of transthyretin and its variants," *Proteomics*, vol. 11, no. 18, pp. 3633–41, Sep. 2011.
- [19] S. C. Jacobson, L. . Koutny, R. Hergenroder, A. . Moore, and J. . Ransey, "High-Speed separations on a Microchip," *Anal chem*, vol. 66, pp. 1114–1118, 1994.
- [20] R. McCormick, R. . Nelson, M. . Alansoamigo, J. Benvegna, and H. . Hooper, "Microchannel Electrophoretic separations of DNA in Injection-Molded Plastic Substrates," *Anal chem*, vol. 69, pp. 2626–2630, 1997.
- [21] Z. Wang, W. Wang, W. Wang, L. Xu, G. Chen, and F. Fu, "Separation and determination of  $\beta$ -casomorphins by using glass microfluidic chip electrophoresis together with laser-induced fluorescence detection," *Journal of separation science*, vol. 34, no. 2, pp. 196–201, Jan. 2011.
- [22] N. A. Cellar, S. T. Burns, J.-C. Meiners, H. Chen, and R. T. Kennedy, "Microfluidic chip for low-flow push-pull perfusion sampling in vivo with on-line analysis of amino acids," *Anal Chem*, vol. 77, no. 21, pp. 7067–73, Nov. 2005.
- [23] Z. D. Sandlin, M. Shou, J. G. Shackman, and R. T. Kennedy, "Microfluidic electrophoresis chip coupled to microdialysis for in vivo monitoring of amino acid neurotransmitters," *Anal Chem* vol. 77, no. 23, pp. 7702–8, Dec. 2005.
- [24] B. H. Huynh, B. A. Fogarty, P. Nandi, and S. M. Lunte, "A microchip electrophoresis device with on-line microdialysis sampling and on-chip sample derivatization by naphthalene 2,3-dicarboxaldehyde/2-mercaptoethanol for amino acid and peptide analysis," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 42, no. 5, pp. 529–34, Nov. 2006.
- [25] C. Wang, S. Zhao, H. Yuan, and D. Xiao, "Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection," *Journal of chromatography. B, Analytical*

- technologies in the biomedical and life sciences*, vol. 833, no. 2, pp. 129–34, Apr. 2006.
- [26] L. Zhu, C. S. Lee, and D. L. DeVoe, “Integrated microfluidic UV absorbance detector with attomol-level sensitivity for BSA,” *Lab on a chip*, vol. 6, pp. 115–120, 2006.
- [27] S. Zhao, Y. Huang, and Y.-M. Liu, “Microchip electrophoresis with chemiluminescence detection for assaying ascorbic acid and amino acids in single cells,” *Journal of chromatography. A*, vol. 1216, no. 39, pp. 6746–51, Sep. 2009.
- [28] F. Ye, Y. Huang, Q. Xu, M. Shi, and S. Zhao, “Quantification of taurine and amino acids in mice single fibrosarcoma cell by microchip electrophoresis coupled with chemiluminescence detection,” *Electrophoresis*, vol. 31, no. 10, pp. 1630–6, May 2010.
- [29] H. Qiu, J. Yan, X. Sun, J. Liu, W. Cao, X. Yang, and E. Wang, “Microchip Capillary Electrophoresis with an Integrated Indium Tin Oxide Electrode-Based Electrochemiluminescence Detector,” *Analytical Biochemistry*, vol. 75, no. 20, pp. 5435–5440, 2003.
- [30] M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S. M. Ford, S. Llopis, R. L. Mccarley, and S. A. Soper, “Contact Conductivity Detection in Poly ( methyl methacrylate ) -Based Microfluidic Devices for Analysis of Mono- and Polyanionic Molecules,” *Anal Chem*, vol. 74, no. 10, pp. 2407–2415, 2002.
- [31] H. Shadpour, M. L. Hupert, D. Patterson, C. Liu, M. Galloway, W. Stryjewski, J. Goettert, and S. A. Soper, “Fabricated in Polycarbonate with an Integrated Contact Conductivity Sensor Array,” *Anal Chem*, vol. 79, pp. 870–878, 2007.
- [32] E. M. Abad-Villar, P. Kubán, and P. C. Hauser, “Determination of biochemical species on electrophoresis chips with an external contactless conductivity detector,” *Electrophoresis*, vol. 26, no. 19, pp. 3609–14, Oct. 2005.
- [33] E. M. Abad-Villar, J. Tanyanyiwa, M. T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, and P. C. Hauser, “Detection of human immunoglobulin in microchip and conventional capillary electrophoresis with contactless conductivity measurements,” *Anal Chem*, vol. 76, no. 5, pp. 1282–8, Mar. 2004.
- [34] L.-B. Ma, Y. Xu, J. Liang, H.-T. Liu, J. Gan, D.-S. Li, J.-L. Peng, and S. Wu, “Separation and Detection of Urinary Proteins by Microfluidic Chip Integrated with Contactless Conductivity Detector,” *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 39, no. 8, pp. 1123–1127, Aug. 2011.
- [35] J. Tanyanyiwa, K. Schweizer, and P. C. Hauser, “High-voltage contactless conductivity detection of underivatized amino acids in capillary electrophoresis.,” *Electrophoresis*, vol. 24, no. 12–13, pp. 2119–24, Jun. 2003.
- [36] J. Gamby, J. Abid, B. Tribollet, and H. H. Girault, “Tunable capacitors Nanomosaic Network for the Detection of Proteins Without Direct Electrical Contact,” *Small*, vol. 4, no. 6, pp. 802–809, 2008.

- [37] M. Faure, M. Kechadi, B. Sotta, and J. Gamby, "Contact Free Impedance Methodology for Investigating Enzymatic Reactions into Dielectric Polymer Microchip," *Electroanalysis*, vol. 25, no. 5, pp. 1151–1158, 2013.
- [38] J. Kim and D. R. Knapp, "Miniaturized multichannel electrospray ionization emitters on poly ( dimethylsiloxane ) microfluidic devices," *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 3993–3999, 2001.
- [39] V. Gobry, J. Van Oostrum, M. Martinelli, T. C. Rohner, F. Reymond, J. S. Rossier, and H. H. Girault, "Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling," *Proteomics*, vol. 2, pp. 405–412, 2002.
- [40] N. Lion, V. Gobry, H. Jensen, J. S. Rossier, and H. Girault, "Integration of a membrane-based desalting step in a microfabricated disposable polymer injector for mass spectrometric protein analysis," *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 3583–3588, 2002.
- [41] N. Lion, J. Gellon, H. Jensen, and H. H. Girault, "On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1003, pp. 11–19, 2003.
- [42] J. Gao, J. Xu, L. E. Locascio, and C. S. Lee, "Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification," *Anal Chem*, vol. 73, no. 11, pp. 2648–55, Jun. 2001.
- [43] M. Kato, K. Sakai-Kato, H. Jin, K. Kubota, H. Miyano, T. Toyo'oka, M. T. Dulay, and R. N. Zare, "Integration of on-line protein digestion, peptide separation, and protein identification using pepsin-coated photopolymerized sol-gel columns and capillary electrophoresis/mass spectrometry," *Anal Chem*, vol. 76, no. 7, pp. 1896–902, Apr. 2004.
- [44] W. Sung, S. Huang, and P. Liao, "Poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device with electrospray ionization-mass spectrometry interface for protein identification," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 21, pp. 3648–54, Nov. 2003.
- [45] D. Figeys, S. P. Gygi, G. McKinnon, and R. Aebersold, "An integrated microfluidics-tandem mass spectrometry system for automated protein analysis," *Anal Chem*, vol. 70, no. 18, pp. 3728–34, Sep. 1998.
- [46] X. Mao, I. K. Chu, and B. Lin, "A sheath-flow nanoelectrospray interface of microchip electrophoresis MS for glycoprotein and glycopeptide analysis," *Electrophoresis*, vol. 27, pp. 5059–5067, 2006.
- [47] S. Fritzsche, P. Hoffmann, and D. Belder, "Chip electrophoresis with mass spectrometric detection in record speed," *Lap on Chip*, vol. 10, no. 10, pp. 1227–1230, 2010.
- [48] H. Li, J. Liu, Z. Cai, and J. Lin, "Coupling a microchip with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer for peptide," *Electrophoresis*, vol. 29, pp. 1889–1894, 2008.

- [49] S. Lin, H. Bai, T. Lin, and M. Fuh, "Microfluidic chip-based liquid chromatography coupled to mass spectrometry for determination of small molecules in bioanalytical applications," *Electrophoresis*, vol. 33, pp. 635–643, 2012.
- [50] C. Roussel, T. C. Rohner, H. Jensen, and H. H. Girault, "Mechanistic Aspects of On-Line Electrochemical Tagging of Free L -Cysteine Residues during Electrospray Ionisation for Mass Spectrometry in Protein Analysis," *ChemPHysChem*, vol. 4, pp. 200–206, 2003.
- [51] C. Roussel and H. H. Girault, "On-line counting of cysteine residues in peptides during electrospray ionization by electrogenerated," *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 238–247, 2005.
- [52] T. C. Rohner, S. Rossier, and H. H. Girault, "On-line electrochemical tagging of cysteines in proteins during nanospray," *Electrochemistry Communications*, vol. 4, pp. 695–700, 2002.
- [53] J.-J. Xu, Y. Peng, N. Bao, X.-H. Xia, and H.-Y. Chen, "Simple method for the separation and detection of native amino acids and the identification of electroactive and non-electroactive analytes," *Journal of chromatography. A*, vol. 1095, no. 1–2, pp. 193–6, Nov. 2005.
- [54] M. a. Schwarz, B. Galliker, K. Fluri, T. Kappes, and P. C. Hauser, "A two-electrode configuration for simplified amperometric detection in a microfabricated electrophoretic separation device," *The Analyst*, vol. 126, no. 2, pp. 147–151, 2001.
- [55] P. Luo, F. Zhang, and R. P. Baldwin, "Constant-potential amperometric detection of underivatized amino acids and peptides at a copper electrode," *Anal Chem*, vol. 63, no. 17, pp. 1702–1707, Sep. 1991.
- [56] J. Ye and R. P. Baldwin, "Determination of Amino Acids and Peptides by Capillary Electrophoresis and Electrochemical Detection at a Copper Electrode," *Anal Chem*, no. 17, pp. 2669–2674, 2008.
- [57] J. Wang, G. Chen, M. Wang, and M. P. Chatrathi, "Carbon-nanotube/copper composite electrodes for capillary electrophoresis microchip detection of carbohydrates," *The Analyst*, vol. 129, no. 6, pp. 512–5, Jun. 2004.
- [58] J. Wang, G. Chen, and M. Pumera, "Microchip Separation and Electrochemical Detection of Amino Acids and Peptides Following Precolumn Derivatization with naphthalène-2,3-dicarboxyaldehyde," *Electroanalysis*, vol. 15, no. 10, pp. 862–865, 2003.
- [59] J. Wang, M. P. Chatrathi, and B. Tian, "Micromachined separation chips with a precolumn reactor and end-column electrochemical detector," *Anal chem*, vol. 72, no. 23, pp. 5774–8, Dec. 2000.
- [60] E. A. S. Doherty, R. J. Meagher, M. N. Albarghouthi, and A. E. Barron, "Review Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 34–54, 2003.

- [61] A. Pallandre, B. De Lambert, R. Attia, A. M. Jonas, and J. Viovy, "Surface treatment and characterization □: Perspectives to electrophoresis and lab-on-chips," *Electrophoresis*, vol. 27, pp. 584–610, 2006.
- [62] C. A. Lucy, A. M. Macdonald, and M. D. Gulcev, "Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography A*, vol. 1184, pp. 81–105, 2008.
- [63] A. Plecis, J. Tazid, A. Pallandre, P. Martinhon, D. Deslouis, Y. Chen, and A. . Haghiri-Gosnet, "Flow field effect transistors with polarisable interface for FEO tunable microfluidic separation devices," *Lab on chip*, vol. 10, pp. 1245–1253, 2010.
- [64] A. Ferrari, S. Rodil, and J. Robertson, "Interpretation of infrared and Raman spectra of amorphous carbon nitrides," *Physical Review B*, vol. 67, no. 15, p. 155306, Apr. 2003.
- [65] F. Alibert, O. D. Drouhin, M. Benlahsen, S. Muhl, S. E. Rodil, E. Camps, and L. Escobar-Alarcon, "Comparison and semiconductor properties of nitrogen doped carbon thin films grown by different techniques," *Applied Surface Science*, vol. 254, no. 17, pp. 5564–5568, Jun. 2008.
- [66] S. H. Kim, C. M. Choi, K. M. Lee, and Y.-B. Hahn, "Optical, mechanical and etch properties of amorphous carbon nitride films grown by plasma enhanced chemical vapor deposition at room temperature," *Synthetic Metals*, vol. 160, no. 23–24, pp. 2442–2446, Dec. 2010.
- [67] F. Demichelis, X. F. Rong, S. Schreiter, and A. Tagliaferro, "Deposition and characterization of amorphous carbon nitride thin films," *Diamond and Related Materials*, vol. 4, pp. 361–365, 1995.
- [68] X. H. Zheng, J. P. Tu, and R. G. Song, "Microstructure and tribological behavior of pulsed laser deposited a-CN<sub>x</sub> films," *Applied Surface Science*, vol. 256, no. 10, pp. 3211–3215, Mar. 2010.
- [69] K. J. Boyd, "Formation of C–N thin films by ion beam deposition," *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 13, no. 4, p. 2110, Jul. 1995.
- [70] Z. R. Wu, M. Zhang, and F. Z. Cui, "Adhesion and growth of smooth muscle cells on CN<sub>x</sub> coatings," *Surface and Coatings Technology*, vol. 201, no. 9–11, pp. 5710–5715, Feb. 2007.
- [71] F. Zhou, X. Wang, K. Adachi, and K. Kato, "Influence of normal load and sliding speed on the tribological property of amorphous carbon nitride coatings sliding against Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> balls in water," *Surface and Coatings Technology*, vol. 202, no. 15, pp. 3519–3528, Apr. 2008.
- [72] K. Ogata, J. F. D. Chubaci, and F. Fujimoto, "Properties of carbon nitride films with composition ratio C/N=0.5–3.0 prepared by the ion and vapor deposition method," *Journal of Applied Physics*, vol. 76, no. 6, p. 3791, 1994.

- [73] A. Lagrini, C. Deslouis, H. Cachet, M. Benlahsen, and S. Charvet, "Elaboration and electrochemical characterization of nitrogenated amorphous carbon films," *Electrochemistry Communications*, vol. 6, no. 3, pp. 245–248, Mar. 2004.
- [74] N. E. Derradji, M. L. Mahdjoubi, H. Belkhir, N. Mumumbila, B. Angleraud, and P. Y. Tessier, "Nitrogen effect on the electrical properties of CN<sub>x</sub> thin films deposited by reactive magnetron sputtering," *Thin Solid Films*, vol. 482, no. 1–2, pp. 258–263, Jun. 2005.
- [75] T. Berlind, P. Tengvall, L. Hultman, and H. Arwin, "Protein adsorption on thin films of carbon and carbon nitride monitored with in situ ellipsometry," *Acta biomaterialia*, vol. 7, no. 3, pp. 1369–78, Mar. 2011.
- [76] O. Durand-Drouhin and M. Benlahsen, "Internal stress of sputtered amorphous carbon nitride thin films," *Solid State Communications*, vol. 131, no. 7, pp. 425–429, Aug. 2004.
- [77] J. Gilvarry, a. K. M. S. Chowdhury, M. Monclus, D. C. Cameron, P. J. McNally, and T. Tuomi, "Stress behaviour of reactively sputtered nitrogenated carbon films," *Surface and Coatings Technology*, vol. 98, no. 1–3, pp. 985–990, Jan. 1998.
- [78] K. Kato, N. Umehara, and K. Adachi, "Friction, wear and N<sub>2</sub>-lubrication of carbon nitride coatings: a review," *Wear*, vol. 254, no. 11, pp. 1062–1069, Oct. 2003.
- [79] S. Wei, T. Shao, and P. Ding, "Study of CN<sub>x</sub> films on 316L stainless steel for orthodontic application," *Diamond and Related Materials*, vol. 19, no. 5–6, pp. 648–653, May 2010.
- [80] T. Yasui, S. Kimura, R. Nishikawa, and M. Fukumoto, "Carbon nitride deposition onto steel substrates by radio frequency plasma assisted pulsed laser deposition with substrate heating," *Thin Solid Films*, vol. 523, pp. 20–24, Nov. 2012.
- [81] J. Wang and M. Liu, "Study on the tribological properties of hard films deposited on biomedical NiTi alloy," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 129, no. 1–2, pp. 40–45, Sep. 2011.
- [82] D. C. Cameron, "Optical and electronic properties of carbon nitride," *Surface and Coatings Technology*, vol. 169–170, pp. 245–250, Jun. 2003.
- [83] G. Adamopoulos, C. Godet, C. Deslouis, H. Cachet, a. Lagrini, and B. Saidani, "The electrochemical reactivity of amorphous hydrogenated carbon nitrides for varying nitrogen contents: the role of the substrate," *Diamond and Related Materials*, vol. 12, no. 3–7, pp. 613–617, Mar. 2003.
- [84] V. Cachet, H; Debiemme-Chouvy, C; Deslouis, D; Lagrini, A; Viver, "Correlation between electrochemical reactivity and surface chemistry of amorphous carbon nitride films," *surface and interface analysis*, vol. 38, pp. 719–722, 2006.
- [85] M. Benlahsen, H. Cachet, S. Charvet, C. Debiemme-Chouvy, C. Deslouis, A. Lagrini, and V. Vivier, "Improvement and characterization of the electrochemical reactivity of

- amorphous carbon nitride electrodes,” *Electrochemistry Communications*, vol. 7, no. 5, pp. 496–499, 2005.
- [86] P. Tamiasso-Martinhon, H. Cachet, C. Debiemme-Chouvy, and C. Deslouis, “Thin films of amorphous nitrogenated carbon a-CN<sub>x</sub>: Electron transfer and surface reactivity,” *Electrochimica Acta*, vol. 53, no. 19, pp. 5752–5759, Aug. 2008.
- [87] N. W. Khun and E. Liu, “Effect of substrate temperature on corrosion performance of nitrogen doped amorphous carbon thin films in NaCl solution,” *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 17, pp. 4762–4766, Jul. 2009.
- [88] J. R. Shi, Y. J. Xu, and J. Zhang, “Corrosion resistance of nitrogenated amorphous carbon films prepared by facing target sputtering,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 198, no. 1–3, pp. 437–440, Aug. 2005.
- [89] J. C. Byers, F. Billon, C. Debiemme-Chouvy, C. Deslouis, A. Pailleret, and O. a Semenikhin, “Photocurrent generation in carbon nitride and carbon nitride/conjugated polymer composites,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 4, no. 9, pp. 4579–87, Sep. 2012.
- [90] J. C. Carrero-Sanchez, a L. Elías, R. Mancilla, G. Arrellín, H. Terrones, J. P. Laclette, and M. Terrones, “Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen,” *Nano letters*, vol. 6, no. 8, pp. 1609–16, Aug. 2006.
- [91] P. Yang, N. Huang, Y. X. Leng, Z. Q. Yao, H. F. Zhou, M. Maitz, Y. Leng, and P. K. Chu, “Wettability and biocompatibility of nitrogen-doped hydrogenated amorphous carbon films: Effect of nitrogen,” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 242, no. 1–2, pp. 22–25, Jan. 2006.
- [92] M. L. Zhao, D. J. Li, M. X. Guo, Y. T. Zhang, H. Q. Gu, X. Y. Deng, R. X. Wan, and X. Sun, “The different N concentrations induced cytocompatibility and hemocompatibility of MWCNTs with CN<sub>x</sub> coatings,” *Surface and Coatings Technology*, Sep. 2012.
- [93] J. Wang and N. Jiang, “Blood compatibilities of carbon nitride film deposited on biomedical NiTi alloy,” *Diamond and Related Materials*, vol. 18, no. 10, pp. 1321–1325, Oct. 2009.
- [94] T. Katsuno, S. Nitta, D. Ohsawa, and Y. Sato, “Detection of heavy ions for cancer therapy using amorphous carbon nitride a-CN<sub>x</sub> films prepared by a nitrogen radical sputter method,” *Diamond and Related Materials*, vol. 12, pp. 672–676, 2003.
- [95] M. Dehonor, K. Masenelli-Varlot, A. González-Montiel, C. Gauthier, J. Y. Cavaillé, H. Terrones, and M. Terrones, “Nanotube brushes: polystyrene grafted covalently on CN<sub>x</sub> nanotubes by nitroxide-mediated radical polymerization,” *Chemical communications*, no. 42, pp. 5349–51, Nov. 2005.

- [96] S. M. Seck, S. Charvet, M. Fall, E. Baudrin, M. Lejeune, and M. Benlahsen, "Detection of Cadmium and Copper Cations Using Amorphous Nitrogenated Carbon Thin Film Electrodes," *Electroanalysis*, vol. 24, no. 9, pp. 1839–1846, Sep. 2012.
- [97] C. Modeiros, R.A; Benchick, A; Rocha-Filho, E.C; Fatibello-Filho, O;SaisaniB; Debiemme-Chouvy, C; Deslouis, "Communications Simultaneous detection of ascorbic acid and dopamine with electrochemically pretreated carbon nitride electrodes□: Comparison with boron-doped diamond electrodes," *Electrochemistry Communications*, vol. 24, pp. 61–64, 2012.
- [98] N. Jia, L. Liu, Q. Zhou, L. Wang, M. Yan, and Z. Jiang, "Bioelectrochemistry and enzymatic activity of glucose oxidase immobilized onto the bamboo-shaped CNx nanotubes," *Electrochimica Acta*, vol. 51, no. 4, pp. 611–618, Nov. 2005.
- [99] J. Dong, X. Qu, L. Wang, C. Zhao, and J. Xu, "Electrochemistry of Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes (CN x ) with Different Nitrogen Content and Its Application in Simultaneous Determination of Dihydroxybenzene Isomers," *Electroanalysis*, vol. 20, no. 18, pp. 1981–1986, Sep. 2008.
- [100] S. P. Lee, "Synthesis and Characterization of Carbon Nitride Films for Micro Humidity Sensors," *sensors*, no. 8, pp. 1508–1518, 2008.
- [101] J. C. Byers, P. Tamiasso-Martinhon, C. Deslouis, a. Pailleret, and O. a. Semenikhin, "Atomic Force Microscopy Studies of Carbon Nitride (CNx) Films Deposited on a Conducting Polymer Substrate," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, no. 43, pp. 18474–18480, Nov. 2010.





# Chapitre II

## Techniques expérimentales

---

II.1.	Principe d'analyse électrochimique .....	52
II.1.3.	Voltammétrie cyclique .....	52
II.1.4.	Voltammétrie à impulsion différentielle .....	55
II.1.5.	Spectroscopie d'impédance.....	58
II.1.5.1	Principe.....	58
II.1.5.2	Circuit équivalent d'un système électrochimique.....	59
II.1.5.3	Exemple dans le cas d'un couple redox diffusant librement en solution.....	60
II.1.6.	Appareillage .....	63
II.2.	Préparation des films de carbone amorphe azoté sur verre/ITO .....	63
II.2.3.	La pulvérisation cathodique diode magnétron en courant continu .....	63
II.2.3.1	Principe général .....	64
II.2.3.2	Cathode magnétron.....	65
II.2.4.	Conditions de dépôts des couches minces de carbone azoté amorphe .....	66
II.2.4.1	Propriété du substrat Verre/ITO. ....	66
II.2.4.2	Mise en conditions des substrats verre/ITO.....	66
II.2.4.3	Condition de dépôts de a-CN <sub>x</sub> sur verre/ITO.....	67
II.2.5.	Fabrication des électrodes de a-CN <sub>x</sub> sur verre/ITO .....	67
II.3.	Principe d'analyse des dépôts .....	68
II.3.3.	Spectrométrie photoélectronique X (XPS : X-Ray Photoelectron Spectrometry) .....	68
II.3.3.1	Principe.....	68
II.3.4.	Microscopie à force atomique .....	70
II.3.4.1	Principe.....	70
II.3.4.2	Mode de fonctionnement.....	71
II.3.4.3	Appareillage .....	72
II.4.	Références .....	74



## II.1. Principe d'analyse électrochimique

### II.1.3. Voltammétrie cyclique

Pour cette technique, une variation de potentiel  $E(t)$  est imposée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. L'évolution de l'intensité qui traverse l'interface électrolyte/électrode est alors étudiée. Par convention, un courant positif, donc anodique correspondra à une réaction d'oxydation, tandis qu'un courant négatif (courant cathodique) correspondra à une réduction. La courbe obtenue est appelée voltammogramme et renseigne sur le processus électrochimique se déroulant à l'interface. Le potentiel de l'électrode varie avec une vitesse  $v = |dE|/dt$ . La voltammétrie cyclique est une voltammétrie à balayage linéaire de potentiel où après un temps  $t_1$  le sens du balayage est inversé (Figure II-1). La variation du potentiel appliqué à l'électrode de travail est en forme de triangle. Le potentiel  $E(t)$  varie entre le potentiel initial ( $E_i$ ) et final ( $E_f$ ) en fonction de la vitesse de balayage selon :

$$E(t) = E_i \pm vt \quad \text{Equation II-1}$$

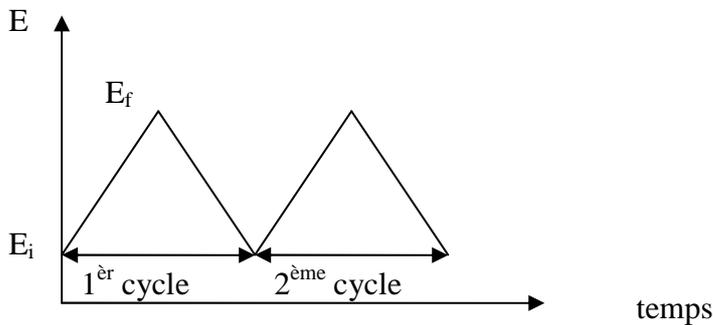


Figure II-1 : Variation du potentiel en voltammétrie cyclique.

Pour une réaction réversible l'intensité de pic  $I_p$  en fonction de la vitesse de balayage est donnée par l'équation suivante [1]:

$$I_p = 0.4463 \cdot n \cdot F \cdot C^0 \cdot S \cdot D^{0.5} \cdot \left( \frac{F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{0.5} \quad \text{Equation II-2}$$

Avec  $n$  le nombre d'électrons échangés

$F$  : la constante de Faraday  $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$

$D$  : le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive en  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

$R$  : la constante des gaz parfaits  $R = 8,3144 \text{ K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

$T$  : la température en K

$S$  : la surface de l'électrode.

Le potentiel de pic,  $E_p$ , est déterminé par :

$$E_p = E^0 - 1,11 \frac{RT}{F} \quad \text{Equation II-3}$$

et

$$E_{p/2} - E_p = 2,20 \frac{RT}{F} \quad \text{Equation II-4}$$

d'où

$$E_{p/2} = E^0 + 1,09 \frac{RT}{F} \quad \text{Equation II-5}$$

Dans le cas d'un système réversible, les potentiels du pic anodique et cathodique sont séparés de  $2,22RT/nF$ . Ce critère permet de déterminer la réversibilité ou non du système.

Dans le cas d'un système irréversible dû à un transfert de charge lent, la réaction inverse peut être négligée. Les concentrations des espèces sont données par l'équation de Butler-Volmer [1][2].

De même que pour une réaction réversible, le courant de pic,  $I_p$  dépend de la racine carrée de la vitesse de balayage :

$$I_p = 0.496 \cdot n \cdot F \cdot C^0 \cdot \alpha^{1/2} \cdot S \cdot D^{1/2} \cdot \left( \frac{F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{1/2} \quad \text{Equation II-6}$$

$\alpha$  étant le coefficient de transfert .

Dans ce cas, les potentiels de pic dépendent de la valeur de la vitesse de balayage. Le potentiel de pic cathodique se déplace vers les potentiels négatifs.

$$E_{p,c} = E^0 - 0,78 \frac{RT}{\alpha F} + \frac{RT}{\alpha F} \ln \left( k_s \left( \frac{RT}{\alpha F v} \right)^{1/2} \right) \quad \text{Equation II-7}$$

Dans cette équation  $k_s$  est la constante de vitesse standard du transfert électronique.

Le potentiel anodique lui se déplace en sens opposé et obéit à l'équation suivante.

$$E_{p,a} \cong E^0 + 0,78 \frac{RT}{\alpha F} - \frac{RT}{(1-\alpha)F} \ln \left( ks \left( \frac{RT}{(1-\alpha)Fv} \right)^{1/2} \right) \quad \text{Equation II-8}$$

Ceci est rigoureusement vrai si on débute avec une solution contenant uniquement l'espèce  $R_{ed}$  en solution et si on balaye les potentiels dans la direction anodique.

Le tracé de la variation du potentiel de pic en fonction du logarithme de la vitesse de balayage permet de déterminer le coefficient de transfert de charge en prenant la pente de cette droite dans la zone totalement irréversible. Une autre technique pour déterminer ce coefficient est d'utiliser la formule II-9 reliant  $\alpha$  à la différence de pic.

$$\alpha = \frac{RT}{F} \left( \frac{1,857}{E_{p/2} - E_p} \right) \quad \text{Equation II-9}$$

La variation du potentiel de pic en fonction du logarithme de la concentration ainsi que la variation du potentiel de pic en fonction du logarithme de la vitesse de balayage renseignent sur le type de mécanismes de réactions impliquées.

Le mécanisme EC est un mécanisme où la première étape est un transfert d'électron du premier ordre (ou pseudo-premier ordre) associé à une réaction chimique.

Dans le cas d'un mécanisme type EC, l'intensité du pic en fonction de la vitesse de balayage s'exprime à l'aide de l'équation II-10 [1].

$$I_p = 0.496 \cdot F \cdot C^0 \cdot S \cdot D^{1/2} \cdot \left( \frac{F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{1/2} \quad \text{Equation II-10}$$

De plus, les potentiels de pic dépendent également de la vitesse de balayage suivant :

$$E_p = E^0 - 0.78 \cdot \frac{RT}{F} + \frac{RT}{2F} \ln \left( \frac{RT}{F} \frac{k_+}{v} \right) \quad \text{Equation II-11}$$

Avec  $k_+$  étant la constante de la réaction chimique.

La différence entre  $E_{p/2}$  et  $E_p$  est une constante et égale à :

$$E_{p/2} - E_p = 1.857 \cdot \frac{RT}{F} \quad \text{Equation II-11}$$

Dans le cas d'un mécanisme EC, la variation de  $E_p$  avec le logarithme népérien de la vitesse de balayage est égale à 29,6 mV tandis que  $E_p$  ne varie pas avec la concentration.

### II.1.4. Voltammétrie à impulsion différentielle

La Voltammétrie impulsionnelle différentielle (DPV) est une méthode très utile pour l'électrochimie analytique. En effet, la séparation des pics pour deux espèces redox avec des potentiels proches est meilleure avec la DPV que celle obtenue avec la voltammétrie cyclique. De plus, ces mesures différentielles permettent de discriminer et d'augmenter la réponse en courant faradique par rapport au courant capacitif. En effet, grâce aux faibles amplitudes de sauts utilisées, l'influence du courant capacitif est négligeable pour  $\Delta t > 5\text{ms}$ . La sensibilité de mesure du courant faradique est donc augmentée, et donc, de ce fait les limites de détection sont abaissées. Cette méthode permet d'avoir une bonne limite de détection (en dessous du micromolaire), et est une excellente méthode électroanalytique, car elle présente un bon rapport signal sur bruit [3], [4].

Dans notre cas, cette technique permettra d'avoir une bonne sensibilité de mesure pour l'analyse de faible quantité d'analytes avec des potentiels électrochimiques relativement proches.

Cette méthode consiste à faire une succession de sauts de potentiel de valeur constante surimposée à un balayage linéaire en fonction du temps. A chaque nouveau saut, les potentiels  $E_1$  et  $E_2$  varient en gardant la différence de potentiel  $\Delta E$  constante (Figure II-2 a et b). La différence des courants  $\Delta I = I(t_2) - I(t_1)$  est échantillonnée entre le temps où l'impulsion a lieu,  $t_1$ , et à la fin de celui-ci,  $t_2$  (Figure II-2c).

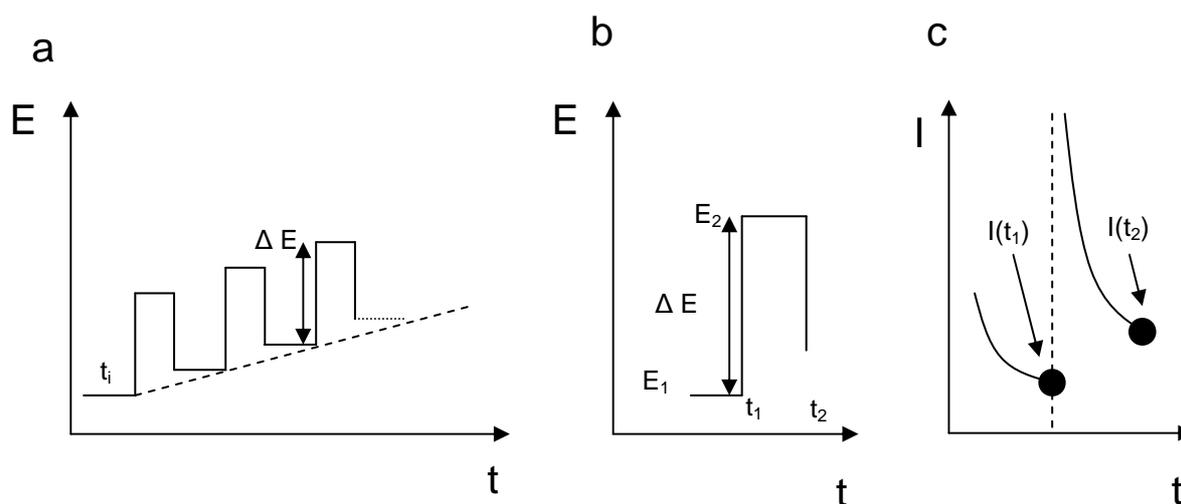
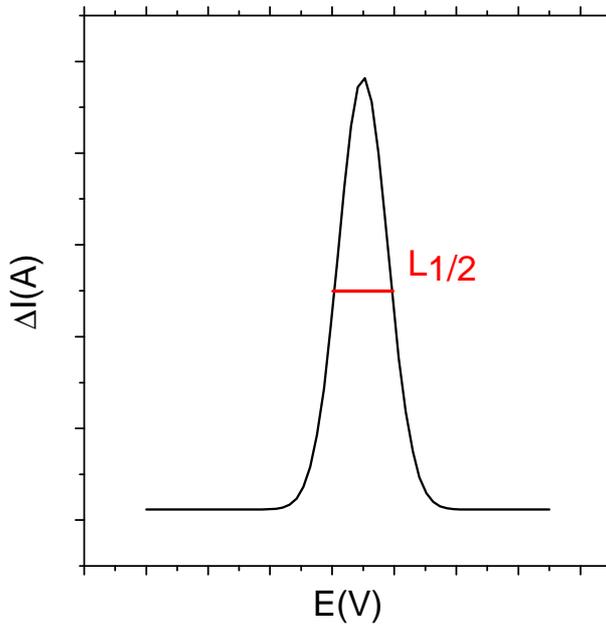


Figure II-2 : a) Variation du potentiel en fonction du temps. b) Saut de potentiel entre les temps  $t_2$  et  $t_1$  c) Mesure des courants en fonction du temps en DPV.

En DPV, la courbe représentant la différence des courants  $\Delta I$  en fonction du potentiel est une gaussienne (Figure II-3). Un des paramètres important est la largeur à mi-hauteur  $L_{1/2}$



**Figure II-3 : Voltammogramme en DPV en forme de gaussienne avec  $L_{1/2}$  la largeur à mi-hauteur.**

Cette méthode permet de déterminer plusieurs paramètres :

- la concentration de l'espèce étudiée à l'aide au courant de pic  $\Delta I$  et à la formule II-9,
- le potentiel standard de l'espèce étudiée grâce au potentiel de pic,
- la réversibilité ou l'irréversibilité de la réaction grâce à la largeur à mi-hauteur  $L_{1/2}$ .

Dans le cas d'un système réversible, la relation entre le potentiel de pic et la pulsation  $\Delta E$  est la suivante [5] :

$$E_p = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad \text{Equation II-12}$$

L'intensité du pic est donnée par :

$$I_p = -\frac{nFSD^{1/2}c_\infty}{(\pi\Delta t)^{1/2}} \cdot \frac{1-\sigma}{1+\sigma} \quad \text{Equation II-13}$$

avec :

$$\sigma = \exp\left(\frac{nF}{RT} \cdot \frac{\Delta E}{2}\right) \quad \text{Equation II-14}$$

Deux cas sont alors possibles :

- Si  $|\Delta E|$  est grande, alors  $\sigma \gg 1$  donc  $\frac{1-\sigma}{1+\sigma}$  est égal à  $\pm 1$  selon s'il s'agit d'une oxydation ou d'une réduction. Dans ce cas l'intensité de pic est égale à la valeur

d'intensité donnée par la voltammétrie impulsionnelle normale 
$$I_p = -\frac{nFSD^{1/2}c_\infty}{(\pi\Delta t)^{1/2}}$$

- Si  $|\Delta E|$  est faible, l'intensité de pic s'écrit :

$$I_p = -\frac{n^2F^2SD^{1/2}c_\infty}{4RT(\pi\Delta t)^{1/2}} \cdot \Delta E \quad \text{Equation II-15}$$

Cette équation est valable dans le cas où  $|\Delta E|$  est inférieure à  $2RT/nF$ , mais semble applicable pour des valeurs plus élevées.

La largeur à mi-hauteur  $L_{1/2}$  est donnée par l'expression suivante :

$$L_{1/2} = \frac{3,52RT}{nF} \quad \text{Equation II-16}$$

Cette valeur est égale à  $90,4/n$  mV à  $25^\circ\text{C}$ . Des pics séparés de  $50/n$  mV peuvent donc être résolus [5].

Molina *et al.* ont montré à l'aide de simulations sur les réponses en DPV que lorsque de la constante de vitesse de transfert de charge hétérogène,  $k_0$ , diminue, l'intensité des pics diminue également tandis que la largeur de ceux-ci augmente. De plus, il y a un décalage des pics vers des potentiels négatifs. Pour des valeurs de  $k_0$  faibles, la valeur des intensités de pics reste constante, mais les potentiels de pics se décalent [6] (Figure II-4).

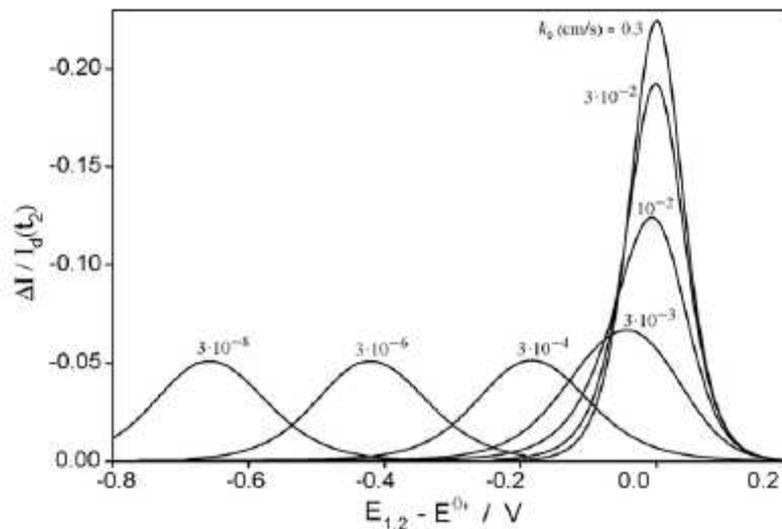


Figure II-4 : Simulation de l'influence de la constante  $k_0$  sur les courbes de DPV, pour une électrode de rayon  $30\mu\text{m}$ ,  $\alpha = 0,5$ ,  $\Delta E = 20$  mV,  $t_1 = 1\text{s}$ ,  $t_1/t_2 = 100$ ,  $D = 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  réalisée par Molina *et al.* [6].

## II.1.5. Spectroscopie d'impédance

La technique d'impédance électrochimique repose sur l'analyse en fréquence de la réponse d'un système à une perturbation sinusoïdale de faible amplitude du courant ou du potentiel [7].

### II.1.5.1 Principe

En général, les systèmes électrochimiques sont des systèmes non linéaires et non stationnaires. Pour pallier à cette difficulté on doit se situer dans des conditions expérimentales et instrumentales qui permettent de rester dans un domaine de linéarité pour le système électrochimique étudié. Pour cela, des signaux de faibles amplitudes autour du point de polarisation doivent être utilisés.

Le principe de l'impédance est basé sur la superposition d'un potentiel sinusoïdal  $\Delta E$  de faible amplitude à un potentiel constant de polarisation  $E_0$ . La réponse en courant du système est alors analysée. Inversement une intensité sinusoïdale  $\Delta I$  peut être superposée à un courant  $I_0$  et la réponse en potentiel mesurée (Figure II-5).

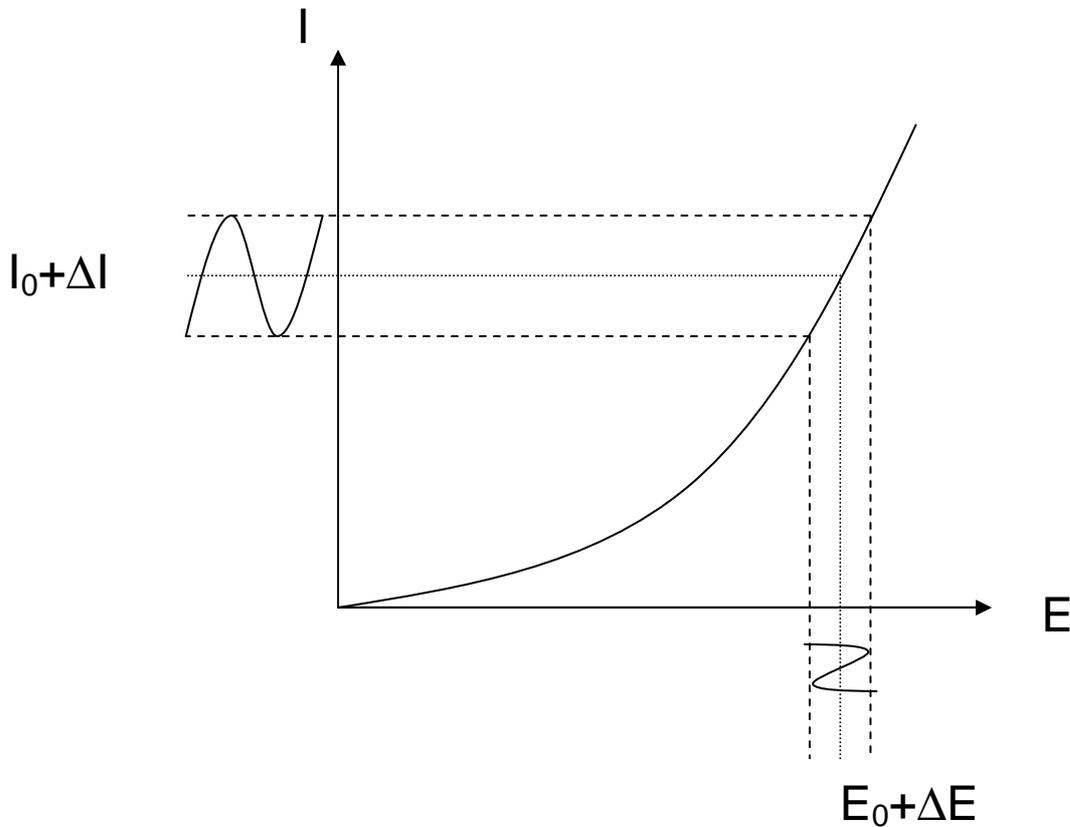


Figure II-5 : Principe de l'analyse d'un système non linéaire.

Deux types de régulation peuvent exister : galvanostatique ou potentiostatique. Le choix de cette régulation dépend du système électrochimique et de sa courbe courant/potentiel.

Généralement, une régulation en potentiel est utilisée suivant l'équation suivante :

$$E(t) = E_0 + |\Delta E| \sin \omega t \quad \text{Equation II-17}$$

avec  $\omega$  : pulsation en  $\text{rad.s}^{-1}$  et  $\omega = 2\pi f$  ( $f$ , étant la fréquence en Hz).

L'amplitude de la perturbation doit être faible afin de travailler dans des conditions de linéarité. Dans ce cas la réponse en intensité sera :

$$I(t) = I_0 + |\Delta I| \sin(\omega t - \Phi) \quad \text{Equation II-18}$$

avec  $\Phi$ , étant le déphasage entre la tension et l'intensité du courant.

### II.1.5.2 Circuit équivalent d'un système électrochimique

L'impédance notée,  $Z$ , d'un système électrochimique donnée est le rapport

$$Z(\omega) = \frac{\Delta V(\omega)}{\Delta I(\omega)} \quad \text{Equation II-19}$$

La différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence s'écrit  $V=E+R_e I$ . Les relations suivantes peuvent être ainsi formulées :

$$\Delta V(\omega) = \Delta E(\omega) + R_e \Delta I(\omega) \quad \text{Equation II-20}$$

$$\frac{\Delta V(\omega)}{\Delta I(\omega)} = \frac{\Delta E(\omega)}{\Delta I(\omega)} + R_e$$

En première approximation, on peut considérer que le courant total est la somme du courant faradique et du courant de charge de la double couche. D'où la relation suivante :

$$\Delta I(\omega) = \Delta I_C(\omega) + \Delta I_F(\omega) \quad \text{Equation II-21}$$

avec :

$$\frac{\Delta I(\omega)}{\Delta E(\omega)} = \frac{\Delta I_C(\omega)}{\Delta E(\omega)} + \frac{\Delta I_F(\omega)}{\Delta E(\omega)} = jC_d \omega + \frac{1}{Z_F} \quad \text{Equation II-22}$$

et comme expression globale de  $Z(\omega)$  :

$$Z(\omega) = R_e + \frac{1}{jC_d\omega + \frac{1}{Z_f(\omega)}} \quad \text{Equation II-23}$$

L'expression analytique précédente peut être mise sous la forme du circuit équivalent électrique suivant (Figure II-6) :

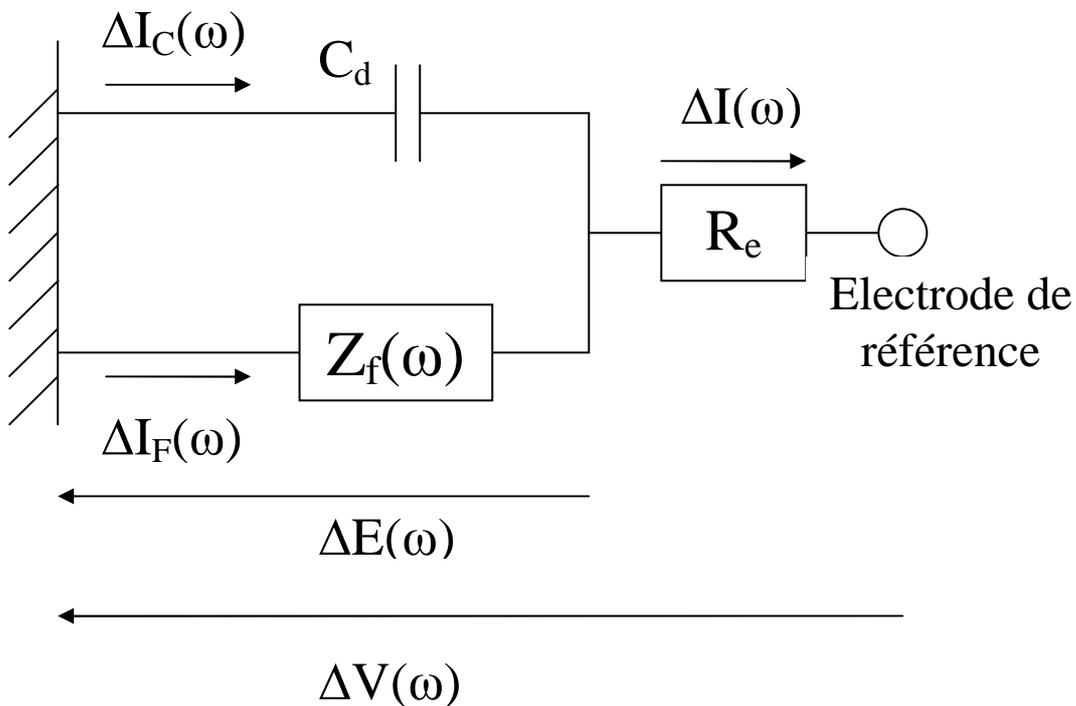
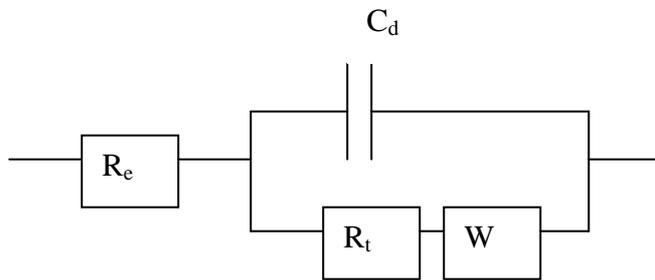


Figure II-6 : Circuit électrique équivalent d'un système électrochimique en présence d'une réaction faradique.

### II.1.5.3 Exemple dans le cas d'un couple redox diffusant librement en solution.

Dans ce cas, deux processus peuvent être considérés : le transfert de charge hétérogène à l'interface électrode/solution et le transport de matière de la solution vers l'électrode où vice et versa. Le transfert de charge hétérogène est caractérisé par la résistance de transfert de charge,  $R_t$  et par la capacité de double couche,  $C_d$ . La diffusion infinie est caractérisée par une impédance de diffusion dite de Warburg,  $W$ . Celle-ci est placée en série de la résistance de

transfert de charge hétérogène. Le schéma électrique équivalent de ce système est présenté dans la Figure II-7.



**Figure II-7 :** Schéma électrique équivalent d'un système électrochimique dans le cas d'une diffusion infinie.

L'impédance de Warburg  $Z_w$  est égal à [8]:

$$Z_w = \frac{S_i}{\sqrt{\omega}} (1 - j) \quad \text{Equation II-24}$$

avec :

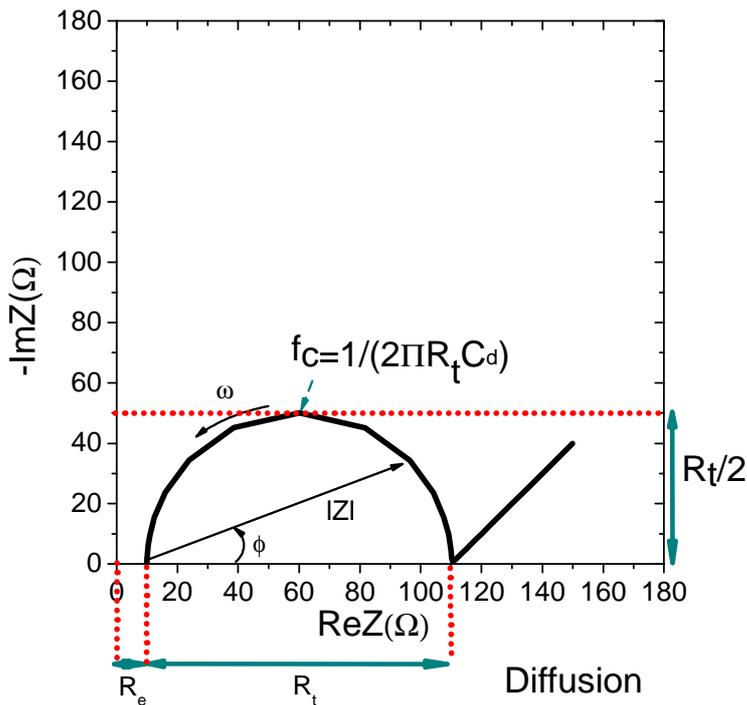
$$S_i = \frac{RT}{(nF)^2 S \sqrt{2}} \left( \frac{1}{C_i D_i^{1/2}} \right) \quad \text{Equation II-25}$$

Deux types de représentation existent pour l'impédance électrochimique  $Z$  : celle de Bode et celle de Nyquist.

Le diagramme de Nyquist représente la partie imaginaire de l'impédance,  $Im(Z)$ , en fonction de la partie réel,  $Re(Z)$ . Chaque point correspond à une fréquence donnée du signal d'entrée. Dans notre cas, le transfert de charge hétérogène est représenté par une boucle en forme de demi-cercle de rayon  $R_t$ , et la diffusion par une droite de pente  $45^\circ$ . Le demi-cercle et la droite sont décalés de l'origine. Le point à haute fréquence sur l'axe des réels est dans le cas présent, la résistance de l'électrolyte,  $R_e$ . Ce type de représentation permet de déterminer la valeur de la capacité de double couche  $C_d$  grâce à la fréquence caractéristique  $f_c$  située au maximum du demi-cercle. Le diagramme de Bode consiste à tracer le logarithme du module de  $Z$ ,  $|Z|$ , et de la phase,  $\Phi$ , en fonction du logarithme de la fréquence. Le tracé du module de  $Z$  permet de déterminer  $R_e$  et  $R_t$ . Cependant les diagrammes de Bode ne permettent pas une détermination rapide de la fréquence caractéristique. La Figure II-8 et la Figure II-9 montrent

la représentation de Nyquist et de Bode pour une interface électrode/solution suivant le schéma équivalent de la Figure II-7 : **Schéma électrique équivalent d'un système électrochimique dans le cas d'une diffusion infinie.**

Cette simulation est illustrée avec le logiciel Simad développé au laboratoire. Les paramètres entrés dans le logiciel sont :  $R_e = 10 \Omega$  ;  $R_t = 100 \Omega$  ;  $C_d = 1 \times 10^{-5} \text{F}$  ; et  $S_1=1$  pour le paramètre de l'impédance de Warburg.



**Figure II-8 : Diagramme de Nyquist de l'interface solution/électrode avec  $R_e = 10 \Omega$ ,  $R_t = 100 \Omega$ ,  $C_d = 1 \times 10^{-5} \text{F}$  simulé avec le logiciel Simad.**

En utilisant les valeurs précédentes, une fréquence caractéristique est trouvée égale à 159 Hz.

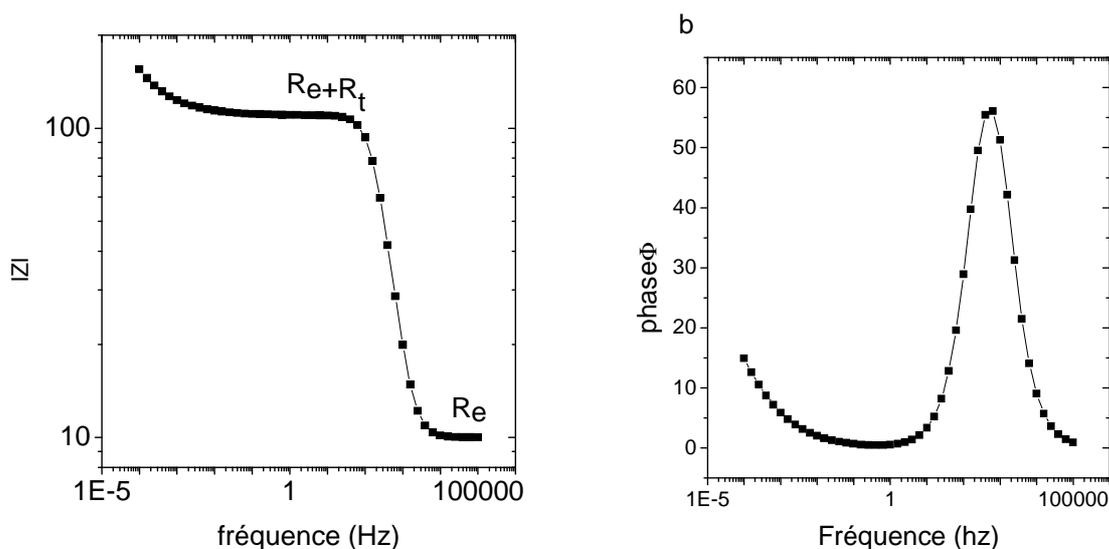


Figure II-9 : Diagramme de Bode. Représentation de la phase en fonction de la fréquence ainsi que du module de  $Z$  en fonction de la fréquence avec  $R_e = 10 \Omega$ ,  $R_t = 100 \Omega$   $C_d = 1 \times 10^{-5} F$  simulé avec le logiciel Simad.

### II.1.6. Appareillage

Les mesures électrochimiques sont réalisées sur un potentiostat de modèle Biologic SP 300 équipé d'un module pour petit courant. Le logiciel d'acquisition EC-lab est fourni avec l'instrumentation.

L'électrode de référence choisie (sauf mention contraire) est une électrode au calomel saturé (ECS). Dans le cas de l'utilisation de cette électrode de référence, le potentiel de l'électrode de travail sera exprimé en V/ECS. La contre électrode est une grille de platine de grande dimension. Les diagrammes d'impédance seront simulés avec le logiciel Simad conçu au laboratoire LISE.

## II.2. Préparation des films de carbone amorphe azoté sur verre/ITO

### II.2.3. La pulvérisation cathodique diode magnétron en courant continu

Cette méthode de dépôt est basée sur la collision entre un ion d'un plasma et un atome du matériau de la cible (cathode). [9]

Un champ électrique est appliqué entre deux électrodes : l'anode et la cathode (ensemble supportant la cible) polarisée négativement. Ceci induit l'ionisation du gaz et la création d'une décharge électroluminescente (plasma). L'établissement d'un courant

électrique entre ces deux électrodes entraîne un déplacement des électrons vers l'anode et des ions positifs vers la cathode. Il en résulte une pulvérisation du matériau de la cible qui se condense ensuite sur le substrat placé face à la cathode (Figure II-10).

### II.2.3.1 Principe général

Le plasma est composé d'électrons et d'ions qui peuvent se déplacer dans toutes les directions de l'espace.

Le plasma se crée de la façon suivante : les électrons libres, dits électrons primaires, présents dans le gaz sont accélérés quand on applique une forte tension électrique entre les électrodes. Dans ce champ électrique, les particules chargées sont soumises aux forces électrostatiques. Pour les électrons cette force s'exprime par  $F = -eE$  ( $E$  étant le champ électrique) et pour les ions monochargés par  $F = eE$ . Il y a alors ionisation du gaz grâce à des collisions inélastiques avec les électrons. Les ions positifs générés sont fortement accélérés vers la cathode polarisée négativement. Il y alors un bombardement de la cathode qui peut entraîner (par transfert d'énergie) l'expulsion d'atomes de la cible et d'électrons secondaires. Ces électrons secondaires entretiennent la décharge. Il peut y avoir ensuite recombinaison ions-électrons ou désexcitation des molécules. Celles-ci se relaxent vers un état plus stable avec éjection de photons ce qui crée la décharge électroluminescente. La longueur d'onde de la lumière émise est caractéristique de la nature du gaz utilisé, les plasmas d'azote, d'oxygène et d'argon émettent respectivement une lumière orange, verte et violette.

Le mécanisme à la base de l'ionisation est :

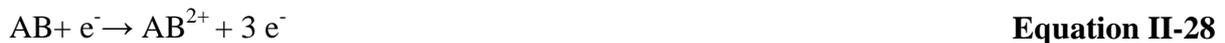


En réalité, le mécanisme est plus complexe [10] :

Il peut y avoir une ionisation simple :



Ionisation double :



Et des fragmentations:



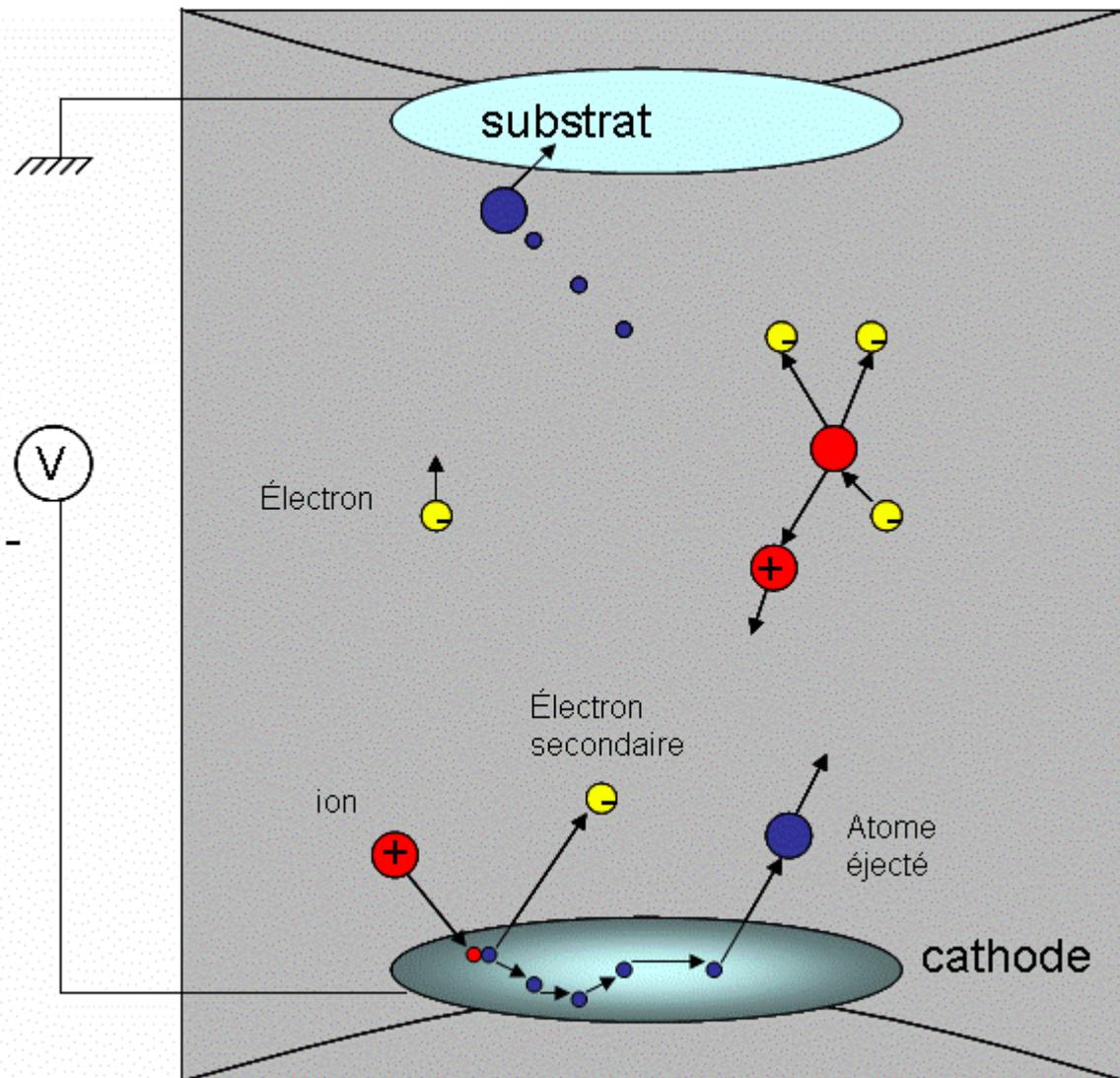


Figure II-10 : Principe du dépôt par pulvérisation cathodique.

### II.2.3.2 Cathode magnétron.

En pulvérisation cathodique diode, les vitesses de dépôts sont très faibles ( $< 100 \text{ nm/h}$ ) à cause du faible taux d'ionisation de la décharge [9]. Pour remédier à ce problème, une cathode de type magnétron est utilisée. Sous la cible, des aimants sont placés de manière à créer un champ magnétique perpendiculaire au champ électrique. Ces lignes de champs permettent de piéger les électrons au voisinage de la cible et ainsi d'augmenter la probabilité de collisions entre un électron et les atomes du gaz. La densité du plasma est donc accrue et celui-ci est confiné entre les aimants ce qui entraîne une érosion très localisée de la cible (Figure II-11). L'utilisation d'une cathode magnétron permet ainsi d'augmenter les vitesses de dépôts (dans la gamme des  $10 \text{ }\mu\text{m/h}$ ).

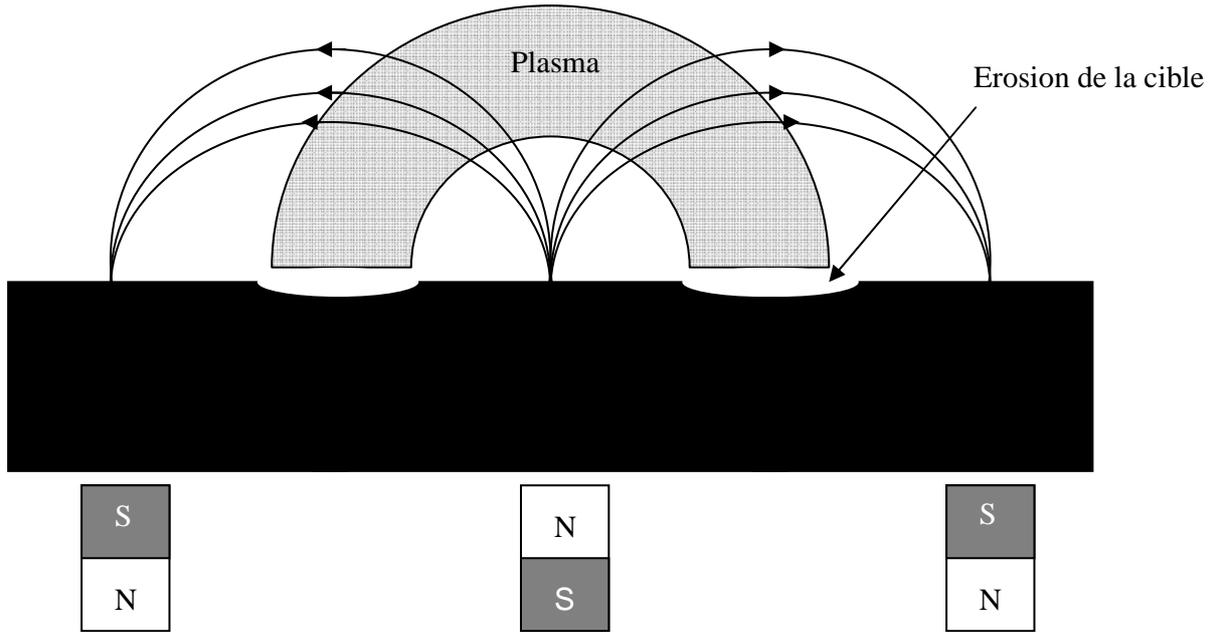


Figure II-11 : Vue en Coupe d'une cathode magnétron.

## II.2.4. Conditions de dépôts des couches minces de carbone azoté amorphe

### II.2.4.1 Propriété du substrat Verre/ITO.

L'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO Indium Tin Oxide) est un oxyde transparent conducteur. L'ITO est un mélange d'oxyde d'indium ( $\text{In}_2\text{O}_3$ ) et d'oxyde d'étain ( $\text{SnO}_2$ ). Ce matériau est couramment utilisé comme conducteur transparent pour les écrans à cristaux liquides, les écrans plasma, les écrans tactiles ainsi que comme couche antireflet et comme protection contre les champs électromagnétiques. L'ITO est un semi-conducteur dégénéré de type n à bande interdite directe (3,5-4,3 eV) [11]. L'ITO possède une résistivité allant jusqu'à  $10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$  et une concentration de porteurs de charge allant de  $10^{20}$  à  $10^{21} \text{ cm}^{-3}$ . La faible résistivité est due à la concentration importante de porteurs. D'autre part, l'ITO présente également des propriétés optiques intéressantes. En effet, il présente une transmission optique importante (>95%) dans le visible et l'infrarouge [12].

### II.2.4.2 Mise en conditions des substrats verre/ITO

Les dépôts sont réalisés sur des lamelles d'ITO provenant de chez SOLEMS. Ces dépôts d'ITO sont réalisés par pulvérisation cathodique magnétron sur verre de 1,1cm d'épaisseur. La couche d'ITO est d'environ 1000 Å pour une résistance carré de 30 à 50  $\Omega$ .

Les substrats sont nettoyés de manière systématique par un procédé chimique dans des bains à ultrasons successifs d'acétone pendant 10 min, d'éthanol pendant 5 min et d'eau bi distillée pendant 5 min. Ensuite pour faciliter l'accroche de la couche de a-CN<sub>x</sub> un décapage ionique est réalisé pendant 30 s à 100 W (-350 V) à cause de la polarisation du substrat par un générateur Radio Fréquence (RF).

### II.2.4.3 Condition de dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur verre/ITO

Le réacteur de dépôts utilisé au LISE est le modèle MS 300S de PLASSYS S.A (France). L'enceinte est en acier inoxydable de diamètre 320 mm et de hauteur 250 mm. La cible, circulaire de diamètre 75 mm et d'épaisseur 5 mm, est composée de carbone graphite de pureté 99,999 %. Le bâti possède deux alimentations ; une alimentation RF de 300 W *ENI* reliée au porte substrat, et une alimentation DC 1000 W (générateur *Advanced Converter MP-1*) pour la cible carbone/cathode.

Les dépôts sont réalisés avec une pression de gaz totale de 0,4 Pa dans l'enceinte. Dans notre cas, le plasma est constitué d'un mélange d'argon et d'azote, la pression partielle d'azote variant de 0% à 30%. La puissance appliquée par le générateur DC à la cible est de 200 W pendant 20 minutes pour tous les échantillons (sauf mention contraire).

Par la suite, les protocoles P3, P7, P15, P0 et P30 seront définis comme indiqué dans le Tableau II-1 :

Nom	Pression totale (Pa)	Pression partielle de N <sub>2</sub> dans le plasma	Puissance du dépôt (W)	Temps de dépôts (min)
P3	0,4	3%	200	20
P7	0,4	7%	200	20
P15	0,4	15%	200	20
P30	0,4	30%	200	20
P0	0,4	0%	200	20

Tableau II-1 : Protocoles de dépôts des films de a-CN<sub>x</sub> sur verre/ITO par pulvérisation cathodique utilisé dans cette thèse.

### II.2.5. Fabrication des électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur verre/ITO

Sur la face où le a-CN<sub>x</sub> est déposé un disque de polystyrène de diamètre 6 mm et de hauteur de 4 mm est collé. Ce disque nous permet d'avoir des électrodes de surface constante (0,282 cm<sup>2</sup>) et aussi d'éviter la distribution des courants primaires. Par la suite, les bords de l'électrode ainsi que le pourtour de la face avec le a-CN<sub>x</sub> sont isolés pour que seul le disque

défini soit en contact avec l'électrolyte. Cette isolation est réalisée avec de la résine époxy. L'électrode est connectée au niveau de la zone non recouverte de a-CN<sub>x</sub>. Le courant passe donc à travers la couche d'ITO et arrive par-dessous la couche de a-CN<sub>x</sub> au niveau du puits (Figure II-12).

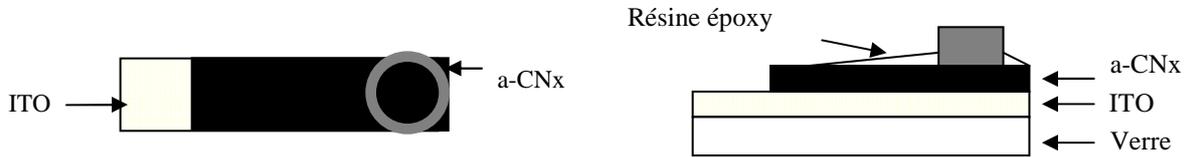


Figure II-12 : Géométrie des électrodes de travail pour les tests électrochimiques. a) Vu de dessus. b) Vu de profil.

### II.3. Principe d'analyse des dépôts

#### II.3.3. Spectrométrie photoélectronique X (XPS : X-Ray Photoelectron Spectrometry)

##### II.3.3.1 Principe

La spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X est une technique d'analyse qui permet la détermination de la composition ainsi que la nature des éléments chimiques présents dans l'extrême surface du matériau étudié.

Lors de l'analyse XPS, des photons X monochromatiques (Al K $\alpha$  ou Mg K $\alpha$ ) bombardent l'échantillon à analyser. Chacun de ses photons possède une énergie  $h\nu$ . Suite à cette irradiation, l'énergie cinétique des électrons photo émis est mesurée. Dans le cas où l'énergie de liaison de l'électron est inférieure à l'énergie du photon X, celui-ci est absorbé et un photoélectron est éjecté avec une énergie cinétique  $E_c$  (Figure II-13).

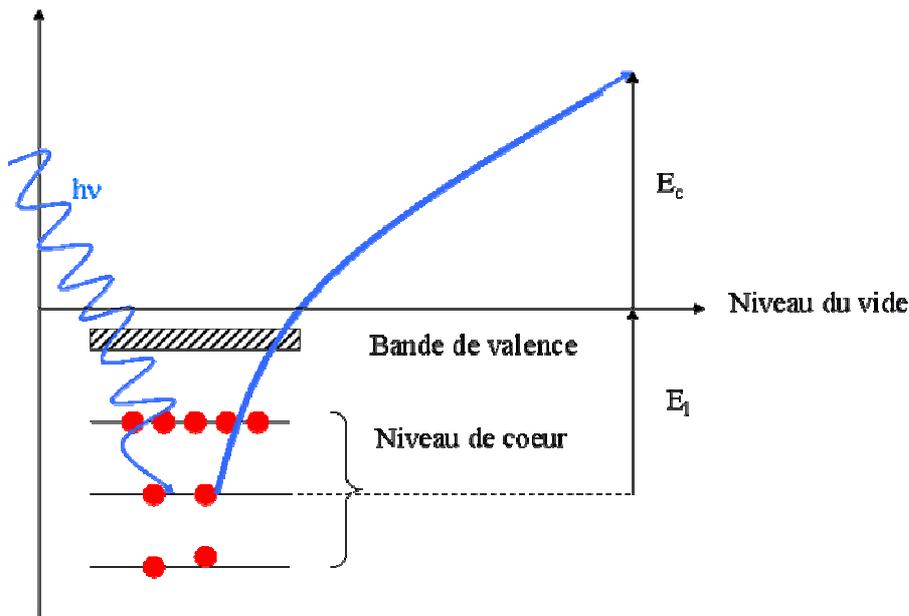


Figure II-13 : Diagramme énergétique de la photoémission.

L'énergie de liaison de cet électron est alors directement accessible par application de la conservation d'énergie après mesure de  $E_c$ .

$$E_l = h\nu - E_c.$$

**Equation II-32**

avec  $E_l$ , l'énergie de liaison en Joule.

$E_c$ , l'énergie cinétique électronique en Joule.

$h$ , la constante de Planck en Joule.s.

$\nu$ , la fréquence de radiation en  $s^{-1}$ .

Les spectres XPS présentant les énergies de liaisons des électrons de cœur sont caractéristiques de la nature de l'atome. Ceci permet donc d'identifier l'élément chimique. L'XPS détecte tous les atomes possédant des niveaux de cœur (c'est-à-dire tous sauf l'hydrogène et l'hélium).

Le photoélectron peut subir des interactions inélastiques lors de son transfert vers la surface à travers le solide. La distance que peut parcourir le photoélectron entre deux chocs inélastiques est le libre parcours moyen ( $\lambda$ ). Celui-ci dépend de l'énergie cinétique de l'électron et des propriétés du matériau (densité, composition).  $\lambda$  limite donc l'épaisseur qu'il est possible d'analyser. De ce fait, cette technique est une méthode d'analyse de surface non destructive.

L'XPS est une méthode d'analyse chimique. En effet, les niveaux de cœur réagissent à la modification de leur environnement électronique, l'énergie de liaison varie donc de façon significative selon cet environnement. Cette variation, appelée déplacement chimique, est

caractéristique du type et du nombre d'atomes lié à l'atome émetteur. Ce déplacement chimique permet d'avoir des informations sur la nature des liaisons, le degré d'oxydation et d'identification des composés.

### **II.3.4. Microscopie à force atomique**

La microscopie à force atomique AFM (atomic force microscope) permet de visualiser la topographie d'une surface d'échantillon. Les images en trois dimensions sont obtenues par balayage d'une surface à l'aide d'une pointe dure ou sonde. Cette microscopie permet également des mesures de conductivités locales [13], [14]. Plusieurs modes d'AFM existent suivant l'application : mode contact, non contact, tapping et current-sensing.

#### **II.3.4.1 Principe**

Le principe physique de cette technique est basé sur la mesure des forces d'interaction s'exerçant entre deux corps en fonction de leur distance de séparation. Dans un AFM, l'échantillon à analyser est déplacé dans les trois dimensions à l'aide d'une céramique piézoélectrique. Le microscope est constitué de la pointe de dimension nanométrique montée sur un microlevier souple. Ce système peut être assimilé à un système masse-ressort de raideur  $k$  très faible, ce qui lui permet d'être sensible aux faibles variations des forces d'interactions. La détection des déformations (déflexions ou frictions) est mesurée par un faisceau laser. Celui-ci est réfléchi par la face arrière du microlevier à travers une photodiode à quatre cadrans. Ces déformations se traduisent par la déviation du faisceau par rapport à une position de référence. Ce procédé est répété pour différentes positions verticales aboutissant à la construction d'une image tridimensionnelle. La position de l'échantillon par rapport à la pointe, entre chaque position, est réalisée grâce à une boucle d'asservissement (contre réaction). Les différents éléments constituant un microscope à force atomique sont référencés dans la Figure II-14.

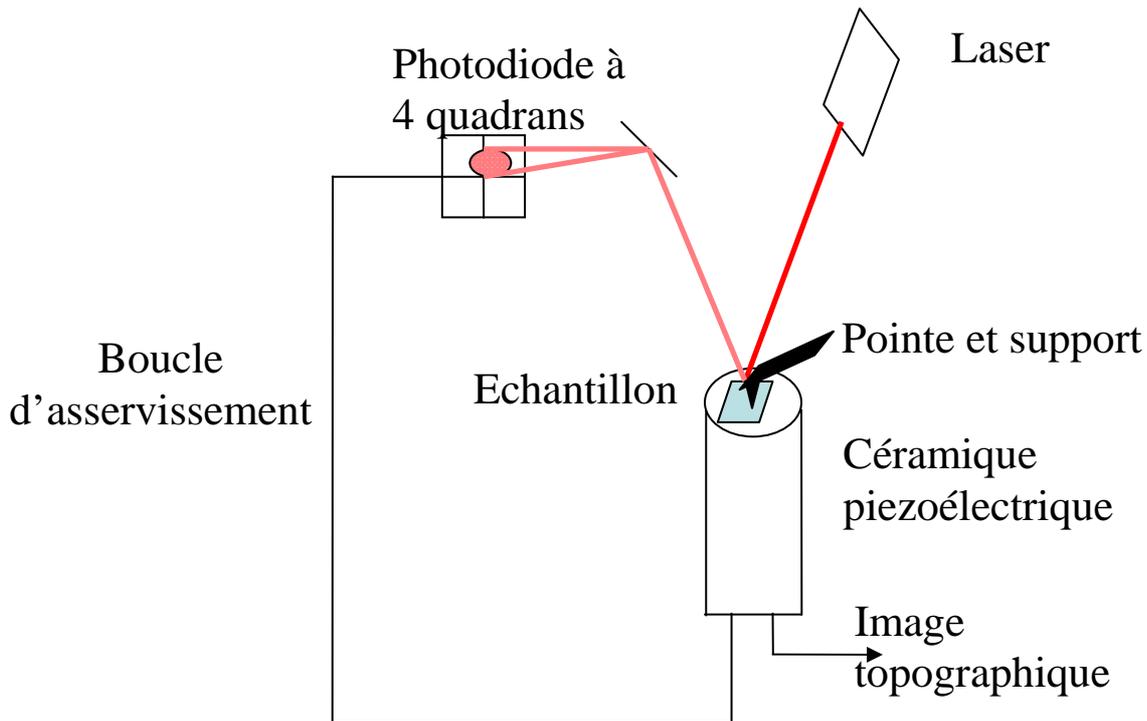


Figure II-14 : Schéma d'un AFM.

Les forces mises en jeu dans cette microscopie sont dues aux interactions qui existent entre deux atomes non liés. Ces forces d'interactions peuvent être des forces de Van der Waals, de capillarité, d'adhésion, magnétique ou électrostatique. A grande distance, les forces attractives de Van der Waals prédominent tandis qu'à faible distance ce sont les forces répulsives qui sont prépondérantes.

### II.3.4.2 Mode de fonctionnement

Plusieurs modes de fonctionnement existent selon la distance séparant la pointe de l'échantillon : le mode contact, non-contact et mode tapping. Ces différents types de fonctionnement permettent de mesurer différents types de forces. De plus, ces modes de fonctionnement non pas les mêmes applications.

Le mode contact permet d'obtenir directement la topographie de la surface. Dans ce cas, la force exercée sur le microlevier supportant la pointe est maintenue constante et est proportionnelle à la déflexion du levier qui sera la grandeur mesurée. Dans ce mode, des forces de frottements importantes sont induites entre la pointe et la surface de l'échantillon. Cette technique limite donc le type d'échantillon que l'on peut analyser. En effet, ces forces de frottement peuvent dégrader les échantillons constitués de matière molle ou bien dégrader la pointe AFM si l'échantillon présente un caractère abrasif. Dans ce cas la pointe n'est pas en contact avec la surface (mode non contact) l'analyse des forces de longues portées sont de

type magnétique ou électrostatique. Dans le mode tapping, la sonde est au contact de la surface de manière intermittente. Le microlevier oscille à une fréquence fixée. Cette technique permet de limiter les forces de frottement appliquées sur l'échantillon par rapport au mode contact, car le temps de contact est relativement court.

Un autre type de mode de fonctionnement de l'AFM est le mode « Current –Sensing » (CS-AFM). Il résulte du couplage du mode contact de l'AFM avec un dispositif de mesure électrique nécessitant l'utilisation d'une pointe conductrice [15]. Ce mode permet une caractérisation électrique des surfaces conductrices. Pour cela, un bias est appliqué entre l'échantillon et la sonde AFM. Le courant qui traverse le contact pointe/échantillon est alors enregistré pour chaque position durant le balayage de la pointe. Des courbes représentant le potentiel en fonction du courant mesuré peuvent alors être enregistrées.

### II.3.4.3 Appareillage

L'équipement AFM utilisé au LISE est de marque Molecular–Imaging (basse Pico SPM-LE). Celui-ci est composé d'un nez AFM spécifique fabriqué au LISE, d'un scanner large zone ( $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) ou petite zone ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) et d'un contrôleur (Picoscan SPM 2100). L'ensemble est piloté par le logiciel PicoScan 5.3.2.

Les sondes pour le mode contact sont constituées de silicium  $\text{Si}_3\text{N}_4$  et sont formées des 4 cantilevers triangulaires (deux petits et deux grands). Les données des cantilevers sont notées dans le Tableau II-2.

cantilever	Longueur ( $\mu\text{m}$ )	largeur ( $\mu\text{m}$ )	Epaisseur (nm)	Constante de raideur ( $\text{N.m}^{-1}$ )
grand	200	28	600	0,08
petit	100	13,5	600	0,32

**Tableau II-2 : Valeurs des dimensions et des constantes de raideur des cantilevers.**

Ces sondes sont recouvertes d'une couche de chrome/or sur la face arrière afin de permettre la réflexion du faisceau laser. La couche de chrome sert d'accroche pour la couche d'or.

Les pointes CS-AFM sont revêtues d'une couche conductrice constituée d'un alliage PtIr<sub>5</sub> (l'iridium est présent à 5% dans l'alliage). Cette sonde comporte un cantilever rectangulaire de 225 µm de longueur, 28 µm de largeur et 3 µm d'épaisseur (valeurs indicatrices données par le fournisseur) de constante de raideur de 1,2-5,5 N/m. Pour l'application CS-AFM, des nez CS-AFM donnant accès à des gammes de courant plus large ont été élaborés au laboratoire par l'électronicien et le mécanicien du laboratoire. Ces nez offrent des gammes de courant de  $\pm 100$  nA et  $\pm 1\mu$ A contrairement au nez CS-AFM commercial qui offre une gamme de  $\pm 10$  nA

## II.4. Références

- [1] J.-M. Savéant, *Elements of molecular and biomolecular electrochemistry*. John Wiley & Sons, Inc, 2006, pp. 5–105.
- [2] H. H. Girault, *Electrochimie physique et analytique*. Presses polytechnique et universitaires Romande, 2007, pp. 479–490.
- [3] D. A. Skoog, M. Donald, M. West, and J. F. Holler, *Chimie analytique -traduction et révision scientifique de la 7ème édition américaine*. 1997, pp. 486–489.
- [4] F. Miomandre, S. Sadki, P. Audebert, and R. Méallet-Renault, *Electrochimie-2ème édition: des concepts aux applications*: 2011, p. 172.
- [5] P. R. Unwin, A. J. Bard, and M. Stratmann, *Encyclopedia of electrochemistry. Vol 3, Instrumentation and electroanalytical chemistry*. 2003.
- [6] Á. Molina, F. Martínez-ortiz, E. Laborda, and R. G. Compton, “Characterization of slow charge transfer processes in differential pulse voltammetry at spherical electrodes and microelectrodes,” *Electrochimica Acta*, vol. 55, pp. 5163–5172, 2010.
- [7] C. Gabrielli, “Méthodes Electrochimiques Mesures d’impédances,” *Techniques de l’ingénieur*, pp. PE 2 210–1–6.
- [8] M. Bockris, K. N. Amulya, and M. Reddy, *Modern electrochemistry, volume 2*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2000, p. 1133.
- [9] A. Billard and F. Perry, “Pulvérisation cathodique magnétron,” *Techniques de l’ingénieur*, pp. 31 654 –1–17.
- [10] A. Lagrini, “Elaboration et caractérisations physico-chimiques de couches minces de carbone amorphe azoté a-CNX pour applications électrochimiques,” UPMC, 2005.
- [11] L. Gupta, A. Mansingh, and P. K. Srivastava, “Band Gap Narrowing and the band structure of tin-doped indium oxide films,” *Thin Solid Films*, vol. 176, pp. 33–44, 1989.
- [12] T. Minami, H. Sonohara, T. Kakumu, and S. Takata, “Physics of very thin IT0 conducting films with high transparency prepared by DC magnetron sputtering,” *Thin Solid Films*, vol. 270, pp. 0–5, 1995.
- [13] A. Pailleret, S. Grivau, and F. Bedioui, “Couplages electrochimie-microscopie en champ proche,” *Techniques de l’ingénieur*, pp. 2–133 1–18.
- [14] J. . Rivoal and C. Fretigny, “Microscopie à force atomique AFM,” *Techniques de l’ingénieur*, pp. -1–1394–1–18.
- [15] C. Deslouis, J. De Sanoit, S. Saada, C. Mer, A. Pailleret, H. Cachet, and P. Bergonzo, “Electrochemical behaviour of ( 111 ) B-Doped Polycrystalline Diamond: Morphology

/ surface conductivity / activity assessed by EIS and CS-AFM,” *Diamond & Related Materials*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, 2011.



# Chapitre III

## Caractérisation des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur ITO

---

<b>III.1. Caractérisations microstructurales des couches de a-CN<sub>x</sub> .....</b>	<b>79</b>
III.1.3. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS) .....	79
III.1.3.1 Détermination du taux d'azote incorporé en surface .....	80
III.1.3.2 Exploitation des spectres XPS .....	82
III.1.3.2.1 Niveau Carbone 1s .....	82
III.1.3.2.2 Niveau Azote 1s .....	84
III.1.4. Caractérisation des films par microscopie électronique (SEM-FEG) .....	86
III.1.5. Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM) .....	87
III.1.5.1 Propriété de rugosité des substrats .....	87
III.1.5.2 Conductivité électrique locale des films de a-CN <sub>x</sub> .....	89
<b>III.2. Propriétés électrochimiques .....</b>	<b>97</b>
III.2.3. Détermination des conditions optimales pour les dépôts a-CN <sub>x</sub> sur ITO .....	97
III.2.3.1 Fenêtre de potentiel .....	97
III.2.3.2 Prétraitement électrochimique .....	100
III.2.4. Etude dans KCl .....	101
III.2.4.1 Modélisation électrique de l'interface verre/ITO/a-CN <sub>x</sub> /Electrolyte. ....	102
III.2.4.2 Spectroscopie d'impédance électrochimique pour les électrodes P15 dans KCl.....	102
III.2.4.3 Spectroscopie d'impédance électrochimique pour les électrodes P30 dans KCl.....	110
III.2.5. Etude électrochimique d'un couple redox sur les dépôts de CN <sub>x</sub> sur ITO P15 .....	115
III.2.5.1 Electrode sans prétraitement.....	116
III.2.5.2 Electrode avec prétraitement dans KCl .....	120
III.2.5.2.1 Spectroscopie d'impédance électrochimique au potentiel d'équilibre du couple ferricyanure/ ferrocyanure .....	121
III.2.5.2.2 Voltammétrie cyclique .....	124
III.2.5.2.2.1 Comparaison des voltammogrammes avant et après prétraitement.....	124
III.2.5.2.2.2 Voltammétrie cyclique du ferricyanure à différentes vitesses de balayage .....	126
III.2.5.2.3 Spectroscopie d'impédance électrochimique à différents potentiels.....	128
III.2.6. Etude électrochimique d'un couple redox sur les dépôts de CN <sub>x</sub> sur ITO P30 .....	131
III.2.6.1 Voltammétrie cyclique .....	132
III.2.6.2 Spectroscopie d'impédance électrochimique .....	133
III.2.6.3 Comparaison entre CN <sub>x</sub> P15 et CN <sub>x</sub> P30.....	136
<b>III.3. Conclusion .....</b>	<b>137</b>
<b>III.4. Références.....</b>	<b>140</b>



Le a-CN<sub>x</sub> est un matériau présentant une large fenêtre de polarisabilité et une réactivité électrochimique modulable. Le a-CN<sub>x</sub> peut être utilisé pour plusieurs applications. En effet, le a-CN<sub>x</sub> peut servir de matériau d'électrode pour la détection sur puce ou comme interface idéalement polarisable pour le contrôle du flux électroosmotique.

Ces deux utilisations ne nécessitent pas les mêmes propriétés des matériaux. Dans le cas de l'utilisation comme électrode, le a-CN<sub>x</sub> doit avoir une large fenêtre de potentiel et la meilleure réactivité électrochimique possible. Dans le cas de l'utilisation comme l'interface polarisable, le a-CN<sub>x</sub> doit avoir une grande fenêtre de potentiel. La modulation du flux à l'aide de l'interface polarisable dépend de la conductivité de celle-ci. Une bonne réactivité électrochimique n'est pas nécessaire.

Les films de a-CN<sub>x</sub> sont déposés sur des couches d'ITO. Ces substrats permettent d'avoir une sous couche d'accroche du CN<sub>x</sub> transparente et conductrice. La transparence des dépôts sur ITO permettra d'utiliser une technique de détection optique et électrochimique. De plus, l'utilisation d'une sous couche conductrice permet d'avoir des conductivités des films suffisantes pour pouvoir contrôler le flux électroosmotique [1].

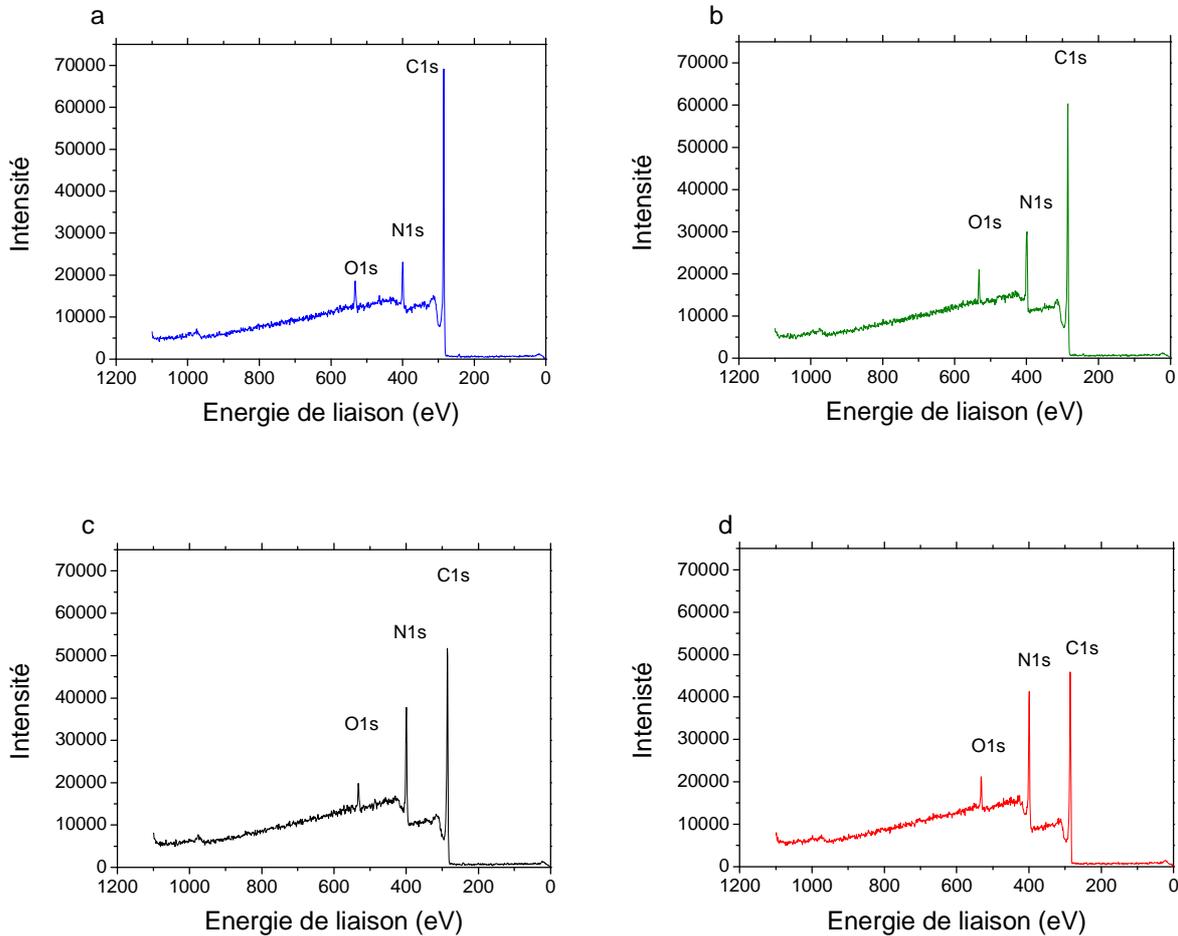
### ***III.1. Caractérisations microstructurales des couches de a-CN<sub>x</sub>***

La stoechiométrie des films de a-CN<sub>x</sub> ainsi que leurs teneurs relatives en sites Csp<sup>2</sup> et Csp<sup>3</sup> sont déterminées par XPS. En effet, la composition des films est un paramètre influant sur les propriétés électrochimiques des films. Cette réactivité électrochimique dépend de leur structure chimique et notamment du nombre de liaisons CN sp<sup>3</sup>. En effet, des études réalisées par Cachet *et al.* ont montré que les liaisons sp<sup>3</sup> agissent comme des sites isolants [2][3]. Nous avons entrepris une caractérisation XPS des films de a-CN<sub>x</sub> déposés à l'aide des quatre protocoles présentés dans la partie II.2.2.3.

#### **III.1.3.Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)**

Les analyses XPS ont été réalisées sur les échantillons préparés avec quatre pressions partielles dans le plasma (3, 7, 15 et 30%). La Figure III-1 montre les spectres XPS des couches minces selon la pression partielle d'azote dans le gaz. Ces spectres sont composés de pics superposés à un signal de bruit de fond attribuable aux photoélectrons ayant perdu de l'énergie après des chocs inélastiques. Les pics sont identifiés à partir de l'énergie à laquelle ils se trouvent. Les électrons, issus de la couche 1s des atomes d'oxygène, sont situés autour

de 536 eV, ceux des couches 1s de l'azote et du carbone sont respectivement situés à 400 eV et 282 eV (Figure III-1).



**Figure III-1 : Spectre général des films minces a-CN<sub>x</sub> déposés sur verre/ITO par pulvérisation cathodique DC selon différents protocoles. (a) P3. (b) P7. (c) P15. (d) P30.**

La présence de l'oxygène est vraisemblablement due à deux raisons. La première étant la mise à l'air des échantillons entraînant des réactions avec l'eau et l'oxygène de l'air. La seconde étant l'oxygène présent en très faible quantité dans les gaz du dépôt dont la pureté est supérieure à 99,998% pour l'argon et supérieure à 99,995% pour l'azote.

### III.1.3.1 Détermination du taux d'azote incorporé en surface

L'XPS permet de déterminer le taux d'azote à la surface des différentes couches de a-CN<sub>x</sub> pour les différents pourcentages en pression partielle d'azote dans le plasma (3%, 7%, 15%, 30%). Pour cela, chaque pic est isolé, et le fond continu est soustrait en utilisant la méthode de Shirley [4]. La composition chimique de la surface de la couche est déterminée

par l'aire des pics pondérée en utilisant les coefficients de Scofield liés à la nature des éléments [5].

Le Tableau III-1 montre les pourcentages calculés d'azote, d'oxygène et de carbone dans les couches de a-CN<sub>x</sub> en fonction de la pression partielle P(N<sub>2</sub>) dans le plasma.

P(N <sub>2</sub> ) %	O	N	C
3	3,9	11,4	84,6
7	3,7	17,0	79,2
15	3,6	24,8	71,6
30	4,3	28,8	66,9

**Tableau III-1 : Valeurs des pourcentages atomiques calculés d'azote, d'oxygène et de carbone dans les films minces selon les protocoles P3, P7, P15 et P30.**

Le pourcentage d'oxygène dans le film mince ne dépend pas de la pression partielle d'azote dans le gaz. D'autre part, le pourcentage d'azote dans le film augmente de façon non linéaire avec la pression partielle d'azote dans le gaz, tandis que le pourcentage de carbone diminue de façon non linéaire.

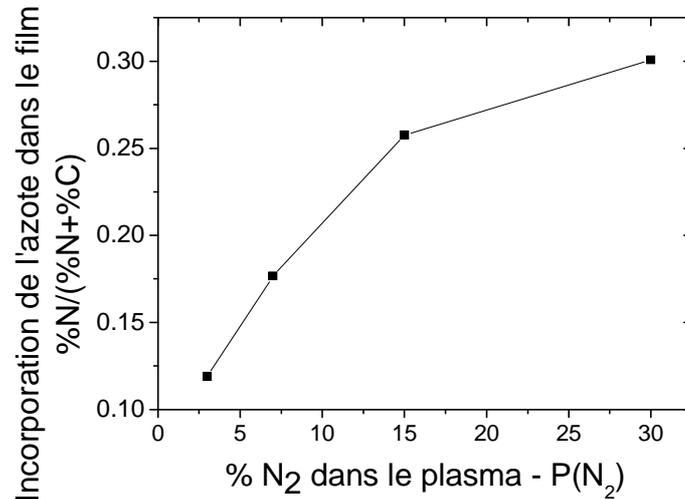
Les données XPS permettent de déterminer la stœchiométrie des films minces en considérant le rapport du pourcentage d'azote dans le film divisé par la somme des pourcentages d'azote et de carbone dans le film (Tableau III-2).

P3	P7	P15	P30
a-CN <sub>0.12</sub>	a-CN <sub>0.18</sub>	a-CN <sub>0.26</sub>	a-CN <sub>0.30</sub>

**Tableau III-2 : Stœchiométrie des films minces en fonction du type de protocole de dépôts.**

L'évolution de la quantité d'azote incorporée en surface en fonction de la pression partielle dans le plasma est tracée et celle-ci n'est pas directement proportionnelle à la pression partielle dans le plasma (Figure III-2). Ce résultat a également été observé sur des dépôts de CN<sub>x</sub> déposé par pulvérisation magnétique radiofréquence sur des substrats de silicium dopé n [6]. Cependant, les films minces de a-CN<sub>x</sub> contiennent plus d'azote atomique dans le film pour tous les pourcentages d'azote par rapport à ceux réalisés au LPCM d'Amiens [6]. Cette différence peut être attribuée à la présence d'hydrogène dans ces films cependant celle-ci n'a pas été quantifiée. Les techniques de pulvérisation sont également différentes, une pulvérisation radiofréquence dans le cas des dépôts réalisés par Lagrini *et al.* et en courant continu dans notre cas. Cependant, d'autres analyses réalisées au laboratoire sur

CN<sub>x</sub>/Si dopé n sans radiofréquence et sur CN<sub>x</sub>/Si intrinsèque avec radiofréquence ont montré une stoechiométrie identique [7]. On peut donc supposer que la différence de stoechiométrie observée entre nos expériences et celles réalisées au LPCM est due à la présence d'hydrogène.



**Figure III-2 : Variation de l'incorporation dans le film en fonction de la pression partielle de N<sub>2</sub> dans le gaz pour les protocoles P3, P7, P15 et P30.**

La variation que nous trouvons est conforme aux résultats d'études précédentes sur d'autres substrats. Ainsi, la non linéarité de la courbe traduit deux régimes d'insertion de l'azote. L'insertion d'azote dans les films se fait par remplacement des atomes de carbone dans les agrégats graphitiques [7].

### III.1.3.2 Exploitation des spectres XPS

#### III.1.3.2.1 Niveau Carbone 1s

Les spectres C1s des quatre échantillons indiquent une augmentation de la largeur de pic lorsque la pression partielle de N<sub>2</sub> dans le gaz augmente (Figure III-3).

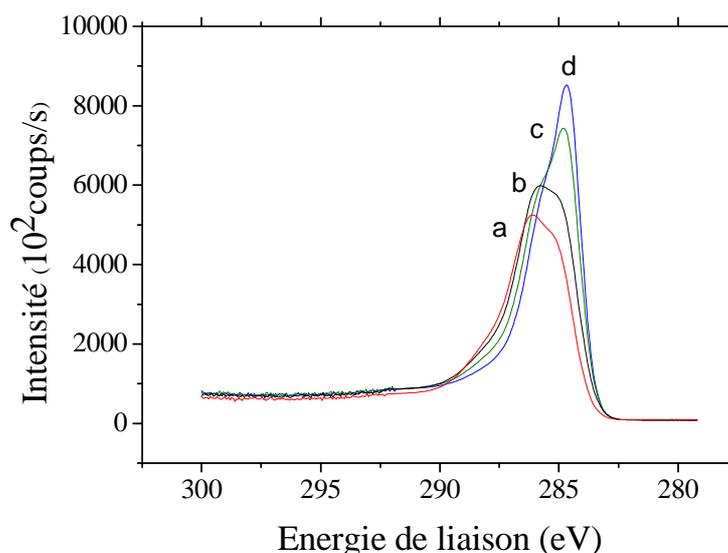


Figure III-3 : Spectres XPS C1s selon le protocole de dépôts. a) P30. b) P15. c) P7. d) P3.

La déconvolution du pic en 3 gaussiennes permet de déterminer la contribution des différents types de liaisons dans le film (Tableau III-3). Une énergie de liaison de 288 eV correspond à une liaison C-N dans des configurations non aromatiques C<sub>2</sub>N<sub>2</sub> ou Sp<sup>3</sup>CN, 286 eV pour une liaison C-C\*=N et 284 eV pour une liaison C-C ou C=C [8–12].

Pression partielle de N <sub>2</sub> dans le gaz (en %)	Aire en % pour une énergie de liaison 288 eV C-N (en %)	Aire en % pour une énergie de liaison 286 eV C-C*=N (en %)	Aire en % pour une énergie de liaison 284 eV C-C ou C=C (en %)
3	2,9	37,8	59,3
7	5,2	40,0	55,9
15	8,0	47,6	44,4
30	11,6	47,7	40,6

Tableau III-3 : Aire correspondante aux différents types de liaisons selon la pression partielle de N<sub>2</sub> dans le mélange de pulvérisation pour les protocoles P3, P7, P15 et P30.

Une augmentation du pourcentage de liaison carbone-azote et une diminution du pourcentage de liaison Carbone-Carbone est observée avec l'augmentation de la pression partielle d'azote dans le film. Avant d'atteindre une pression partielle d'azote dans le film de 15%, les liaisons carbone-carbone sont majoritaires dans les films tandis qu'après 15% les

liaisons dans les dépôts de a-CN<sub>x</sub> sont en majorité des liaisons carbone azote. Les liaisons carbone azote dans les dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur ITO sont principalement des liaisons C-C=N\* tandis que les simples liaisons carbone-azote sont minoritaires.

### III.1.3.2.2 Niveau Azote 1s

La contribution des différentes liaisons est également étudiée pour le pic N1s (Figure III-4). Les courbes intensité en fonction de l'énergie de liaison sont déconvoluées avec 3 gaussiennes de centre 398,6 ; 400,6 ; et 402,5 eV. Les gaussiennes de centre 398,6 eV et 400,6 eV sont respectivement nommées N1 et N2.

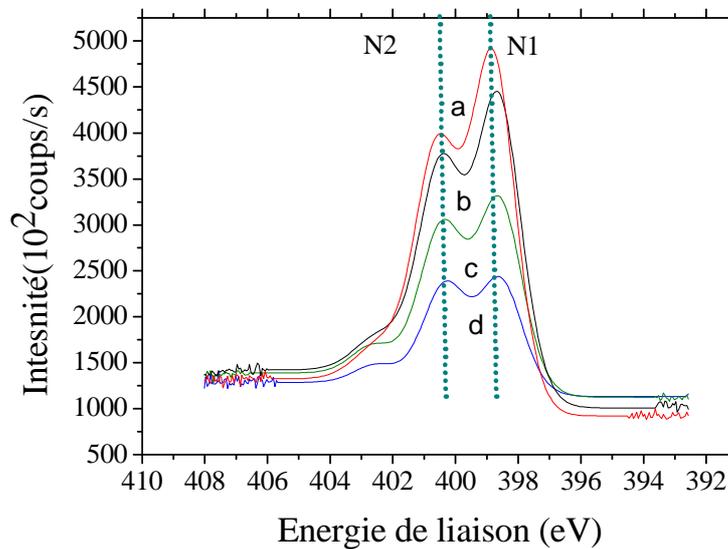


Figure III-4 : Spectres XPS N1s selon le protocole de dépôts. a) P30. b) P15. c) P7. d) P3.

L'énergie de liaison de 398,6 eV correspond à une liaison Nsp<sup>3</sup> non aromatique et C≡N, 400,6 eV pour une liaison N=C et 402,5 eV pour une liaison N-O (Figure III-4) [8–12]. La formation des liaisons nitrile (C≡N) entraîne une cassure dans la structure graphitique.

Pression partielle azote dans le gaz (en %)	Aire en % pour une énergie de liaison 398.6eV Nsp <sup>3</sup> et C≡N	Aire en % pour une énergie de liaison 400.6 eV N=C	Aire en % pour une énergie de liaison 402.5 eV N-O
3	43,8	48,6	7,6
7	41,4	51,4	7,2
15	38,9	54,8	6,5
30	33,1	56,2	5,7

**Tableau III-4 : Aire correspondante aux différents types de liaisons pour les protocoles P3, P7, P15 et P30.**

La présence d'une liaison N-O confirme la présence d'oxygène dans les dépôts. D'autre part, une variation du rapport N1/N2 est observée contrairement aux dépôts de a-CN<sub>x</sub> contenant de l'hydrogène où le rapport N1/N2 est constant [13] (Tableau III-5). Hammer *et al.* ont également observé un rapport N1/ N2 qui diminue avec le pourcentage d'azote dans les films déposés par faisceaux d'ions tandis que Darradji *et al.* ont trouvé un ratio N1/ N2 qui augmente avec le pourcentage d'azote dans les films déposés par pulvérisation magnétique radiofréquence [10][14]. Alibart *et al.* ont comparé les propriétés de films de a-CN<sub>x</sub> déposé selon trois techniques : la pulvérisation radiofréquence, la pulvérisation en courant continu et en courant continu pulsé. Cette étude a montré une incorporation d'azote différente selon la technique (selon la vitesse de bombardement des ions) [15].

la pression partielle azote dans le gaz (en %)	Rapport N1/N2
3	1,11
7	1,24
15	1,41
30	1,70

**Tableau III-5 : Rapport N1/N2 selon la pression partielle de N<sub>2</sub> dans le mélange de pulvérisation pour les différents protocoles.**

D'autre part, pour savoir si la couche de CN<sub>x</sub> recouvre bien l'ensemble de la surface, il peut être utile de contrôler l'absence du pic correspondant au Sn3d. Pour l'ensemble des échantillons analysés, aucun pic du Sn n'est visible par XPS.

### III.1.4. Caractérisation des films par microscopie électronique (SEM-FEG)

Des analyses sont réalisées pour déterminer l'épaisseur des couches de CN<sub>x</sub> sur ITO. Les coupes des 4 dépôts sont représentées sur la Figure III-5. Sur chaque image, la zone la plus foncée correspond à la couche a-CN<sub>x</sub>, sous cette zone en gris plus clair se trouve la couche d'ITO puis encore en dessous se trouve le verre. Pour tous les dépôts, les couches de CN<sub>x</sub> et d'ITO sont observées mais aucune couche intermédiaire n'est visible contrairement à l'expérience de Fu *et al.* sur des dépôts de a-CN<sub>0,05</sub> sur Si(100) [16]. D'autre part, la couche d'ITO est d'environ 100 nm. Le léger décapage ionique précédant les dépôts de a - CN<sub>x</sub> n'affecte donc pas l'épaisseur de la couche d'ITO.

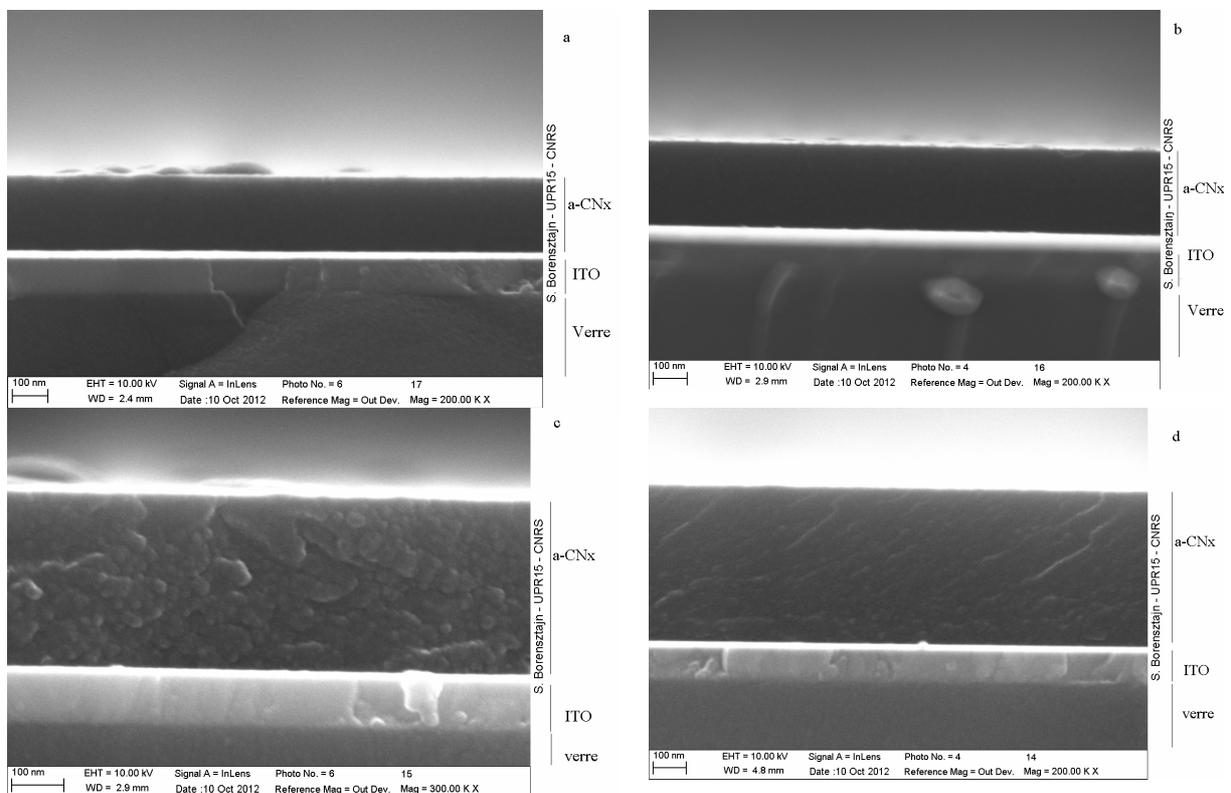
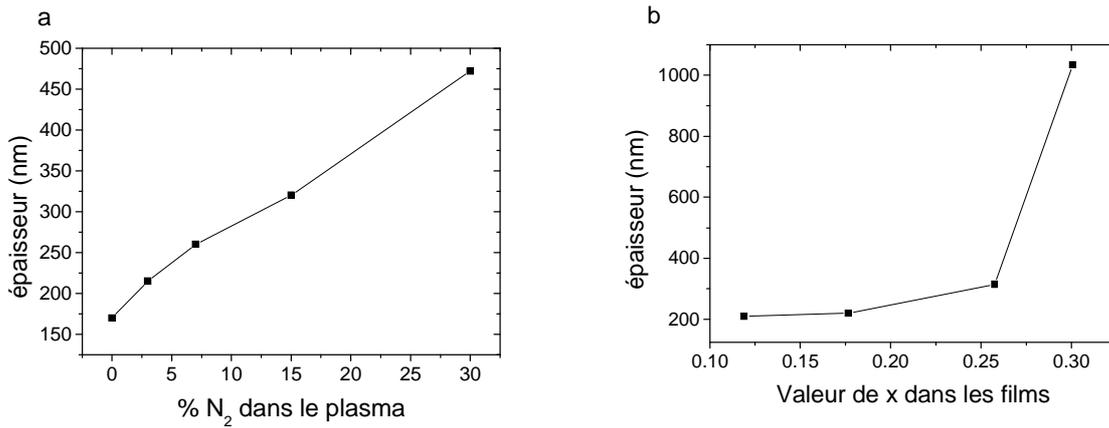


Figure III-5 : Coupe d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> déposée sur verre/ITO a) P3. b) P7. c) P15. d) P30.

Les épaisseurs des films minces de a-CN<sub>x</sub> sont déterminées pour chaque pression partielle de N<sub>2</sub> dans le plasma et en fonction du pourcentage atomique d'azote dans le film (Figure III-6). Une augmentation de l'épaisseur de la couche de CN<sub>x</sub> est observée en fonction de l'augmentation de la pression partielle d'azote dans le gaz. On peut supposer que cette augmentation d'épaisseur avec le taux d'azote est due à la formation de groupement plus volumineux (Csp<sup>3</sup> plus volumineux que Csp<sup>2</sup>) ou à la création d'une porosité à l'échelle atomique par rupture de chaînes à cause de la formation de groupements nitriles [7].



c

% azote dans plasma	Valeur de x dans les films de a-CN <sub>x</sub>	Épaisseur (nm)
0	0	170
3	0,12	215
7	0,18	260
15	0,26	320
30	0,30	472

Figure III-6 : a) Variation de l'épaisseur en fonction de la pression partielle en N<sub>2</sub> en % b) Variation de l'épaisseur en fonction du % atomique d'azote dans le film c) Tableau des valeurs d'épaisseur mesurées, pour les protocoles P3, P7, P15 et P30.

### III.1.5. Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM)

Les images SEM-FEG nous montrent que pour toutes les pressions partielles de N<sub>2</sub> dans le gaz les couches de CN<sub>x</sub> sont assez lisses et homogènes. Les mesures SEM-FEG ne possèdent pas la résolution suffisante pour avoir la rugosité de nos dépôts de a-CN<sub>x</sub>. L'influence du taux d'azote sur la rugosité, sur la morphologie des films ainsi que sur leurs conductivités électriques locales a été étudiée par AFM.

#### III.1.5.1 Propriété de rugosité des substrats

Les images des films obtenus en mode contact pour une surface analysée de 4 μm<sup>2</sup> montrent que les films de a-CN<sub>x</sub> présentent un aspect granuleux régulier (Figure III-7). Une vue en coupe est présentée avec l'image de topographie pour le protocole P3. Les images pour les protocoles P7, P15 et P30 sont identiques. Les zones très claires représentent des points de hauteur plus importante, cependant ces points sont peu nombreux et ont une hauteur

relativement faible. A titre de comparaison, une surface d'ITO seul et une surface de carbone à P(N<sub>2</sub>) = 0 sont analysées.

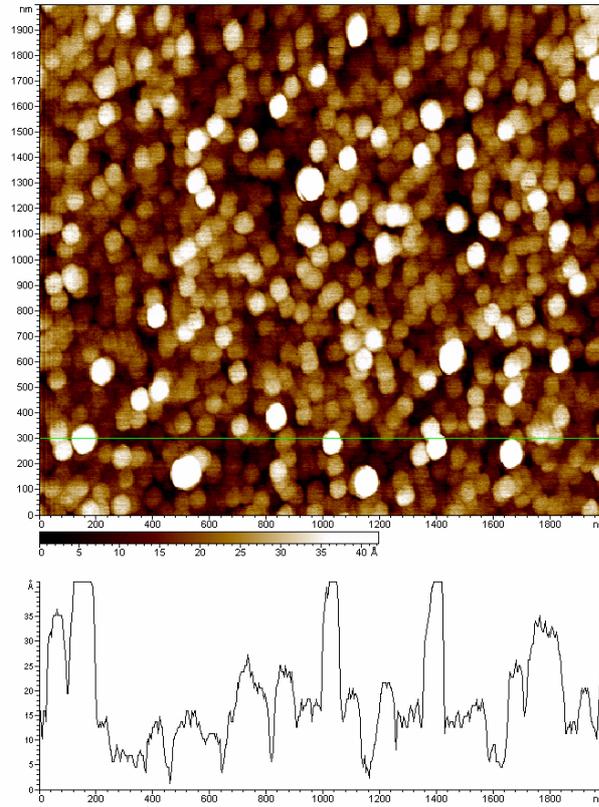


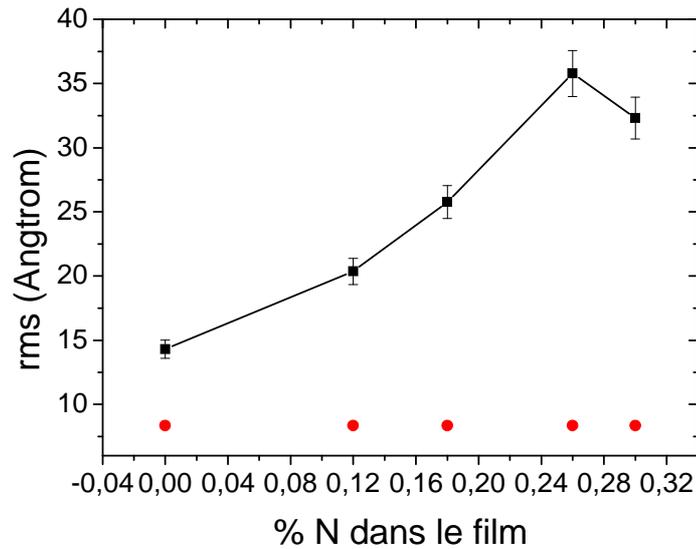
Figure III-7 : Topographie des films de a-CN<sub>x</sub> sur ITO P3 avec une vue en coupe.

Les valeurs de rugosité pour les films figurent dans le Figure III-7.

Pourcentage N <sub>2</sub> dans le plasma	0	3	7	15	30	ITO
Rugosité RMS (Å)	14,30	20,37	25,77	35,79	32,31	8,35

Tableau III-6 : Rugosité en fonction du pourcentage atomique d'azote dans le film pour des dépôts correspondant aux protocoles P0, P3, P7, P15,P30 et ITO nu.

La rugosité moyenne est tracée en fonction du pourcentage d'azote dans le film avec une barre d'erreur à 5%. La rugosité dépend bien du pourcentage d'azote dans le film avec une augmentation de celle-ci jusqu'à des dépôts avec une stoechiométrie de 0,26 (P(N<sub>2</sub>)=15%) puis une légère diminution de celle-ci (Figure III-8).



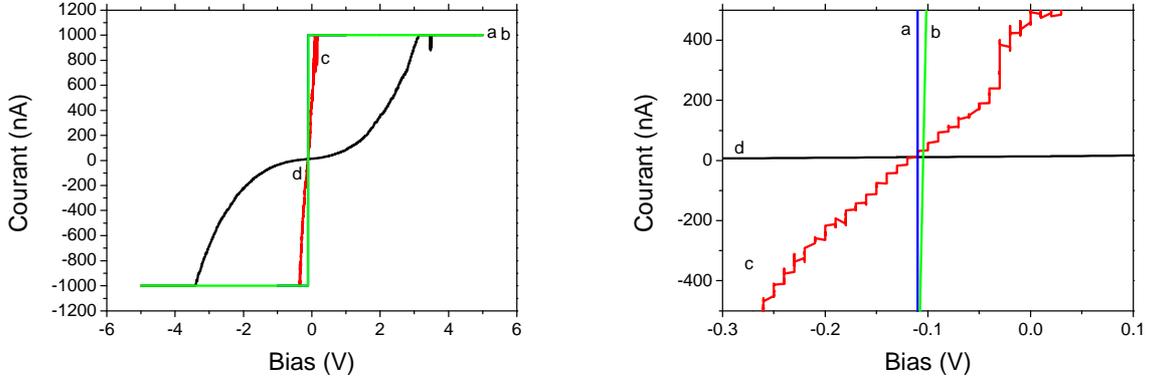
**Figure III-8 : Rugosité en fonction du pourcentage atomique d'azote dans le film pour des dépôts réalisés avec les protocoles P3, P7, P15 et P30, en rouge la valeur de rms pour l'ITO nu.**

On n'observe pas de corrélation directe entre le pourcentage d'azote dans le film et la rugosité contrairement aux études sur d'autres substrats. Dans le cas des dépôts de Lagrini *et al.* la rugosité des couches a-CN<sub>x</sub> est une fonction linéairement croissante en fonction de la pression partielle d'azote, comportement typique d'une croissance planaire et non en îlots [13]. Cette courbe non linéaire en fonction du taux d'azote traduit un mécanisme complexe de l'influence du taux d'azote sur la croissance des films. Par rapport aux dépôts faits sur Si dopé « p » ou Si intrinsèque au laboratoire, les rugosités de nos films sont aussi différentes. En effet, les valeurs obtenues sur ces substrats sont de 3 à 5 fois inférieures pour le silicium dopé p et de 1,2 à 6 fois inférieures pour le silicium intrinsèque [7]. Ceci confirme que la rugosité des films dépend de la nature des substrats et de leur conductivité [13],[7].

### III.1.5.2 Conductivité électrique locale des films de a-CN<sub>x</sub>

La conductivité électrique locale relative des dépôts de a-CN<sub>x</sub> a été déterminée par CS-AFM. Cette conductivité des films est déterminée pour la future application des films de a-CN<sub>x</sub> comme interface polarisable. En effet, la longueur de contrôle dépend de la résistance électrique de l'interface polarisable. Les courbes courant-tension sont enregistrées entre -5 et 5 V ou entre -1 V et +1 V et présentent une allure symétrique par rapport à l'offset (de -0,1 V). Une saturation de la gamme de courant est observée pour les dépôts avec un pourcentage de N<sub>2</sub> dans le plasma de 3 et 7 %. De plus, lorsque le pourcentage d'azote augmente dans le

plasma une diminution du courant mesuré est observée pour une même gamme de potentiel. Les courbes représentées correspondent aux courbes « up », c'est-à-dire à un balayage des potentiels négatifs vers les potentiels positifs (Figure III-9).



**Figure III-9 :** Courbes courant-tension obtenues par CS-AFM sur des dépôts a-CN<sub>x</sub> sur ITO pour différents protocoles a) P3. b) P7. c) P15. d) P30. A gauche la courbe complète et à droite un agrandissement à faible biais.

Pour déterminer la conductivité locale à partir de ces courbes, la pente proche de l'offset est calculée et multipliée à la constante de cellule L/S.

$$\sigma = \text{pente} \cdot \frac{L_f}{S_{p-e}} \quad \text{Equation III-1}$$

Dans le cas de ces manipulations,  $L_f$  correspond à l'épaisseur du film tandis que  $S_{p-e}$  correspond à la surface de contact entre la pointe et l'échantillon. L'aire de contact est calculée en utilisant la théorie de Herz applicable entre deux contacts rigides [17–19] :

$$A_c = \Pi \left( \frac{F_c R_{tip}}{E^*} \right)^{2/3} \quad \text{Equation III-2}$$

Avec  $R_{tip}$ , le rayon de courbure de la pointe AFM (donné par le fournisseur : environ 15 nm),  $F_c$ , la force qui mesure la raideur du contact,  $E^*$ , le module d'élasticité réduit calculé à l'aide la formule suivante :

$$\frac{1}{E^*} = \frac{3}{4} \left( \frac{1 - \nu_{tip}^2}{E_{tip}} + \frac{1 - \nu_{film}^2}{E_{film}} \right) \quad \text{Equation III-3}$$

Avec,  $E_{tip}$  et  $E_{film}$  respectivement les modules d'élasticité (module de Young) des matériaux de la pointe et du film.

$\nu_{tip}$  et  $\nu_{film}$ , respectivement les coefficients de Poisson des matériaux de la pointe et du film. Les valeurs des modules d'élasticité ainsi que des coefficients de Poisson sont référencés dans le Tableau III-7.

$F_c$  est la somme de plusieurs forces :

- la force appliquée par la pointe AFM sur l'échantillon, calculable à partir de la constante de raideur du cantilever et de sa déflexion,
- la force d'adhésion qui dépend des conditions électriques, chimiques, physiques et environnementales du contact.

La force d'adhésion est négligeable par rapport à la force appliquée estimée à 40 nN.

Matériau	Module d'élasticité (GPa)	Coefficient de Poisson
Platine [17]	170	0,39
CN <sub>x</sub> [20–22]	47-822	0,26

**Tableau III-7 : Valeurs des coefficients de Poisson et des modules d'élasticité pour différents matériaux.**

En considérant la pointe en platine et en prenant une valeur moyenne pour le CN<sub>x</sub> ( $E_{film} = 435$  GPa), l'aire de contact est estimée à 6,7 nm<sup>2</sup>.

**Les valeurs des pentes et des coefficients de corrélation R<sup>2</sup> figurant dans le Tableau III-8 ont été obtenues à partir de la Figure III-9 : Courbes courant-tension obtenues par CS-AFM sur des dépôts a-CN<sub>x</sub> sur ITO pour différents protocoles a) P3. b) P7. c) P15. d) P30. A gauche la courbe complète et à droite un agrandissement à faible bias.**

. Les valeurs des pentes sont déterminées dans la zone linéaire de part et d'autre de l'offset. Dans le cas du protocole P30, la droite est tracée pour les points compris entre -0,3 et +0,1V, et pour P15 de -0,15 et +0,15 V. Dans le cas de P7 et P3, les courbes présentent des droites de pentes très importantes, seulement quelques points de la courbe autour de l'offset sont considérés.

% N <sub>2</sub> dans le plasma	Pente en nA/V	R <sup>2</sup>
30	23,6	0,996
15	2642,8	0,996
7	671990	0,939
3	324122	(1)

**Tableau III-8 : Valeurs des pentes proche de l'offset et leurs coefficients de corrélation pour différents dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur ITO avec les protocoles P3, P7, P15 et P30.**

Les valeurs de pente augmentent rapidement avec le pourcentage d'azote dans le plasma. Ces valeurs nous permettent donc de déterminer une conductivité électrique locale relative à l'aide de l'équation III- 1 (Tableau III-9) :

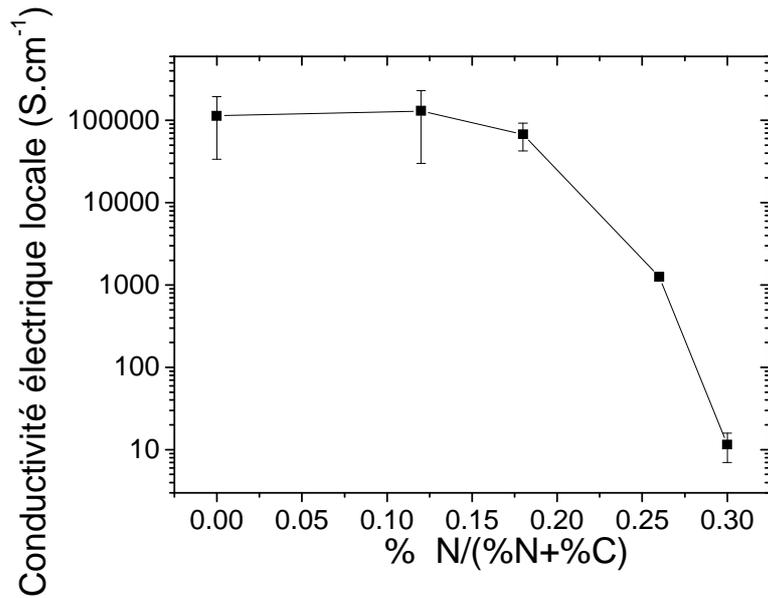
% N <sub>2</sub> dans le gaz de pulvérisation	Valeur de x dans les films de a-CN <sub>x</sub>	Epaisseur (nm)	Conductivité électrique (S.cm <sup>-1</sup> )
30	0,3	472	15
15	0,26	320	1250
7	0,18	260	6,8.10 <sup>4</sup>
3	0,12	215	1,3.10 <sup>5</sup>

**Tableau III-9 : Valeurs de la conductivité électrique locale pour les dépôts de CN<sub>x</sub> sur ITO selon les protocoles P3, P7, P15 et P30.**

Les valeurs des conductivités sont comprises entre une dizaine de S.cm<sup>-1</sup> à 10<sup>5</sup> S.cm<sup>-1</sup>. Une diminution d'un facteur 10<sup>4</sup> est observée avec l'augmentation du pourcentage d'azote dans le film de 0,12 à 0,3.

Pour vérifier la contribution de l'ITO à cette valeur de conductivité, la même expérience est réalisée sur des dépôts sans azote dans le plasma et sur ITO nu. Les valeurs de conductivités varient sur une large plage de valeurs allant de 1900 S.cm<sup>-1</sup> à 31800 S.cm<sup>-1</sup> pour une moyenne de 25000 S.cm<sup>-1</sup>.

La conductivité est tracée en fonction du pourcentage d'azote dans le film (Figure III-10).



**Figure III-10 : Variation de la conductivité électrique locale en fonction du taux d'azote dans le film pour des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur ITO réalisés avec le protocole P3, P7, P15 et P30.**

La conductivité des films de carbone amorphe est dans le même ordre de grandeur que celle des films de carbone amorphe azoté P3. De plus, les conductivités des films de a-C et de a-CN<sub>x</sub> sont beaucoup plus homogènes que celles obtenues sur les films d'ITO seul. La Figure III-11 montre la topographie, de déflexion et de friction des films de ITO nu ainsi que la conductivité du film. L'image de topographie montre une surface lisse relativement homogène (Figure III-11 a). Les zones sombres sur l'image de conductivité représentent les zones de conductivité de l'ITO les plus faibles. Aucune zone où la conductivité serait nulle n'a été observée (Figure III-11 d). Les 400 derniers nanomètres ne sont pas représentatifs de la conductivité de l'ITO, la pointe de CS-AFM doit être légèrement abîmée. Cette zone n'est pas à prendre en compte.

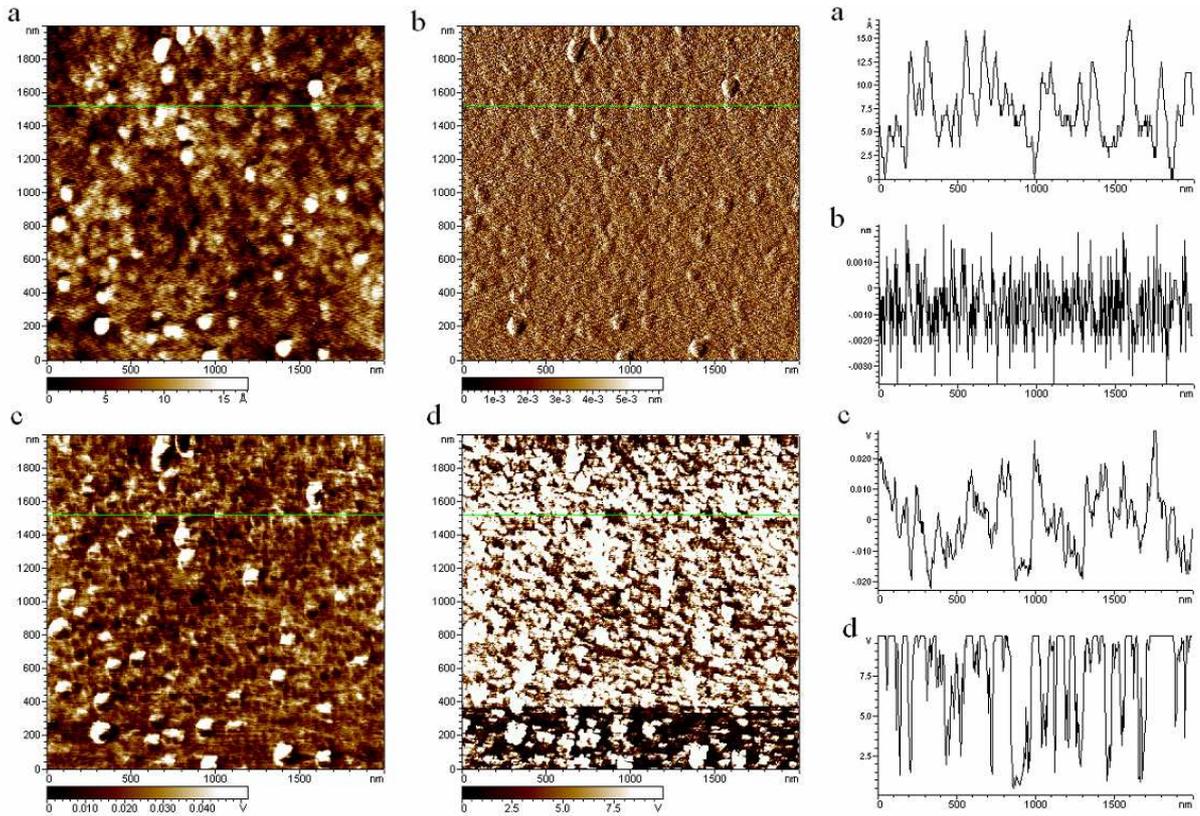
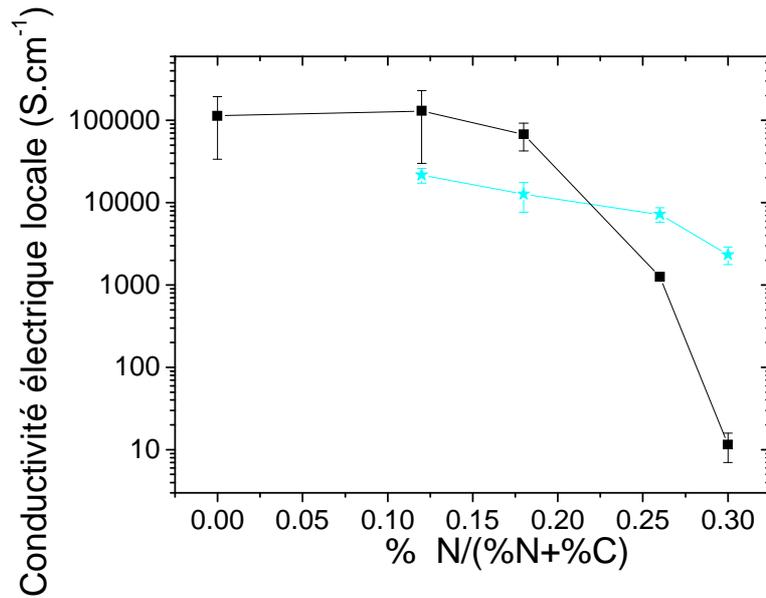


Figure III-11 : Image AFM 2 μm\*2 μm d'un substrat d'ITO complète et vue en coupe. a) Topographie. b) déflexion. c) friction. d) Conductivité.

D'autre part, la conductivité des films ITO/a-CN<sub>x</sub> P3 est nettement supérieure à la valeur moyenne de la conductivité de l'ITO tandis que celle des films ITO/a-CN<sub>x</sub> P30 est inférieure à la valeur moyenne de la conductivité de l'ITO seul.

On peut donc supposer que la décroissance de conductivité des films avec le pourcentage d'azote dans le plasma est due à l'azote. Cette décroissance des conductivités en fonction du pourcentage d'azote à également été observée par Demichelis *et al.* [23].

Pour observer l'influence de la sous-couche d'ITO sur la conductivité des films, les mêmes expériences sont réalisées pour des films de a-CN<sub>x</sub> (P3, P7, P15 et P30) déposés sur verre. Les résultats sont reportés sur la Figure III-12.



**Figure III-12 : Variation de la conductivité électrique locale en fonction du taux d'azote dans le film, en noir pour des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur ITO réalisés avec le protocole P3, P7, P15 et P30, en bleu pour des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur verre.**

Une décroissance des conductivités est observée sur les films de a-CN<sub>x</sub>/verre cependant cette décroissance est nettement moins marquée que sur les films de a-CN<sub>x</sub> sur ITO. Entre la conductivité des films P3 et P30, une diminution d'un facteur supérieur à 10<sup>4</sup> est obtenue pour les films déposés sur ITO mais seulement d'un facteur 20 dans le cas du verre nu. L'ITO joue donc un rôle dans la conductivité des films. Deux explications sont alors possibles pour expliquer cette différence. Le courant peut passer par deux chemins dans le cas des films sur a-CN<sub>x</sub>/ITO (par l'ITO et par le a-CN<sub>x</sub>) ce qui n'est pas le cas sur verre. La deuxième possibilité est une différence dans la structure même du CN<sub>x</sub> lorsqu'il est déposé sur verre ou sur ITO.

Cependant, la gamme des conductivités obtenue par CS-AFM semble très élevée. En effet, à titre de comparaison le Tableau III-10 répertorie les valeurs de conductivité électrique de quelques métaux.

Matériau	Conductivité électrique (S.cm <sup>-1</sup> )
Platine [24], [25]	8,9.10 <sup>4</sup>
Au [24], [25]	0,45.10 <sup>5</sup>
Ti [24], [25]	7,4.10 <sup>3</sup>
Carbone amorphe (noir de carbone) [24], [25]	1,25-2.10 <sup>3</sup>
Film a-CH [26–28]	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-10</sup>
Film a-C[26]	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-5</sup>
Film a-CNH [29], [30]	10 <sup>-13</sup> -10 <sup>-6</sup>
Film a-CN <sub>x</sub> [6], [10], [14], [15], [23], [31–33]	10 <sup>-10</sup> -10 <sup>-2</sup>

**Tableau III-10 : Valeurs de conductivités électrique de quelques matériaux.**

Ces valeurs de conductivité sont beaucoup plus importantes que celles obtenues couramment pour les films de a-CN<sub>x</sub>. De plus, la valeur de conductivité obtenue pour le P15 est dans le même ordre de grandeur que les valeurs de conductivité du noir de carbone. Cette procédure permet de donner une valeur relative. Les valeurs élevées de conductivité peuvent être dues à la signification que l'on donne au rapport L/S en CS-AFM. En effet, le terme L/S correspondrait à un tube de courant de longueur L et de section constante S, et donc à des lignes de courant parallèles. En réalité les lignes de courant divergent à partir de la zone de contact et donc ce terme est probablement plus faible que celui calculé d'où des valeurs surestimées de la conductivité.

Les valeurs des conductivités sont également mesurées par la méthode à 4 pointes (méthode de Van der Pauw) (détail en Annexe). Dans le cas des mesures à 4 pointes sur le a-CN<sub>x</sub> déposé sur ITO les contributions des deux matériaux sont prises en compte. La séparation de chacune des contributions est donc délicate. Dans cette méthode, l'intensité et le courant sont mesurés, la résistance, *R*, est alors déterminée en appliquant la loi d'ohm.

Cette mesure de résistance permet de remonter à la résistivité en multipliant la résistance par l'épaisseur du film et un facteur multiplicatif.

$$\text{Résistivité} = \text{épaisseur} * \text{Résistance} * 4,53 \quad \text{Equation III-4}$$

La conductivité peut alors être estimée en prenant l'inverse de la résistivité. Les valeurs de conductivité obtenues sont répertoriées dans le : Valeurs de conductivités électriques déterminées avec la méthode à 4 pointes et par CS-AFM pour les dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur des substrats de verre et d'ITO.

% N dans le film	Conductivité électrique (S.cm <sup>-1</sup> )		Conductivité électrique (S.cm <sup>-1</sup> )	
	Sur verre		Sur ITO	
	Méthode 4 pointes	CS-AFM	Méthode 4 pointes	CS-AFM
0,30	0,3	2300	749	15
0,26	2,2	7200	944	1250
0,18	5,7	1,25.10 <sup>4</sup>	1368	6,8.10 <sup>4</sup>
0,12	5,9	2,2.10 <sup>4</sup>	1502	1,3.10 <sup>5</sup>
0	-	-	1557	1,2.10 <sup>5</sup>

**Tableau III-11 : Valeurs de conductivités électriques déterminées avec la méthode à 4 pointes et par CS-AFM pour les dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur des substrats de verre et d'ITO.**

Aucune dépendance linéaire des valeurs de conductivité de CS-AFM en fonction des valeurs des mesures 4 pointes n'est observée. Aucune correction des valeurs de CS-AFM à l'aide des valeurs 4 pointes ne peut donc être réalisée. Cependant, les valeurs de conductivité électrique obtenues par la méthode à 4 pointes varient de la même façon que celles obtenues par CS-AFM. L'ordre des valeurs obtenues par CS-AFM est donc bon. On peut aussi mentionner que la zone de contact peut subir un échauffement notable (grosses densités de courant) et que le transport électronique pour ces matériaux est thermiquement activé, d'où un décalage des conductivités apparentes vers le haut.

## ***III.2. Propriétés électrochimiques***

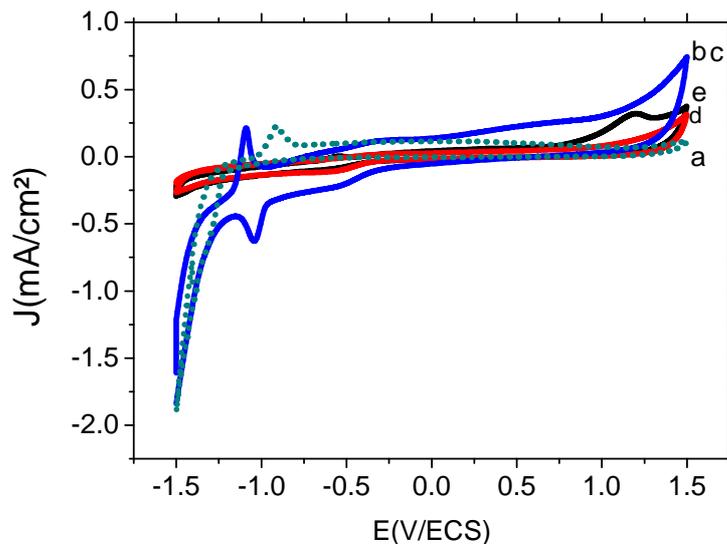
### **III.2.3. Détermination des conditions optimales pour les dépôts a-CN<sub>x</sub> sur ITO**

#### **III.2.3.1 Fenêtre de potentiel**

Les mêmes dépôts sont réalisés avec les protocoles P3, P7, P15 et P30 définis précédemment. L'analyse est dans un premier temps réalisée sans traitement particulier (activation) des échantillons. Les fenêtres de potentiel de chacune des électrodes sont enregistrées dans LiClO<sub>4</sub> en voltammétrie cyclique à une vitesse de balayage de 50 mV/s (Figure III-13).

Un pic d'oxydation et de réduction apparaît sur ITO nu ainsi que sur les dépôts P3 et P7 -0,5 V/ECS et -1 V/ECS respectivement. L'apparition de ce pic entraîne la détérioration de

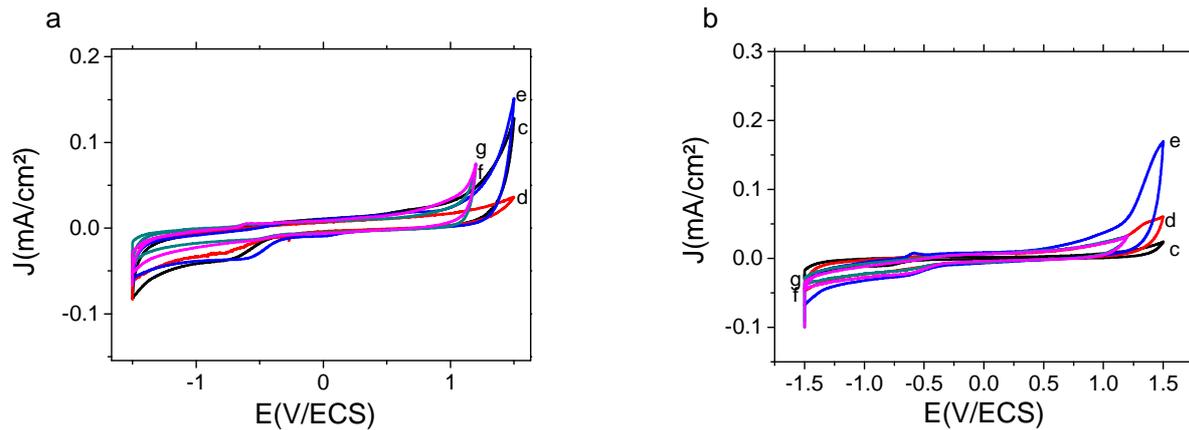
la couche de CN<sub>x</sub>. Ce pic n'est pas observé sur les dépôts de 15% et de 30%. D'autre part, dans le cas de l'ITO nu, la partie immergée de l'ITO devient sombre et il n'y a plus de conduction entre la partie immergée et la partie non immergée. L'ITO, sans surprise, n'est donc pas inerte électrochimiquement. Des études ont montré que le SnO<sub>2</sub> est sensible à une polarisation cathodique de l'ordre de -1V/ECS et se réduit sous forme d'étain [34]. La mauvaise tenue mécanique des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur ITO avec une faible pression partielle d'azote dans le plasma (inférieure à 7%) entraîne une détérioration du film. Les propriétés mécaniques des films de a-CN<sub>x</sub> sont liées au pourcentage d'azote dans le plasma. Gilvarry *et al.* ont montré que pour des films de a-CN<sub>x</sub> déposés par pulvérisation magnétron le stress et la dureté des dépôts sont diminués par l'incorporation d'azote dans les films, ce qui permet d'augmenter l'adhésion des films [35]. Les dépôts P3 et P7 sont donc plus durs que les dépôts P15 et P30 et ont donc une moins bonne tenue mécanique. Le potentiel ne devrait donc pas dépasser -1,5 V/ECS, impératif qui à pour inconvénient de limiter la fenêtre de potentiel.



**Figure III-13 :** Voltammogrammes dans LiClO<sub>4</sub> 0,5 M à 50 mV/s sur des électrode de a-CN<sub>x</sub> déposé sur ITO selon les différents protocoles a) ITO nu. b) P3. c) P7. d) P15. e) P30.

La fenêtre de potentiel des films de a-CN<sub>x</sub> est déterminée dans une solution de LiClO<sub>4</sub> et de KCl. La solution de KCl a été choisie pour se mettre dans les mêmes conditions expérimentales pour l'étude des interfaces polarisables en Pont Wheastone Fluidique (PWF) de Plecis *et al.* [36]. Les modulations de flux électroosmotique sont plus importantes pour des solutions avec une faible force ionique.

Comme indiqué précédemment, la tenue mécanique des films P3 et P7 ne permet pas leur utilisation dans les solutions de KCl. En effet, les dépôts P3 et P7 se détériorent de la même façon que dans LiClO<sub>4</sub>. Seuls les dépôts avec un pourcentage d'azote plus important ont donc pu être utilisés en solution (P15 et P30). La fenêtre de potentiel des dépôts P15 et P30 est étudiée par voltammétrie cyclique dans une solution de LiClO<sub>4</sub> 0,5 M et dans des solutions de KCl de quatre concentrations différentes (Figure III-14).



**Figure III-14 :** Voltammogrammes des dépôts de a-CN<sub>x</sub> ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) dans une solution de LiClO<sub>4</sub> 0,5 M et dans KCl. a) P15. b) P30 c) LiClO<sub>4</sub> 0,5 M. d) KCl 0,1 M. e) KCl 0,2 M. f) KCl 0,5 M. g) KCl 1,0 M. à 50 mV/s.

Nous avons choisi comme limite de densité de courant pour déterminer la fenêtre de potentiel  $\pm 50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , définie comme étant la fenêtre de polarisabilité. Les valeurs de ces fenêtres de polarisabilité sont répertoriées dans le Tableau III-12.

	KCl 0,1M	KCl 0,2M	KCl 0,5M	KCl 1,0M	LiClO <sub>4</sub> 0,5M
CN <sub>x</sub> 15%	2,85 V	2,64 V	2,63 V	2,60 V	3,00 V
CN <sub>x</sub> 30%	2,80 V	2,64 V	2,60 V	2,60 V	2,70 V

**Tableau III-12 :** Fenêtre de potentiel dans les différentes solutions pour des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur verre/ITO suivant les protocoles P30 et P15.

Les dépôts P15 présentent une fenêtre de potentiel équivalente à celle des dépôts P30. La fenêtre est limitée par la réduction de H<sub>2</sub> et par l'oxydation de l'eau dans le cas de LiClO<sub>4</sub> ou des chlorures dans le cas de KCl. Cette large fenêtre de potentiel permet l'application de ces films comme électrode et comme interface « idéalement polarisable ».

L'influence de la concentration en KCl sera explicitée au paragraphe III.2.2.

### III.2.3.2 Prétraitement électrochimique

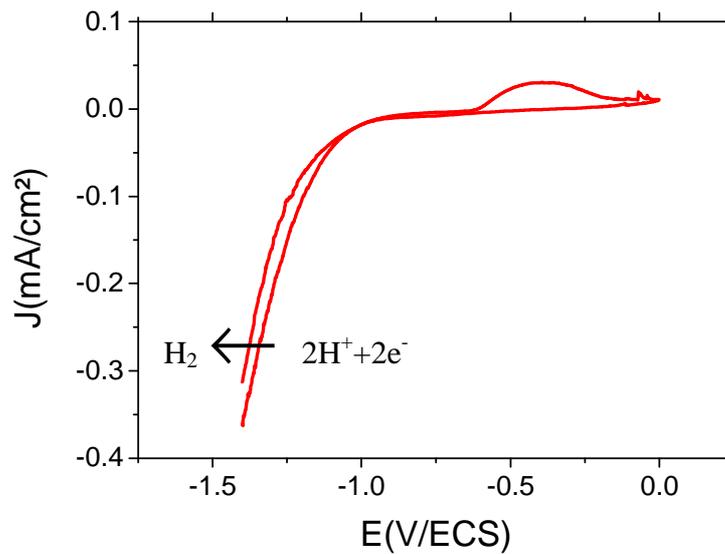
Un prétraitement électrochimique est mis en œuvre pour augmenter la réactivité électrochimique des films de a-CN<sub>x</sub>. Le prétraitement électrochimique généralement utilisé consiste à faire des cycles de balayages de potentiel entre -1V et 0 V/ECS dans une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, d'une durée de 5 à 10 minutes à une vitesse de balayage de 50 mV/ECS [2], [3]. L'augmentation de la réactivité électrochimique après activation électrochimique est due à la modification de la composition atomique en surface des films. En effet, avant traitement les analyses XPS ont montré un pourcentage en carbone et en azote de respectivement 87% et 13%, ce pourcentage devient 91% en carbone et 9% en azote après traitement pour des dépôts sur Si [2]. L'étude complémentaire par spectroscopie d'impédance électrochimique sur des films de a-CN<sub>x</sub> déposés sur Si a montré une dépendance de la résistance de transfert de charge en fonction du prétraitement des électrodes. En effet, le prétraitement cathodique augmente la réactivité électrochimique [37].

Dans un premier temps, nous avons donc repris ce même protocole d'activation pour les dépôts P15 et P30.

Dans le cas d'une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, il se produit durant l'activation une réaction de dégagement d'hydrogène à la surface de l'électrode.



La Figure III-15 montre le voltammogramme d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> déposée sur ITO lors de l'activation électrochimique.



**Figure III-15:** Voltammogramme à 50 mV/s d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> ayant subi le protocole P15 dans une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M.

Lors de l'activation, un pic d'oxydation apparaît à -0,5 V/ECS caractéristique de la réponse de l'ITO. Une détérioration de la couche de CN<sub>x</sub> est également observée. L'activation ne peut pas être réalisée dans une solution d'acide sulfurique à cette concentration. Une expérience d'activation avec une concentration moins importante en acide sulfurique (0,05 M) aboutit aux mêmes résultats. Les expériences d'activation sont réalisées pour tous les protocoles et la même réponse est observée. En conclusion, l'activation des films minces n'est pas possible dans un milieu trop agressif comme une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M (pH = 0,3).

### III.2.4. Etude dans KCl

Dans cette partie nous cherchons à déterminer les variations des propriétés électrochimiques des dépôts P15 et P30 en fonction du potentiel par spectroscopie d'impédance électrochimique. Le domaine des potentiels explorés se situe autour du potentiel de circuit ouvert  $E_{oc}$ , avec un pas de 100 mV. Les expériences sont réalisées avec les électrodes de a-CN<sub>x</sub> ayant subi le protocole P15 et P30 sans prétraitement électrochimique préalable dans 4 solutions de KCl (0,1 M/0,2 M/ 0,5 M/1,0 M). Les pH des solutions sont autour de 6,9.

### III.2.4.1 Modélisation électrique de l'interface verre/ITO/a-CN<sub>x</sub>/Electrolyte.

Tamiasso-Martinhon *et al.* ont étudié la dépendance en potentiel de la capacité interfaciale en fonction du pH et du pourcentage atomique d'azote dans le film d'a-CN<sub>x</sub> déposé sur Si/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. La variation de la capacité en fonction du potentiel passe par un maximum, celui-ci étant plus marqué dans le cas où la stoechiométrie en azote des films vaut 0,3 [37].

Dans notre cas, nous allons étudier, l'influence du potentiel sur la valeur des capacités pour deux stoechiométries en azote différentes (0,26 et 0,30) à un même pH mais pour différentes concentrations en électrolyte.

Les diagrammes sont simulés à l'aide du logiciel Simad et du circuit équivalent suivant (Figure III-16).

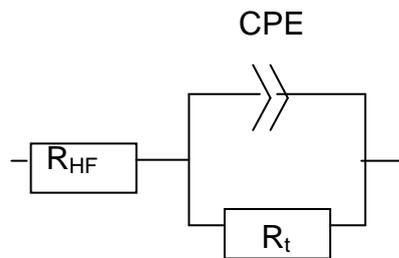


Figure III-16 : Circuit électrique équivalent de l'interface a-CN<sub>x</sub>.

Dans ce circuit,  $R_{HF}$  est la résistance haute fréquence,  $R_t$  est la résistance de transfert de charge et CPE est l'élément de phase constante correspondant à la capacité de double couche. L'expression globale de l'impédance  $Z_g$  est :

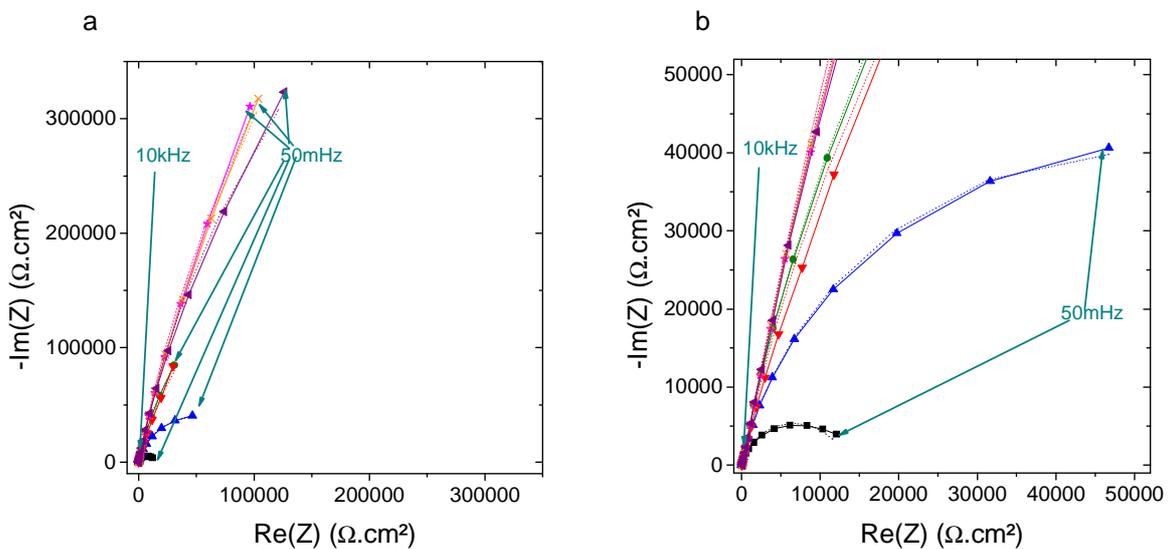
$$Z_g = R_{HF} + \frac{R_t}{1 + (R_t)Q(j\omega)^\alpha} \quad \text{Equation III-6}$$

La qualité des simulations avec le logiciel Simad est évaluée de la façon suivante : l'erreur sur les mesures,  $\sigma$ , est imposée et un facteur de corrélation entre l'expérience et la théorie,  $\chi^2$ , est obtenu.

### III.2.4.2 Spectroscopie d'impédance électrochimique pour les électrodes P15 dans KCl

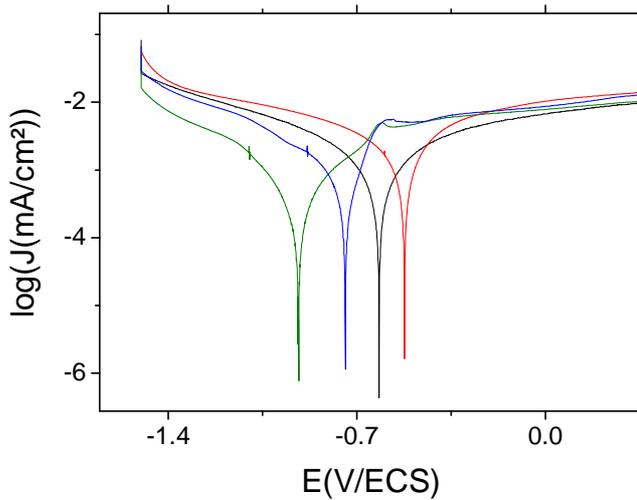
Une série de mesures d'impédance à différents potentiels (en partant des potentiels négatifs vers les potentiels positifs) est réalisée pour déterminer les paramètres du circuit

équivalent de la Figure III-16 dont les résistances  $R_{HF}$  et  $R_t$  et le coefficient du CPE  $\alpha$  et  $Q$ . Les Figure III-17 a et b représentent les diagrammes expérimentaux d'impédance en représentation de Nyquist et les simulations après ajustement des paramètres avec le logiciel Simad. Les simulations sont en pointillées tandis que les courbes expérimentales sont en trait plein. Pour toutes les électrodes, les expériences ont été réalisées dans 4 solutions de KCl en commençant par la solution la moins concentrée et en finissant par la plus concentrée. Pour chaque expérience trois spectres d'impédance sont mesurés à la suite à chaque potentiel. Les trois spectres obtenus sont superposables.



**Figure III-17 : Diagramme de Nyquist expérimentaux (—) et ajustés (--) pour des électrodes a-CN<sub>x</sub> sur ITO protocole P15 dans KCl 1M ( $E_{oc} = -0,223$  V/ECS) (■)-0,523 V/ECS, (▲)-0,423 V/ECS, (●)-0,323 V/ECS, (▼)-0,223 V/ECS, (★)-0,123 V/ECS, (×) -0,023 V/ECS, (◀)+0,023 V/ECS. a) Fenêtre entière b) Agrandissement.**

La représentation en Nyquist montre des courbes peu incurvées pour les valeurs élevées de potentiel. Dans le cas des potentiels négatifs une boucle commence à apparaître avec des valeurs de  $R_t$  relativement importantes. La boucle signifie qu'une réaction faradique de transfert de charge a lieu à l'interface. Cependant, aucune réaction faradique ne peut être due à la solution de KCl dans cette gamme de potentiel. Le courant faradique est probablement dû à la réaction de réduction des traces d'oxygène encore présent dans la solution malgré le dégazage ou à la réduction de l'eau. La Figure III-14 a est retracée en présentant l'intensité en logarithme pour mieux comprendre d'où vient le courant faradique (Figure III-18). Cette représentation a le mérite de mieux visualiser les changements de pentes.



**Figure III-18 : Courbes intensité-potential en représentation semi-logarithmique pour une électrode P15 à différentes concentrations en KCl. 0,1 M (en noir). 0,2 M (en rouge). 0,5 M (en vert). 1,0 M (en bleu).**

Dans la partie cathodique, deux pentes différentes sont observées. La première pente allant du potentiel de  $i_0$  (minimum de la courbe) à environ  $-1,3\text{V/ECS}$  correspondant vraisemblablement à la réduction de l’oxygène et une pente plus importante pour des potentiels plus cathodiques correspondant à la réduction de l’eau. Le courant anodique correspondrait à priori à l’oxydation des chlorures présents en solution. Les pentes cathodique et anodique permettent respectivement de déterminer les coefficients de Tafel cathodique,  $\beta_c$ , et anodique,  $\beta_a$ .

Au potentiel  $E_0$ ,  $i_0 = -i(\text{O}_2) = i(\text{Cl}^-)$ , la valeur de la résistance de charge de charge globale est égale à :

$$R_t = \frac{\beta_{\text{O}_2} \beta_{\text{Cl}^-}}{2,303 i_0 (\beta_{\text{Cl}^-} - \beta_{\text{O}_2})} \quad \text{Equation III-7}$$

Les valeurs déterminées graphiquement pour les coefficients de Tafel et pour  $i_0$  ainsi que pour la résistance de transfert de charge calculée à l’aide de l’équation III-7 sont listées dans le Tableau III-13. Les concentrations en oxygène dissous sont estimées à partir de la Figure III-14 : Voltammogrammes des dépôts de a-CN<sub>x</sub> ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) dans une solution de  $\text{LiClO}_4$  0,5 M et dans KCl. a) P15. b) P30 c)  $\text{LiClO}_4$  0,5 M. d) KCl 0,1 M. e) KCl 0,2 M. f) KCl 0,5 M. g) KCl 1,0 M. en utilisant l’équation II-6, le coefficient de diffusion de l’oxygène étant de  $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

concentration	0,1 M	0,2 M	0,5 M	1,0 M
$\beta(\text{O}_2)$	-0,85	-1,3	-0,60	-0,78
$\beta(\text{Cl}^-)$	1,96	2,2	1,11	0,98
$i_0$ ( $10^{-6}$ A)	0,85	1,41	0,42	0,59
$R_t$ ( $10^4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )	8,62	7,09	11,4	8,98
$[\text{O}_2]$ $10^{-5}$ mol.L <sup>-1</sup>	4,6	5,1	1,5	1,5

**Tableau III-13 : Valeurs des coefficients de Tafel, de  $i_0$  et de la résistance de transfert de charge  $R_t$  en fonction de la concentration en KCl pour des électrodes P15.**

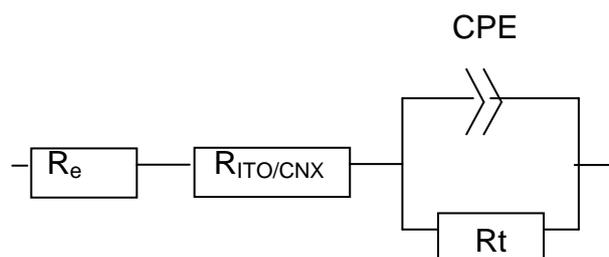
Une concentration en oxygène dissout de l'ordre de  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> est déterminée et les valeurs de  $R_t$  sont autour de  $10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Le courant faradique a donc pour origine la présence non négligeable d'oxygène dissous en solution.

Les valeurs moyennes de la résistance à haute fréquence trouvées après ajustement des paramètres du circuit à l'aide du logiciel Simad sont présentées dans le Tableau III-14.

concentration	0,1 M	0,2 M	0,5 M	1,0 M
$R_{\text{HF}}$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	55	43	29	25

**Tableau III-14 : Valeurs des résistances à haute fréquence après ajustement des paramètres avec le logiciel Simad.**

Une diminution de la résistance à haute fréquence est observée en augmentant la concentration en KCl, cette diminution est liée à l'augmentation de la conductivité des solutions avec la concentration en électrolyte support. Cependant, les valeurs trouvées sont largement supérieures à celles attendues pour la résistance de l'électrolyte [38][39]. En effet, la valeur de résistance de l'électrolyte devrait être autour d'une dizaine d'ohms dans le cas d'une solution de KCl 0,5M. Le schéma équivalent n'est donc pas complet. L'hypothèse la plus vraisemblable est que la résistance à haute fréquence est la résultante de deux résistances en série correspondant à la résistance de l'électrolyte,  $R_e$  et une résistance due à l'interface ITO/CN<sub>x</sub>,  $R_{\text{ITO/CN}_x}$  (Figure III-19).



**Figure III-19 : Circuit équivalent modifié de l'interface Electrode/KCl.**

Un moyen indirect de détermination de  $R_{ITO/CN_x}$  consiste à estimer la résistance de l'électrolyte. Pour cela un spectre d'impédance électrochimique sur une électrode de platine de 5 mm de diamètre est réalisé. Les valeurs de résistance d'électrolyte pour chaque concentration en KCl sont par la suite calculées en fonction du diamètre en utilisant la formule de Newman [40].

$$R_e = \frac{1}{4r_0K} \quad \text{Equation III-8}$$

Avec :  $r_0$  le rayon de l'électrode de platine,

$K$ , la conductivité de la solution,

Les valeurs des résistances  $R_e$  sont calculées avec la formule de Newman et la valeur de  $R_{ITO/CN_x}$  est déduite de celles de  $R_e$  et de  $R_{HF}$ . Pour vérifier la contribution du substrat d'ITO sur ces valeurs de résistance, les résistances des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur des substrats de verre sont également mesurées par SIE (Tableau III-15). La fabrication des électrodes en verre/CN<sub>x</sub> est présentée en annexe.

concentration	0,1 M	0,2 M	0,5 M	1,0 M
$R_e$ ( $\Omega.cm^2$ )	17,6	8,2	3,5	2,0
$R_{ITO/CN_x}$ ( $\Omega.cm^2$ )	37,4	34,8	25,5	23
$R_{verre/CN_x}$ ( $\Omega.cm^2$ )	440	324	296	264

**Tableau III-15 : Valeurs de la résistance de l'électrolyte et de la résistance  $R_{ITO/CN_x}$  et  $R_{verre/CN_x}$  en fonction de la concentration en KCl.**

Les valeurs des résistances sur verre sont largement supérieures à celle sur ITO. L'utilisation d'un substrat conducteur comme l'ITO comparativement au verre rend la résistance haute fréquence beaucoup moins importante. Jribi *et al.* ont également obtenu ses valeurs de résistance haute fréquence plus importantes pour des dépôts sur Si intrinsèque que sur Si dopé n ou p [7]. Dans leur cas, ce comportement a été attribué à la géométrie des électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur Si intrinsèque. Dans le cas d'un substrat isolant, le contact avec le film de a-CN<sub>x</sub> est réalisé avec de la peinture d'argent (cf. Annexe), les lignes de courant sont alors orientées des bords de l'électrode vers le centre et génèrent une résistance plus grande.

Ces valeurs permettent, à l'aide de la formule de Brug établie en 1984, de calculer la capacité équivalente en fonction de  $Q$ , de  $\alpha$ , de la résistance de l'électrolyte et de la résistance

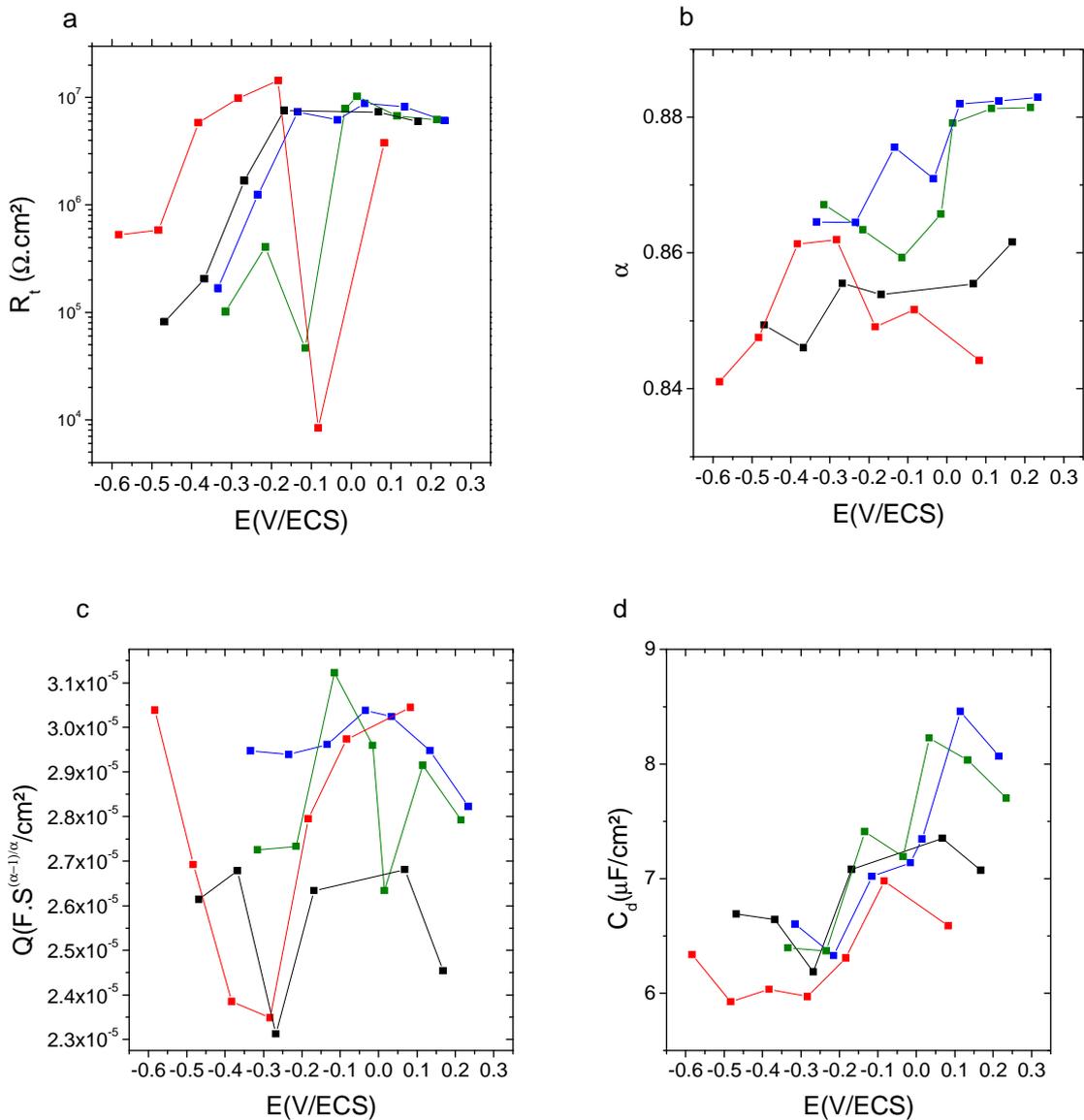
de transfert de charge dans le cas d'une distribution des constantes de temps le long de la surface [41]:

$$C_d = Q^{1/\alpha} R_\Omega^{(1-\alpha)/\alpha} \quad \text{Equation III-9}$$

Avec  $R_\Omega$ , la combinaison de la résistance de haute fréquence et la résistance de transfert de charge.

$$R_\Omega^{-1} = R_{HF}^{-1} + R_t^{-1} \quad \text{Equation III-10}$$

Les Figure III-20 a-d représentent les variations de la résistance de transfert de charge, de  $\alpha$ , de  $Q$  et de la capacité équivalente en fonction du potentiel de l'impédance électrochimique pour les différentes concentrations en KCl. Les résultats pour deux autres électrodes sont présentés en annexe. Une des paramètres à prendre en compte est que les électrodes de a-CN<sub>x</sub> ne peuvent pas être polies entre chaque expérience.



**Figure III-20 :** Paramètres du circuit selon le potentiel pour une électrode P15 a) variation de la résistance de transfert de charge  $R_t$  b) variation de  $\alpha$  c) variation de  $Q$  d) variation de la capacité de double couche  $C_d$  pour différentes concentrations en KCl. 0,1 M (en noir). 0,2 M (en rouge). 0,5 M (en vert). 1,0 M (en bleu).

Une dépendance de la résistance de transfert de charge est observée en fonction de la surtension appliquée. Pour mieux observer ces variations, on trace  $R_t$  en échelle logarithmique. Dans la plupart des cas, hormis la courbe à 0,2 M, de -0,2 V/ECS à -0,5 V/ECS, la résistance haute fréquence diminue de -0,2 à -0,6 V/ECS puis de -0,2 V/ECS à 0,2 V/ECS elle reste stable. Comme expliqué précédemment, la seule réaction faradique possible est la réduction de l'oxygène résiduel. La résistance de transfert de charge correspondant à cette réaction faradique diminue donc lorsque l'impédance est réalisée à des potentiels proches du potentiel de réduction de l'oxygène (autour de -0,5 V/ECS). Les valeurs des

résistances de transfert de charge déterminées à l'aide des droites de Tafel sont dans le même ordre de grandeur que les résistances déterminées par impédance, ce qui confirme la présence d'une réaction faradique due à la réduction de l'oxygène.

Dans notre cas, les valeurs de  $\alpha$  varient entre 0,83 et 0,89. Dans la plupart des cas, les valeurs de  $\alpha$  varient avec le potentiel. Les expériences de Tamiasso-Martinon *et al.* sur des dépôts d'a-CN<sub>x</sub> sur Si avec une stoechiométrie de 0,26 dans des solutions de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de pH 2,5 et 5 ont montré également une dépendance de  $\alpha$  en fonction du potentiel. Dans leur cas, une courbe en forme de cloche est obtenue et possède un minimum aux alentours de 0,2 V/ECS [37]. Dans notre cas, hormis pour la concentration de 0,2 M, les valeurs de  $\alpha$  augmentent avec le potentiel. Les surfaces sont donc de plus en plus homogènes et les constantes de temps moins distribuées.

La Figure III-20c montre les variations de  $Q$  selon le potentiel et la concentration en KCl. Pour les concentrations en KCl de 0,5 M et 1,0 M, la courbe présente une forme de cloche avec un maximum. Pour la concentration de 0,2 M en KCl, la courbe est en forme de cloche avec un minimum.

De plus, les capacités de double couche varient également avec les potentiels pour toutes les électrodes et pour toutes les concentrations en KCl. La plupart des courbes montrent un minimum entre -0,6 et -0,3 V/ECS, puis une augmentation de celui-ci, pour finir par une légère diminution à partir de 0 V/ECS. Cependant, les valeurs de capacité selon la concentration en KCl obtenues pour les trois électrodes ne varient pas de la même façon. Tamiasso *et al.* ont montré que la capacité dépend à la fois du pH de la solution, de la teneur en azote du film ainsi que du potentiel. La capacité montre un maximum plus ou moins marqué. Cette valeur est plus élevée lorsque le pH est acide et que le pourcentage d'azote est de 30% dans le plasma. De plus, le maximum est déplacé vers les potentiels plus cathodiques lorsque le pH augmente. Cet effet du pH est dû aux formes imines et amines qui agissent comme des bases de Brønsted [37]. Les courbes semblent se décaler en fonction de la concentration en KCl mais ont relativement la même forme.

Les valeurs moyennes des capacités (en prenant les valeurs de capacité pour les 3 électrodes et pour tous les potentiels) sont notées dans le Tableau III-16 :

[KCl] (M)	0,1	0,2	0,5	1,0
C <sub>d</sub> ( $\mu$ F/cm <sup>2</sup> )	9 $\pm$ 1	9,2 $\pm$ 0,9	9,4 $\pm$ 0,9	9,8 $\pm$ 0,8

**Tableau III-16 : Valeurs de la capacité équivalente pour les 4 concentrations en KCl.**

Les valeurs de capacité de double couche sont dans le même ordre de grandeur que celles déterminées pour le a-CN<sub>x</sub> sur d'autres substrats tel que sur Si (valeurs comprises entre 2 et 10 μF/cm<sup>2</sup>) [37] ou sur Acier 316L (valeurs comprises entre 2 et 7 μF/cm<sup>2</sup>) [39].

La double couche électrochimique est composée de la couche de Helmholtz et de la couche de Gouÿ-Chapman. La capacité de double couche est alors la combinaison de deux capacités en série : la capacité de Gouÿ-Chapman,  $C_{GC}$ , et de la capacité de Helmholtz,  $C_H$ .

$$\frac{1}{C_d} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{GC}} \quad \text{Equation III-11}$$

La capacité de Helmholtz est égale à :

$$C_H = \frac{\epsilon_{H_2O} \epsilon_0}{L_H} \quad \text{Equation III-12}$$

Avec  $\epsilon_{H_2O}$ , la constante diélectrique de l'eau adsorbée,  $\epsilon_0$ , la constante de permittivité et  $L_H$ , l'épaisseur de la couche de Helmholtz.

La capacité de Helmholtz ne dépend donc pas de la concentration en électrolyte.

La capacité de Gouÿ-Chapman est définie comme :

$$C_{GC} = \frac{\epsilon_{H_2O} \epsilon_0}{L_{GC}} \exp\left(\frac{zF\Delta\Phi}{2RT}\right) \quad \text{Equation III-13}$$

Et

$$L_{GC} = \left(\frac{\epsilon_{H_2O} \epsilon_0}{zF^2 z^2 c}\right) \quad \text{Equation III-14}$$

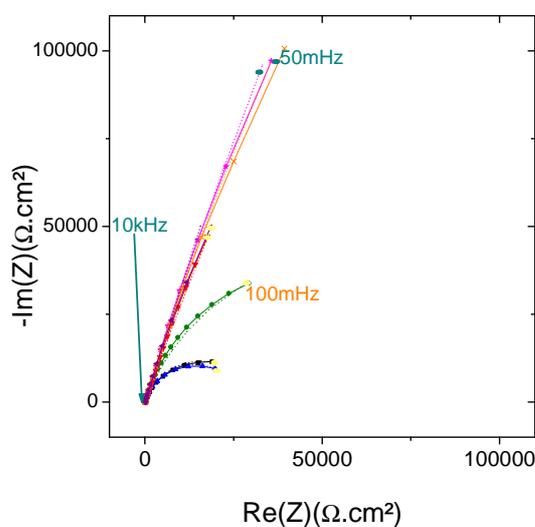
Avec  $L_{GC}$ , l'épaisseur de la couche de Gouÿ-Chapman,  $z$  et  $c$ , la charge et la concentration des ions en solution, et  $\Delta\phi$ , la différence de potentiel aux bornes de la double couche.

Donc d'après l'équation III-13, III-14 et III-11, lorsque la concentration en ions augmente, la capacité de Gouÿ-Chapman et donc celle de double couche augmentent également.

Dans notre cas, une augmentation de capacité en fonction de la concentration est observée, la variation de double couche suit donc bien la théorie.

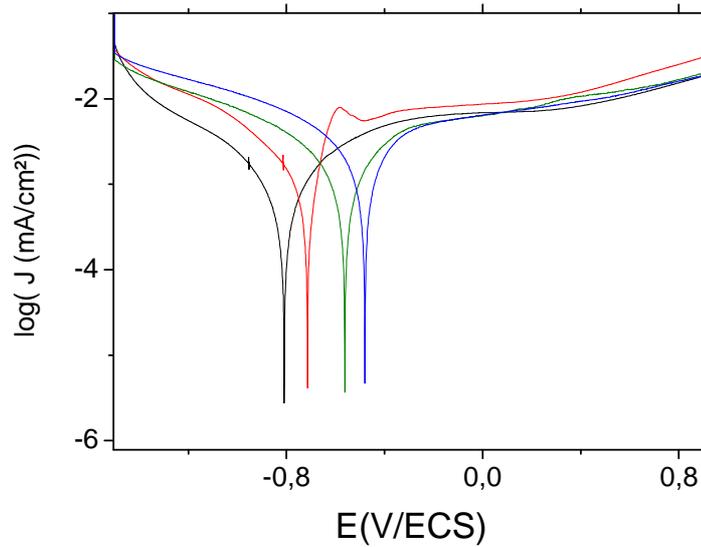
### III.2.4.3 Spectroscopie d'impédance électrochimique pour les électrodes P30 dans KCl.

Les valeurs de capacité équivalente des films de a-CN<sub>x</sub> P30 sont déterminées de la même façon que pour les électrodes P15. L'ordre des expériences est identique à celui réalisé pour les électrodes P15 (des concentrations faibles aux concentrations élevées et des potentiels les plus faibles aux potentiels élevés). La Figure III-21 montre les diagrammes d'impédance expérimentaux et les simulations après ajustement des paramètres avec le logiciel Simad en représentation de Nyquist pour une solution de KCl 0,1 M. Les simulations sont en pointillées tandis que les courbes expérimentales sont en trait plein. Les expériences sont réalisées sur deux électrodes.



**Figure III-21 : Diagramme de Nyquist expérimentaux (—) et ajustés (--) pour des électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur ITO P30 ( $E_{oc} = -0,260$  V/ECS) (■)  $-0,560$  V/ECS, (▲)  $-0,460$  V/ECS, (●)  $-0,360$  V/ECS, (▼)  $-0,260$  V/ECS, (★)  $-0,160$  V/ECS, (X)  $-0,060$  V/ECS, (◀)  $+0,060$  V/ECS.**

L'allure des diagrammes de Nyquist est la même que celle obtenue pour les électrodes P15, c'est-à-dire des courbes avec un début de boucle dû à la réaction de réduction de l'oxygène résiduel pour les potentiels les plus négatifs puis des courbes peu incurvées. Les courbes de Tafel sont également tracées pour déterminer les coefficients de Tafel et  $i_0$  permettant de calculer  $R_t$  (Figure III-22 et Tableau III-17).



**Figure III-22 : Courbes intensité-potential en représentation semi-logarithmique pour une électrode P30 à différentes concentrations en KCl. 0,1 M (en noir). 0,2 M (en rouge). 0,5 M (en vert). 1,0 M (en bleu).**

Les valeurs des coefficients de Tafel, de  $i_0$ , et de la résistance de transfert de charge sont listées dans le Tableau III-17. Les concentrations en oxygène dissout sont calculées à partir de la Figure III-17 en utilisant l'équation II-6.

concentration	0,1 M	0,2 M	0,5 M	1,0 M
$\beta(O_2)$	-0,64	-0,84	-1,06	-1,26
$\beta(Cl^-)$	1,01	1,26	2,27	2,50
$i_0 (10^{-6} A)$	0,39	0,99	1,58	1,21
$R_t (10^5 \Omega .cm^2)$	4,31	2,2	2,0	2,9
$[O_2] 10^{-5} mol.L^{-1}$	2,3	2,6	2,3	2,2

**Tableau III-17 : Valeurs des coefficients de Tafel, de  $i_0$  et de la résistance de transfert de charge  $R_t$  en fonction de la concentration en KCl pour des électrodes P30.**

Les valeurs de la résistance de transfert de charge et de la concentration en dioxygène sont dans le même ordre de grandeur que celles obtenues pour les électrodes P15. Il y a donc comme lors de l'analyse des électrodes P15, une présence non négligeable d'oxygène dissout en solution qui entraîne un courant faradique.

Les paramètres sont ajustés avec le logiciel Simad ce qui permet de tracer pour les quatre concentrations les valeurs de  $\alpha$  et de la capacité équivalente calculée à partir de la

formule de Brug (équation III-9 et III-10) (Figure III-23). Les résultats pour une autre électrode sont présentés en annexe.

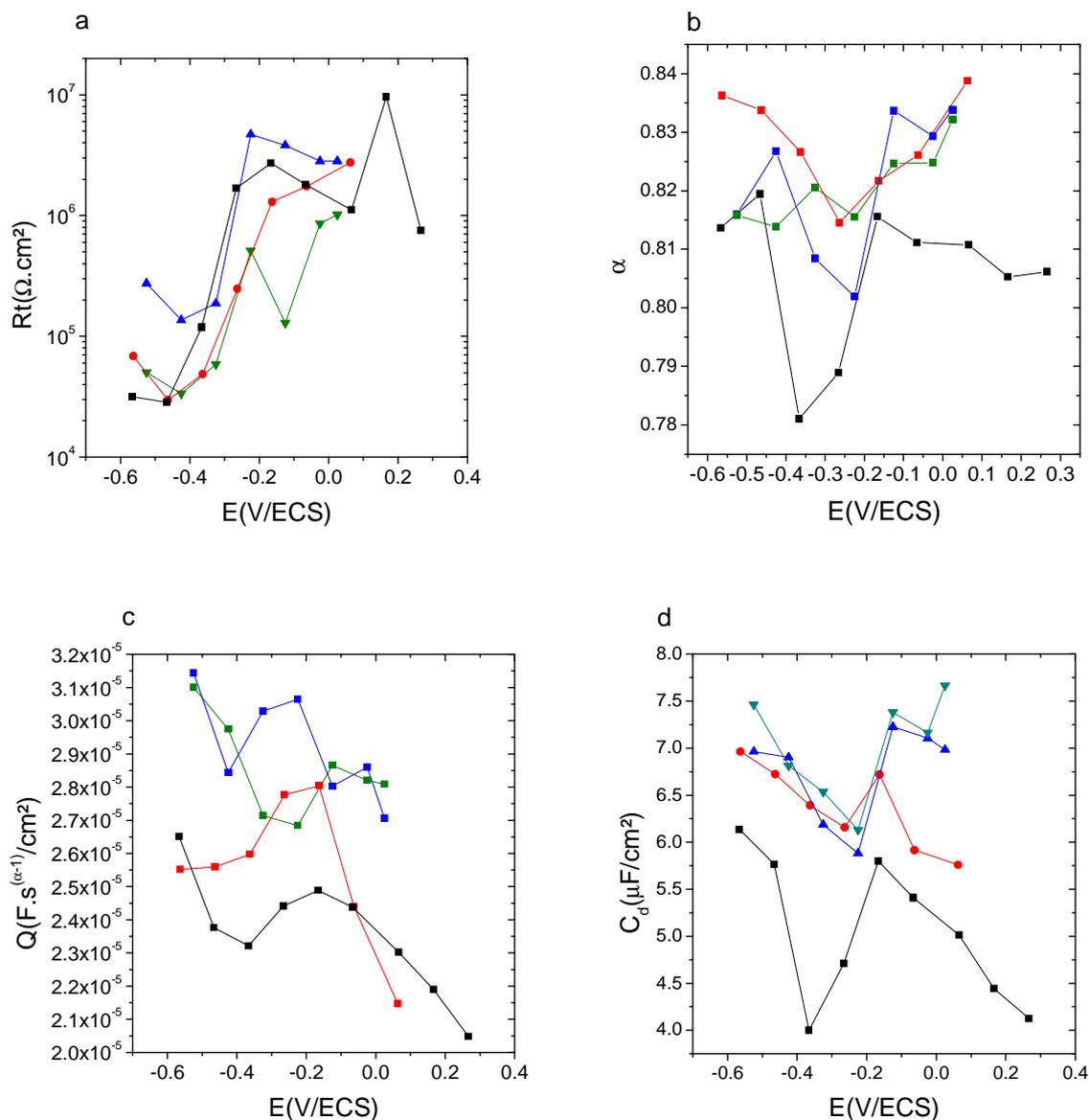


Figure III-23 : Paramètres du circuit selon le potentiel pour une électrode P30 a) variation de la résistance de transfert de charge  $R_t$  b) variation de  $\alpha$  c) variation de  $Q$  d) variation de la capacité de double couche  $C_d$  pour différentes concentrations en KCl (en noir) 0,1 M (en rouge) 0,2 M, (en vert) 0,5 M (en bleu) 1,0 M.

De la même façon que pour les électrode P15, la résistance de transfert de charge varie avec le potentiel. Une légère diminution des valeurs  $R_t$  est observée de -0,6 V à -0,5 V/ECS, puis une augmentation de -0,5 V à -0,2 V/ECS puis une légère augmentation ou une stagnation jusqu' à 0,4 V/ECS selon les concentrations en KCL. Les faibles valeurs de  $R_t$  aux potentiels proches de -0,5 V/ECS sont dues à la réaction de réduction de l'oxygène résiduel. Les valeurs des résistances de transfert de charge déterminées à l'aide des courbes de Tafel

sont dans le même ordre de grandeur que les résistances déterminées par impédance comme dans le cas des électrodes P15.

Les valeurs de  $\alpha$  sont proches de celles des électrodes P15 mais avec une amplitude de variation plus grande. Dans le cas des valeurs de  $\alpha$  obtenues pour l'électrode présentée dans la Figure III-27b, la valeur de  $\alpha$  présente un minimum proche de la valeur du potentiel de circuit ouvert. Pour les valeurs obtenues pour la deuxième électrode aucune forme évidente des courbes n'est observée. De plus, les valeurs de  $\alpha$  sont plus faibles que celles observées pour les dépôts P15 dans les 4 concentrations en KCl. Cette observation est la même que celle obtenue par Tamiasso *et al.* pour l'interface a-CN<sub>x</sub>/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour les pH 2,5 et 5 [37].

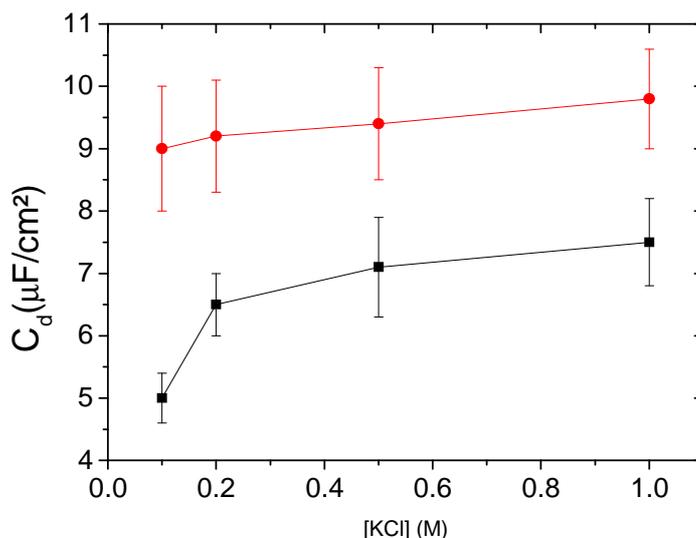
La capacité pour les électrodes P30 varie également avec le potentiel. Dans le cas des valeurs présentées, en allant des potentiels négatifs aux potentiels positifs, une diminution de  $C$  est observée jusqu'à atteindre un minimum au potentiel de circuit ouvert, puis un maximum autour de -0,1 V/ECS, puis de nouveau une diminution de celle-ci. Comme pour les dépôts P15, l'ordre des valeurs des capacités selon la concentration en KCl est différente selon l'électrode. La moyenne des valeurs des capacités équivalentes est donc calculée pour chaque concentration en KCl (Tableau III-18).

[KCl] (M)	0,1	0,2	0,5	1,0
$C_d(\mu\text{F}/\text{cm}^2)$	5,0±0,4	6,5±0,5	7,1±0,8	7,5±0,7

**Tableau III-18 : Valeurs moyennes des capacités équivalentes sur P30 selon la concentration en KCl.**

Une augmentation de la capacité de double couche est observée lorsque la concentration en KCl augmente en accord avec la théorie (équation III-11, III-13et II-14)

Les valeurs moyennes des capacités dans le cas des électrodes P15 et P30 sont présentées dans la Figure III-24.



**Figure III-24 : Valeurs moyennes des capacités équivalentes selon la concentration en KCl en rouge pour les électrodes P15 et en noir pour les électrodes P30.**

Les valeurs moyennes de la capacité de double couche pour les électrodes P15 sont supérieures aux électrodes P30 pour les quatre concentrations en KCl (Tableau III-16 et Tableau III-18). Les valeurs plus faibles de capacité de double couche pour les électrodes P30 sont dues à leurs faibles conductivités comparativement aux électrodes P15. En effet, les expériences en CS-AFM ont montrées une conductivité électrique locale des films P15 80 fois supérieure à celle obtenue pour les films P30.

### III.2.5. Etude électrochimique d'un couple redox sur les dépôts de CN<sub>x</sub> sur ITO P15

La réactivité électrochimique des électrodes de a-CN<sub>x</sub> est également étudiée pour déterminer le protocole optimal de dépôts pour les futures applications comme électrodes dans une puce microfluidique pour la détection d'espèces électroactives. Pour cela, la réponse des films vis-à-vis d'un système redox est étudiée. Le couple redox choisi est le ferricyanure/ferrocyanure, système réversible qui subit un transfert électronique à un électron par sphère externe sensible à l'état de surface de l'électrode [42]. La réaction ayant lieu à l'électrode est donc :



### III.2.5.1 Electrode sans prétraitement

La réactivité électrochimique est étudiée par spectroscopie d'impédance électrochimique. Les spectres d'impédance sont enregistrés pour chaque électrode au potentiel d'équilibre du système redox ferri-ferrocyanure (0,21 V/ECS), pour un domaine de fréquence entre 100 kHz et 50 mHz avec 5 points par décade (Figure III-25). Le diagramme de Nyquist est différent de précédemment car la réaction faradique est mieux contrôlée par la présence du traceur redox en solution: le ferricyanure/ferrocyanure de potassium.

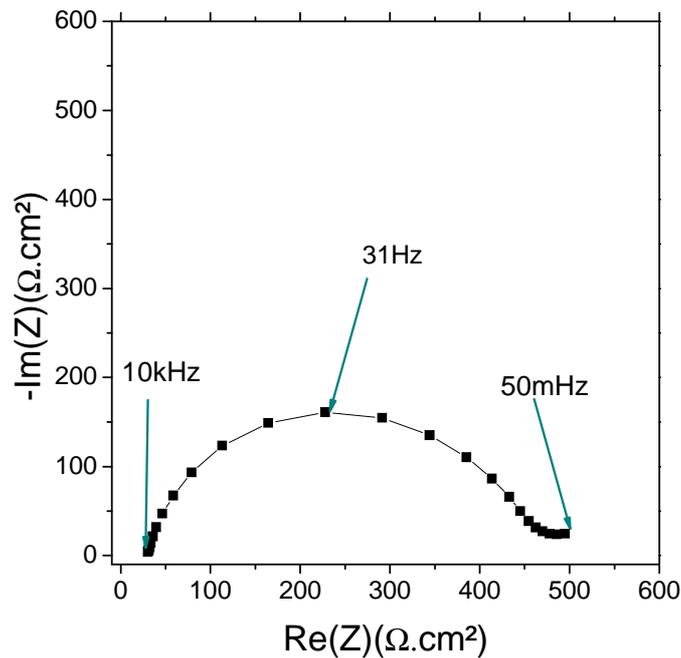


Figure III-25 : Diagramme de Nyquist d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) réalisé avec le protocole P15 dans une solution de ferricyanure ferrocyanure de potassium  $10^{-2} \text{ M}$  dans  $0,5 \text{ M KCl}$ . L'électrode n'a pas subi de pré-traitement.

Le diagramme se décompose en deux parties, une boucle capacitive aux hautes fréquences (100 kHz-100 mHz) et un tassement aux basses fréquences (100 mHz-50 mHz). La limite haute fréquence du diagramme et le diamètre de la boucle correspondent respectivement à la valeur de la résistance de l'électrolyte,  $R_e$ , et à la résistance de transfert de charge,  $R_t$ . Pour vérifier l'idéalité ou la non-idéalité du comportement capacitif, on porte  $\log(-Im(Z))$  en fonction de  $\log(\text{fréquence (Hz)})$  (Figure III-26a). Ce diagramme nous permet d'avoir une première estimation de la valeur de  $\alpha$  de l'ordre de 0,82. Cette valeur montre un comportement non idéal de la capacité et justifie l'utilisation d'un élément de phase constante,

CPE, dans le circuit équivalent. De plus, l'exploitation des valeurs de la partie imaginaire permet d'estimer la valeur de  $Q$  (Figure III-26b) en utilisant la formule III-23 [43].

$$Q = -\frac{1}{\text{Im}(Z) \cdot (2\pi f)^\alpha} \cdot \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right) \quad \text{Equation III-16}$$

Il s'agit d'un tracé de  $Q$  en fonction de la fréquence, la partie haute fréquence est linéaire et correspond à la valeur de  $Q$  du CPE du circuit équivalent. La valeur de  $Q$  obtenue est de  $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ F.s}^{(\alpha-1)} \text{ cm}^{-2}$ .

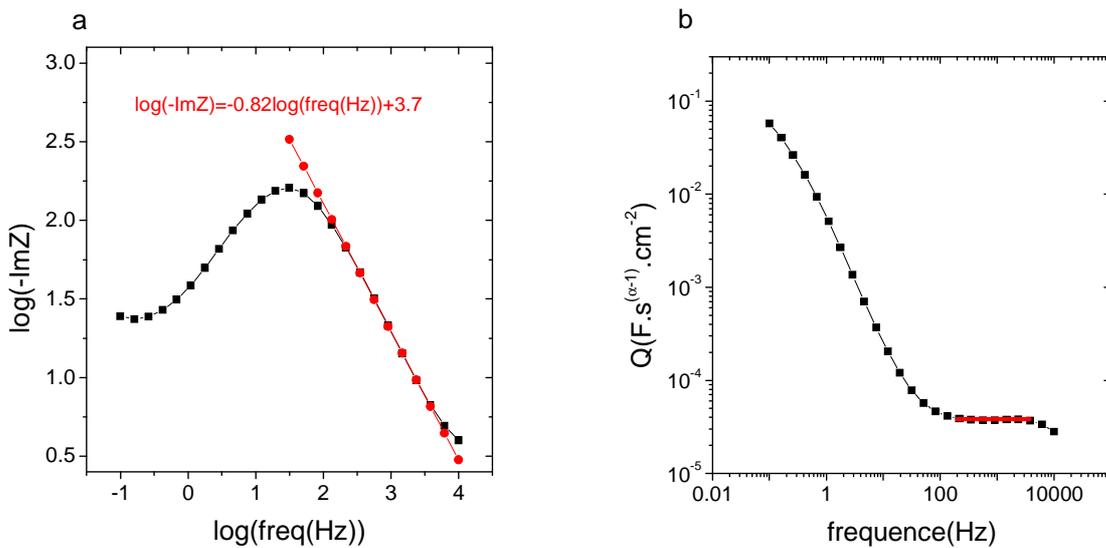


Figure III-26 : Variation de la partie Imaginaire et de  $Q$  en fonction de la fréquence a)  $\log(-\text{Im}(Z))=f(\log(\text{fréquence (Hz)}))$ . b)  $Q=f(\text{fréquence})$  pour une électrode de a-CNx réalisée avec le protocole P15 dans une solution de ferricyanure ferrocyanure de potassium  $10^{-2}\text{M}$  dans  $0,5\text{M KCl}$ .

Le circuit équivalent à l'interface électrode/ solution proposé est donc le suivant (Figure III-27) :

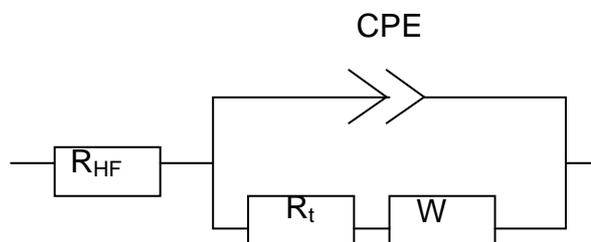


Figure III-27 : Circuit électrique équivalent de l'interface électrode a-CNx/solution électrolyte considérée en présence du couple redox ferricyanure/ferrocyanure.

Avec la résistance haute fréquence,  $R_{HF}$ , la résistance de transfert de charge,  $R_t$ , l'impédance de diffusion de Warburg,  $W$ , et l'élément de phase constante, CPE.

L'expression globale de l'impédance  $Z_g$  s'exprime de la façon suivante :

$$Z_g = R_{HF} + \frac{R_t + W}{1 + Q(R_t + W)(j\omega)^\alpha} \quad \text{Equation III-17}$$

Le Tableau III-19, ci-après, résume les résultats après ajustement des paramètres du circuit équivalent à l'aide du logiciel Simad.

$R_{HF}(\Omega.cm^2)$	$Q(F.s^{(\alpha-1)}.cm^{-2})$	$\alpha$	$R_t(\Omega.cm^2)$	$S_1(\Omega.s^{-1/2}.cm^2)$	$\chi^2$
30	$3,0.10^{-5}$	0,84	426	26	1,3

**Tableau III-19 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent obtenues après ajustement avec  $\sigma=0,01$**

avec  $S_1$ , le coefficient de Warburg.

Les valeurs déterminées graphiquement pour  $Q$  et  $\alpha$  sont proches des valeurs après ajustement des paramètres confirmant ainsi la bonne adéquation du circuit équivalent. La capacité de double couche calculée avec la formule de Brug (Equation III-16 et III-17) est égale à 7,9  $\mu F/cm^2$ . La valeur de capacité équivalente est proche de la valeur de 8  $\mu F/cm^2$  trouvée pour une solution de KCl 0,5 M seul. De plus, la valeur de  $R_{HF}$  est également proche de la valeur de 30  $\Omega.cm^2$  trouvée pour KCl 0,5M.

À partir de ces résultats, nous pouvons déterminer la constante de vitesse de transfert de charge hétérogène,  $k_0$ , qui est inversement proportionnelle à la résistance de transfert de charge à surtension nulle ( $\eta \rightarrow 0$ ),  $R_{t,\eta \rightarrow 0}$ .

$$k_0 = \frac{RT}{F^2 S R_{t,\eta \rightarrow 0} [C]} \quad \text{Equation III-18}$$

Avec la température,  $T$ , la constante des gaz parfaits,  $R$ , la constante de faraday,  $F$ , la concentration de l'espèce électroactive  $[C]$  et la surface de l'électrode,  $S$ .

Cette expression est établie en combinant deux autres équations. La première équation est celle donnant le courant  $i$  en fonction de la concentration en considérant l'équation cinétique pour la réaction de premier ordre (Equation III-19). La deuxième relation est celle liant le courant à la résistance de transfert de charge selon la relation de Butler –Volmer (Equation III-20).

$$i = k_0 n F [C] \quad \text{Equation III-19}$$

$$i = \frac{RT}{nFR_{i,\eta \rightarrow 0}}$$

**Equation III-20**

avec  $n$ , le nombre d'électrons échangés lors de la réaction.

Ceci nous permet de trouver une constante de vitesse de transfert de charge hétérogène  $k_0$  égale à  $6,25 \cdot 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ . La valeur de  $k_0$  est relativement faible et donc caractéristique d'une réactivité électrochimique plutôt lente. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles trouvées pour les dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur Si dopé « n » et « p » avec une P(N<sub>2</sub>) de 15%. Cependant ces valeurs sont plus de 100 fois inférieures à celles obtenues sur Si intrinsèque avec P(N<sub>2</sub>) de 15% par pulvérisation DC en présence de RF. Ces dépôts sont réalisés en appliquant une puissance radio fréquence pendant les dépôts. Les expériences sur Si intrinsèque sans application de radio fréquence sont en cours d'analyse mais montrent a priori une réactivité électrochimique très faible [7].

Une illustration des diagrammes d'impédance illustrant la bonne concordance entre la simulation et l'expérience est montrée dans la Figure III-28 :

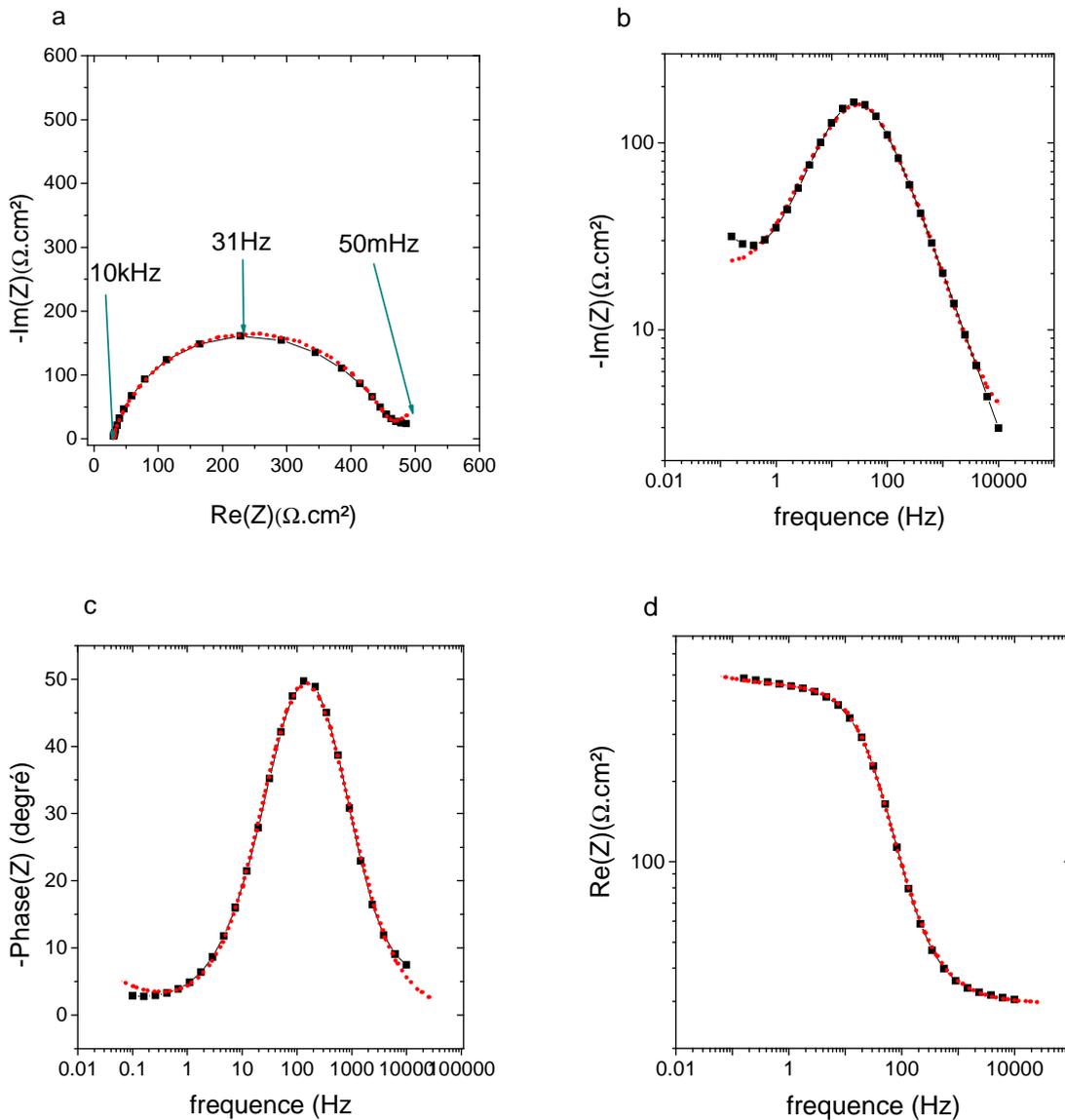


Figure III-28 : Comparaison des données de l'impédance expérimentale (■) et simulée (...) à l'aide du circuit équivalent a) diagramme de Nyquist. b) partie réelle en fonction de la fréquence. c) phase en fonction de la fréquence. d) partie imaginaire en fonction de la fréquence.

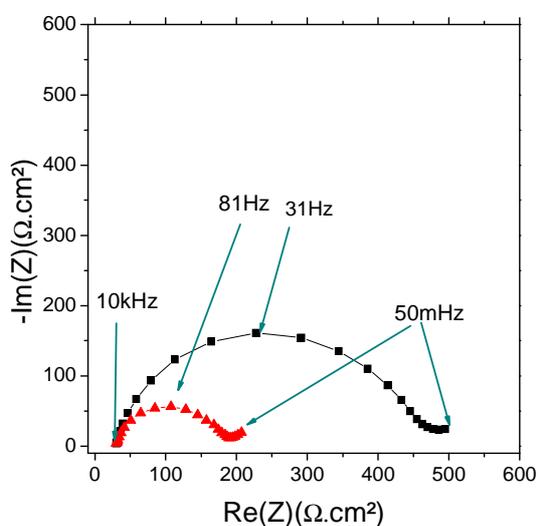
### III.2.5.2 Electrode avec prétraitement dans KCl

Les électrodes doivent être activées électrochimiquement pour augmenter leur réactivité électrochimique. Ceci permettra de diminuer la valeur de  $k_0$  et de la différence de potentiel  $\Delta E_p$  et d'augmenter l'intensité des pics. Comme mentionné dans la partie III.3.1.2, une activation des dépôts couches minces dans une solution  $\text{H}_2\text{SO}_4$  est trop agressive rendant les électrodes inutilisables. Nous avons donc choisi de réaliser l'activation des électrodes dans une solution neutre, c'est-à-dire dans KCl 0,5 M. De plus, pour s'assurer du bon maintien des

électrodes de a-CN<sub>x</sub>, le potentiel de réduction de l'ITO (-1 V/ECS) ne sera pas dépassé. Les dépôts sont donc prétraités par balayage de 5 voltammétries cycliques dans KCl 0,5 M de -1 à +1,4 V/ECS à 50 mV/s.

### III.2.5.2.1 Spectroscopie d'impédance électrochimique au potentiel d'équilibre du couple ferricyanure/ferrocyanure

Le prétraitement dans KCl 0,5 M est alors réalisé sur les électrodes. La Figure III-29 montre la comparaison des diagrammes d'impédance en représentation de Nyquist avant et après prétraitement dans KCl 0,5 M.



**Figure III-29 : Diagramme de Nyquist d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> P15 dans une solution de ferricyanure ferrocyanure de potassium 10<sup>-2</sup> M dans 0,5 M KCl (■) avant et (▲) après prétraitement dans 0,5 M KCl .**

De même on porte le  $\log(-\text{Im}(Z))$  en fonction du  $\log(\text{fréquence (Hz)})$  (Figure III-30a). Ce diagramme nous donne une valeur de  $\alpha$  de l'ordre de 0,87. Cette valeur montre également un comportement non idéal de la capacité. De la même façon que précédemment la valeur de  $Q$  est déterminée en traçant  $Q$  en fonction de la fréquence. Ce graphique donne  $Q = 2,3 \cdot 10^{-5} \text{ F} \cdot \text{s}^{(\alpha-1)} \cdot \text{cm}^{-2}$  (Figure III-30b). Les valeurs de  $\alpha$  augmentent avec le prétraitement ce qui montre que la surface devient plus homogène avec le prétraitement.

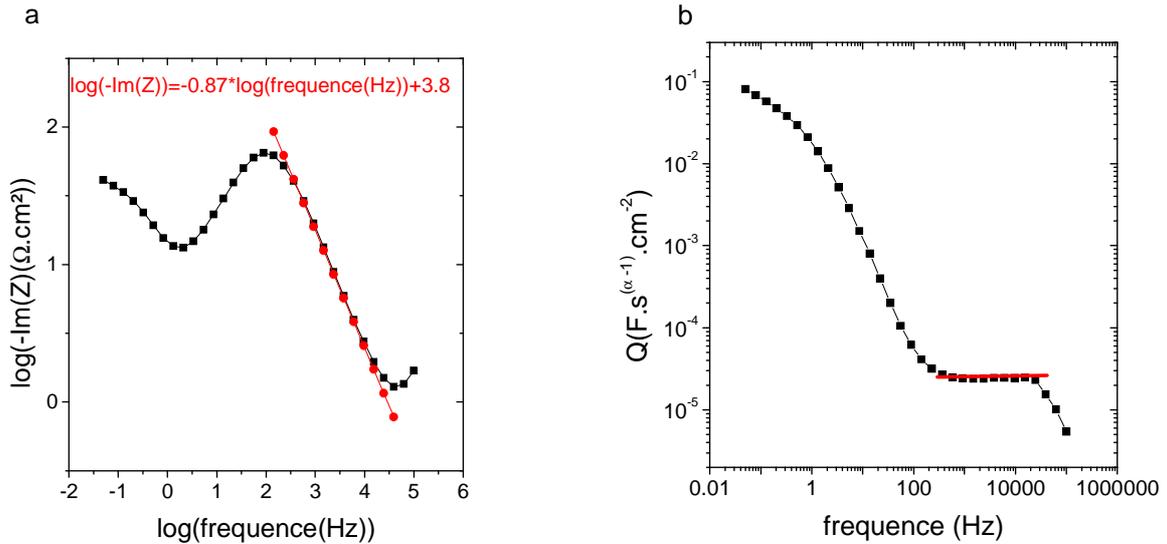


Figure III-30 : Variation de la partie Imaginaire et de Q en fonction de la fréquence a)  $\log(-\text{Im}(Z))=f(\log(\text{fréquence (Hz)}))$ . b)  $Q=f(\text{fréquence})$  pour une électrode de a-CN<sub>x</sub> ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) réalisée selon le protocole P15 dans une solution de ferricyanure ferrocyanure de potassium  $10^{-2} \text{ M}$  dans  $0,5 \text{ M KCl}$ .

Les paramètres du circuit équivalent sont ajustés en utilisant le circuit équivalent de la Figure III-27 à l'aide du logiciel Simad et listés dans le Tableau III-20.

Echantillons	$R_{HF}(\Omega \cdot \text{cm}^2)$	$Q(\text{F} \cdot \text{s}^{(\alpha-1)} \cdot \text{cm}^{-2})$	$\alpha$	$R_t(\Omega \cdot \text{cm}^2)$	$S_1(\Omega \cdot \text{s}^{-1/2} \cdot \text{cm}^2)$	$\chi^2$
1	25,1	$1,8 \cdot 10^{-5}$	0,89	163	20	0,65
2	25,1	$2,2 \cdot 10^{-5}$	0,88	158	32	0,85
3	28,8	$4,0 \cdot 10^{-5}$	0,81	162	18	1,05
moyenne	$26 \pm 2$	$(3 \pm 1) 10^{-5}$	$0,86 \pm 0,4$	$161 \pm 3$	$23 \pm 7$	-

Tableau III-20: Valeurs des paramètres du circuit équivalent obtenues après ajustement avec  $\sigma=0,01$ .

L'efficacité du prétraitement est clairement observée, témoin en est la diminution d'un facteur trois de la résistance de transfert de charge  $R_t$  après le prétraitement.

Une illustration des diagrammes d'impédance montrant la bonne concordance entre la simulation et l'expérience figure ci-dessous (Figure III-31) :

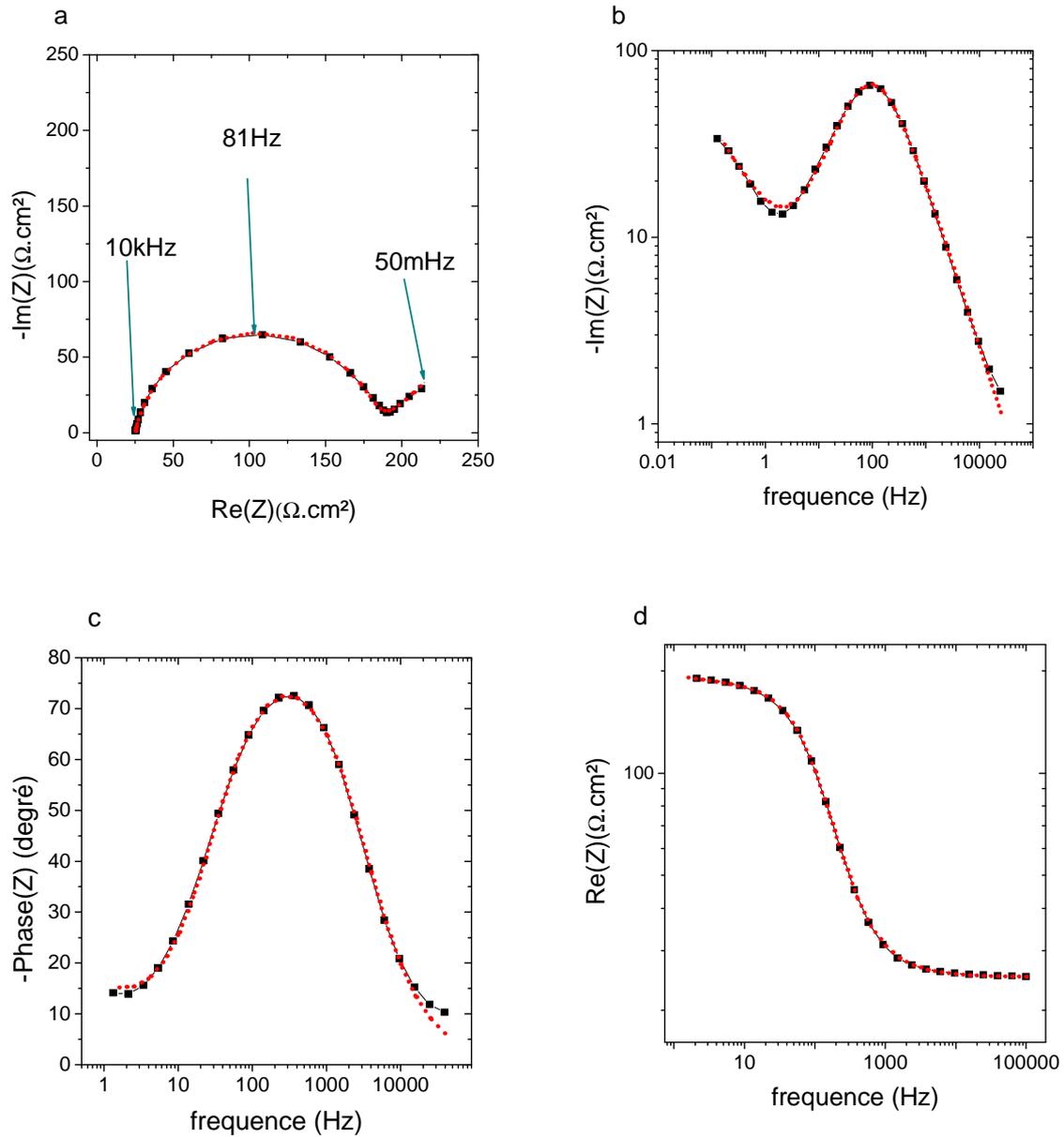


Figure III-31 : Comparaison des données de l'impédance expérimentale (■) et simulée (...) à l'aide du circuit équivalent a) diagramme de Nyquist. b) partie réelle en fonction de la fréquence. c) phase en fonction de la fréquence. d) partie imaginaire en fonction de la fréquence.

Les valeurs de capacité équivalente déterminées pour les trois électrodes sont indiquées dans le Tableau III-21.

échantillons	C <sub>d</sub> (μF/cm <sup>2</sup> )	k <sub>0</sub> (cm.s <sup>-1</sup> )
1	6,8	1,63.10 <sup>-4</sup>
2	7,9	1,69.10 <sup>-4</sup>
3	8,1	1,72.10 <sup>-4</sup>
moyenne	(7,6±0,7)	(1,68 ±0,04) 10 <sup>-4</sup>

**Tableau III-21 : Valeurs de la capacité équivalente et de la constante de vitesse de transfert de charge hétérogène k<sub>0</sub> pour les 3 échantillons.**

Les valeurs relativement proches de C<sub>d</sub> et de k<sub>0</sub> montrent que les propriétés des films de a-CN<sub>x</sub> déposés sur ITO sont reproductibles. Les valeurs des capacités équivalentes restent dans le même ordre de grandeur que précédemment tandis que les valeurs de k<sub>0</sub> ont été multipliées par 3 grâce à l'activation. L'activation joue un rôle sur la résistance de transfert de charge mais pas sur la capacité de double couche.

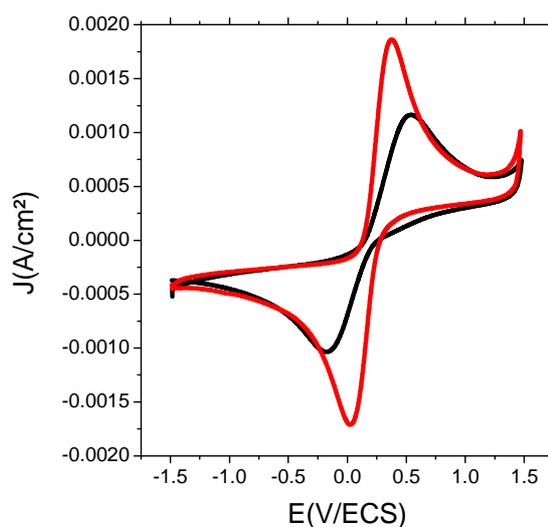
Les valeurs de la constante de vitesse de transfert de charge hétérogène k<sub>0</sub> sont en accord avec le caractère quasi réversible de la réaction du ferri-ferrocyanure sur CN<sub>x</sub>.

### **III.2.5.2.2 Voltammétrie cyclique**

La réactivité électrochimique est également étudiée par voltammétrie cyclique. Celle-ci est réalisée avant et après prétraitement dans KCl à 50 mV/s pour des potentiels allant de -1,5 à +1,5 V/ECS.

#### **III.2.5.2.2.1 Comparaison des voltammogrammes avant et après prétraitement**

La comparaison des voltammétries cycliques avant et après prétraitement dans KCl 0,5 M (Figure III-32).



**Figure III-32 : Voltammétrie cyclique d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) suivant le protocole P15 dans une solution de ferricyanure ferrocyanure de potassium  $10^{-2} \text{ M}$  dans  $0,5 \text{ M KCl}$  avant (noir) et après (rouge) prétraitement dans KCl.**

La comparaison des voltammogrammes montre une augmentation d'intensité des pics et une diminution de  $\Delta E_p$  après prétraitement dans KCl  $0,5 \text{ M}$ . Ces valeurs sont indiquées dans le Tableau III-22.

	$J_{\text{red}} \text{ (A/cm}^2\text{)}$	$J_{\text{ox}} \text{ (A/cm}^2\text{)}$	$\Delta E_p \text{ (mV)}$
Avant	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	730
après	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	340

**Tableau III-22 : Valeurs de l'intensité du pic d'oxydation  $I_{\text{ox}}$  et de réduction  $I_{\text{red}}$  et de la différence de potentiel  $\Delta E_p$  avant et après prétraitement.**

Les valeurs des densités de courant de réduction sont toujours légèrement supérieures à celle d'oxydation. Cette différence peut être due à la différence de coefficient de diffusion entre le  $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-}$  et le  $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{4-}$ .

Les voltammétries cycliques sont également réalisées pour les trois électrodes. Une différence de potentiel  $\Delta E_p$  séparant les deux pics est de  $(720 \pm 60) \text{ mV}$  avant prétraitement et de  $(336 \pm 45) \text{ mV}$  après prétraitement. Dans le cas d'une réaction réversible, l'écart entre les potentiels des pics de réduction et d'oxydation est de  $2.22RT/nF$  soit pour une réaction monoélectronique de  $59 \text{ mV}$  à  $25^\circ\text{C}$ . La valeur obtenue largement supérieure à  $59 \text{ mV}$  laisse supposer que le transfert de charge électronique à l'interface électrode/solution est moins rapide.

### III.2.5.2.2.2 Voltammétrie cyclique du ferricyanure à différentes vitesses de balayage

Une étude en fonction de la vitesse de balayage est réalisée pour observer l'influence de la chute ohmique sur les voltammogrammes. La voltammétrie cyclique du ferricyanure est réalisée à 16 vitesses de balayage allant de 0,01 à 10 V/s de 0,7 V/ECS à -1 V/ECS. Les expériences sont réalisées à deux concentrations en ferricyanure 10 mM et 0,5 mM dans 0,5 M KCl.

Le potentiel de pic est alors relevé pour chaque vitesse et celui-ci est tracé en fonction du logarithme de  $v$  (Figure III-33 : a) Variation du potentiel de pic en fonction de  $\log(v)$ . b) Variation de  $(E_{ox}+E_{red})/2$  pour des solutions à différentes concentrations en ferricyanure de potassium dans KCl 0,5M (■) 10 mM en ferricyanure (▲) 0,5 mM en ferricyanure.

a). La variation de  $(E_{ox}+E_{red})/2$  est également tracée en fonction du  $\log v$  (Figure III-33b). Dans le cas du système ferricyanure/ferrocyanure de potassium, les valeurs des coefficients  $\alpha$  sont égales. Les branches anodiques et cathodiques devraient se superposer et donc  $(E_{ox}+E_{red})/2$  devrait être relativement constant. La décroissance de  $(E_{ox}+E_{red})/2$  observée aux hautes vitesses de balayage est due à la chute ohmique.

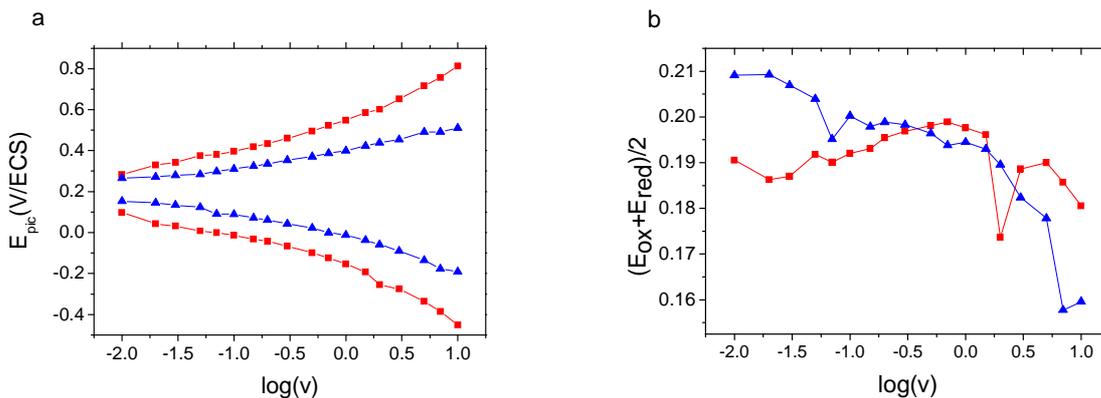


Figure III-33 : a) Variation du potentiel de pic en fonction de  $\log(v)$ . b) Variation de  $(E_{ox}+E_{red})/2$  pour des solutions à différentes concentrations en ferricyanure de potassium dans KCl 0,5M (■) 10 mM en ferricyanure (▲) 0,5 mM en ferricyanure.

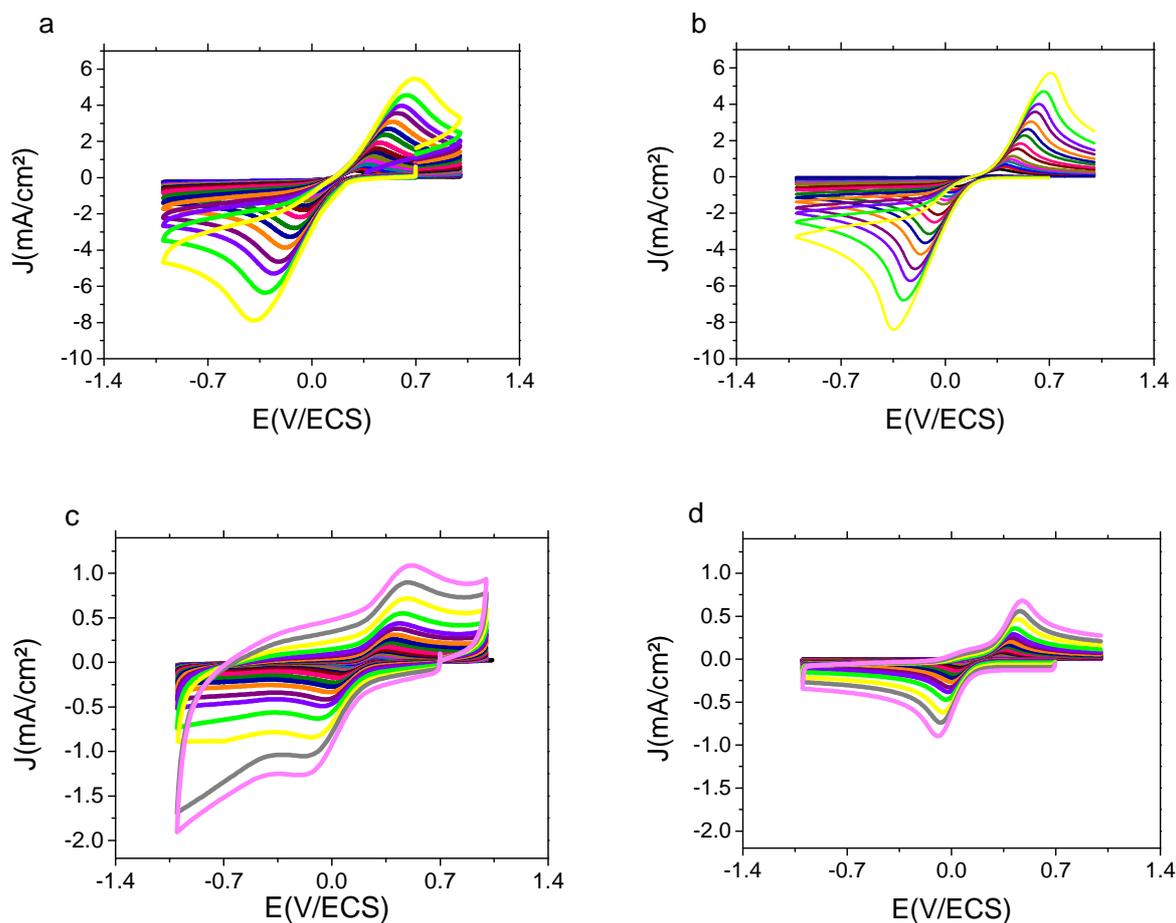
Une contribution importante de la chute ohmique est observée. Pour vérifier l'importance de celle-ci, une simulation des voltammogrammes est effectuée en utilisant le logiciel Digielch et en prenant en compte les paramètres déterminés par spectroscopie d'impédance électrochimique ( $k_0$ ,  $C_d$  et  $R_e$ ) (Tableau III-23). Ces simulations sont réalisées avec et sans correction de la chute ohmique,  $R_e$ . Les diagrammes d'impédance ont été simulés avec le même circuit équivalent que précédemment.

[ferricyanure] (mM)	R <sub>HF</sub> (Ω.cm <sup>2</sup> )	Q (F.s <sup>(α-1)</sup> .cm <sup>-2</sup> )	α	R <sub>t</sub> (Ω.cm <sup>2</sup> )	S (Ω.s <sup>-1/2</sup> .cm <sup>2</sup> )	C <sub>d</sub> (μF/cm <sup>2</sup> )	k <sub>0</sub> (cm.s <sup>-1</sup> )
0,5	40	3,3.10 <sup>-5</sup>	0,88	817	521	13,2	6,5.10 <sup>-4</sup>
10	35	2,010 <sup>-5</sup>	0,92	121	34	10,2	2,2.10 <sup>-4</sup>

**Tableau III-23 : Valeurs des paramètres du circuit obtenues après simulation à l'aide du logiciel Simad pour les deux concentrations en ferricyanure.**

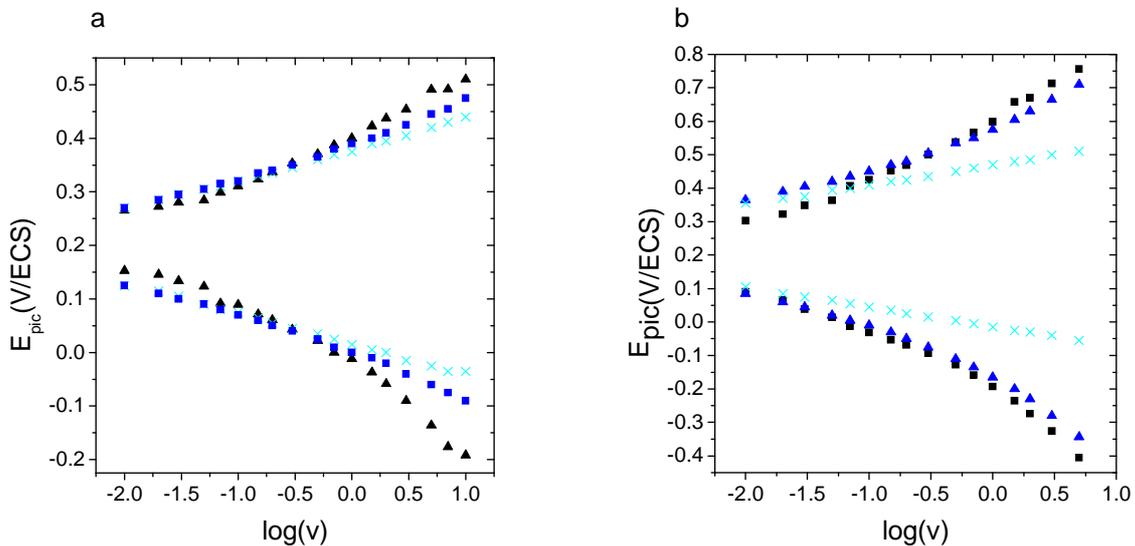
Pour les simulations sur Digielch, les valeurs retenues pour la simulation sont les valeurs de  $k_0$ , les valeurs de la capacité équivalente représentant la capacité de double couche ainsi que les valeurs de  $R_{HF}$ .

Les Figure III-34 montrent les voltammogrammes expérimentaux et simulés avec le logiciel Digielch pour les deux concentrations.



**Figure III-34 : Voltammogrammes pour différentes vitesses de balayage 10 mV/s, 20 mV/s, 30 mV/s, 50 mV/s, 70 mV/s, 100 mV/s, 150 mV/s, 200 mV/s, 300 mV/s, 500 mV/s, 700 mV/s, 1000 mV/s, 1500 mV/s, 2000 mV/s, 5000 mV/s, 7000 mV/s, 10000 mV/s a) voltammogrammes expérimentaux dans une solution de ferricyanure 0,5mM b) Voltammogrammes simulés dans une solution de ferricyanure 0,5 mM c) Voltammogrammes expérimentaux dans une solution de ferricyanure 10 mM d) Voltammogrammes simulés dans une solution de ferricyanure 10 mM.**

Les valeurs des potentiels de pic sont tracées en fonction du logarithme de la vitesse de balayage (Figure III-35). Les relations reliant les potentiels de pic en fonction de la vitesse de balayage sont indiquées au chapitre II-1-1 (Equation II-7 et II-8). Jusqu'à une valeur de vitesse de balayage de 300 mV/s les valeurs des potentiels de pics simulés par Digielch et expérimentaux sont assez proches puis l'écart augmente rapidement dû à la chute ohmique plus importante aux grandes vitesses de balayage. La comparaison des courbes en bleu foncé et en bleu clair pour les deux concentrations en ferricyanure pour une même concentration en KCl montre une influence beaucoup plus importante de la chute ohmique lorsque la concentration en ferricyanure est élevée.



**Figure III-35 : Variation du potentiel de pic en fonction de  $\log(v)$  pour une solution de ferricyanure dans 0,5 M KCl a) 0,5 mM en ferricyanure b) 10 mM en ferricyanure . ( $\Delta$ ) Valeurs de  $E_{pic}$  expérimentales ; ( $\square$ ) valeurs de  $E_{pic}$  simulées par Digielch avec la chute ohmique ; ( $\times$ ) valeur de  $E_{pic}$  simulées par Digielch sans chute ohmique.**

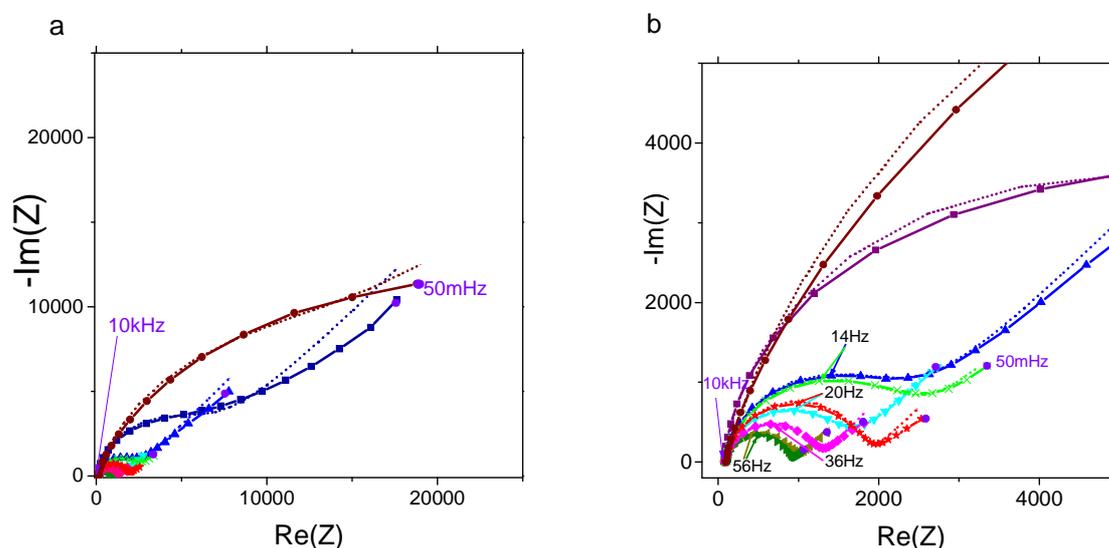
Pour notre future application en microsystèmes, c'est-à-dire la détection du peptide TTR marqué, les concentrations en TTR marqué ainsi que les vitesses de balayage seront relativement faibles, ce qui nous permet de nous placer dans des conditions où la chute ohmique est peu importante.

### III.2.5.2.3 Spectroscopie d'impédance électrochimique à différents potentiels

Dans le cas où le transfert de charge est contrôlé, des mesures d'impédance sont réalisées à différents potentiels autour du potentiel de circuit ouvert pour connaître la variation

des paramètres du circuit équivalent en fonction du potentiel. Les diagrammes d'impédance sont ajustés avec le circuit de la Figure III-27.

La Figure III-36 montre le diagramme d'impédance en représentation de Nyquist aux différents potentiels ainsi que la simulation de ces diagrammes.



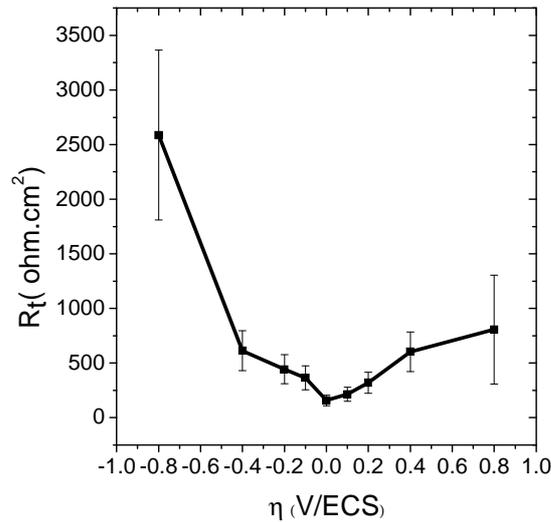
**Figure III-36 : Diagramme de Nyquist pour le ferricyanure/ferrocyanure de potassium à  $10^{-2}$  M dans KCl 0,5 M à plusieurs potentiels a) fenêtre entière. b) Agrandissement de la fenêtre. (□) +1,025 V/ECS, (▲) +0,625 V/ECS, (▼) +0,425 V/ECS, (◄) +0,325 V/ECS, (►) +0,225 V/ECS, (X) +0,125 V/ECS, (◇) -0,025 V/ECS, (★) -0,125 V/ECS, (○) -0,525 V/ECS.**

Le Tableau III-24 montre les valeurs des paramètres du circuit obtenues après ajustement avec le logiciel Simad. La valeur de  $R_{ITO/CN_x}$  est déterminée en calculant  $R_{HF}-R_e$  ( $R_e = 3,5 \Omega.cm^2$ ).

E(V/ECS)	$R_{HF}(\Omega.cm^2)$	$R_{ITO/CN_x}$ ( $\Omega.cm^2$ )	$Q(F.s^{(\alpha-1)}$ / $cm^2$ )	$\alpha$	$R_t(\Omega.cm^2)$	$C_d$ ( $\mu F/cm^2$ )	$\chi^2$
-0,525	26,1	22,6	$4,4.10^{-5}$	0,83	4663	10,8	2,9
-0,125	27,0	23,5	$2,2.10^{-5}$	0,91	488	10,2	1,5
-0,025	25,0	21,5	$2,5.10^{-5}$	0,90	318	10,4	0,89
0,125	25,0	21,5	$2,6.10^{-5}$	0,89	626	10,7	0,9
0,225	27,9	24,3	$2,2.10^{-5}$	0,90	226	9,5	1,11
0,325	25,0	21,5	$2,4.10^{-5}$	0,90	240	10,9	0,83
0,425	24,9	21,3	$2,4.10^{-5}$	0,91	404	11,0	0,69
0,625	27,2	23,7	$1,9.10^{-5}$	0,93	586	10,0	3
1,025	21,8	18,3	$1,4.10^{-5}$	0,92	1855	6,9	0,69

**Tableau III-24 : Valeurs des ajustements des paramètres du circuit de la Figure III-27 obtenues avec le logiciel Simad avec  $\sigma = 0,01$ .**

Les valeurs des résistances de transfert de charge pour deux électrodes différentes sont reportées en fonctions de la surtension appliquée (Figure III-37). Un minimum est observé à surtension nulle.



**Figure III-37 : Variation de  $R_t$  en fonction de la surtension  $\eta$  appliquée pour un couple ferricyanure/ferrocyanure de potassium  $10^{-2}$  M dans KCl 0,5 M sur une électrode de a-CN<sub>x</sub> P15 de surface 0,282 cm<sup>2</sup>.**

Tamiasso-Martinon *et al.* ont établi l'équation III-21 reliant la résistance de transfert de charge  $R_t$  à la surtension  $\eta$ .

$$R_t = \frac{1 + 2\left(\frac{i_0}{i_L}\right) \cosh(\beta\eta)}{2\beta i_0 \left( 2\left(\frac{i_0}{i_L}\right) + \cosh(\beta\eta) \right)} \quad \text{Equation III-21}$$

avec la surtension,  $\eta$  et le courant limite,  $i_L$ . Quand  $\eta$  tend vers  $+\infty$ , le courant limite de diffusion anodique,  $i=i_{LA}$ , et quand  $\eta$  tend vers  $-\infty$ ,  $i=i_{LC}$ , le courant limite de diffusion cathodique, avec  $-i_{LC} = i_{LA} = i_L$

Cette formule est déduite de la loi de Butler-Volmer, en considérant les coefficients de diffusion égaux ainsi que pour des concentrations en oxydant et en réducteur égales. L'établissement de cette relation suppose également que, les coefficients  $\beta_a$  et  $\beta_c$  sont égaux.

$$\beta = \beta_a = \beta_c = \frac{nF}{2RT} \quad \text{Equation III-22}$$

Cette fonction réalisée présente un maximum lorsque que  $i_L \gg i_0$ , et un minimum quand  $i_0 > i_L/2$ . La fonction est constante et égale à  $1/(2bi_0)$  quand  $i_0 = i_L/2$ .

Ici nous sommes dans le troisième cas, avec un  $i_0$  grand par rapport au courant de diffusion, le transport de matière est donc lent. Pour confirmer cette hypothèse un ajustement des données expérimentales de la courbe est réalisé (Figure III-38). Dans cette ajustement  $i_0 = 4,6 \cdot 10^{-5}$  A et  $i_L = 2,1 \cdot 10^{-5}$  A et le dernier point n'est pas pris en compte. En effet, ce point se situe à des potentiels très négatifs. Dans cette zone de potentiel, la réduction de l'eau et du dioxygène présent en solution devraient être à prendre en compte.

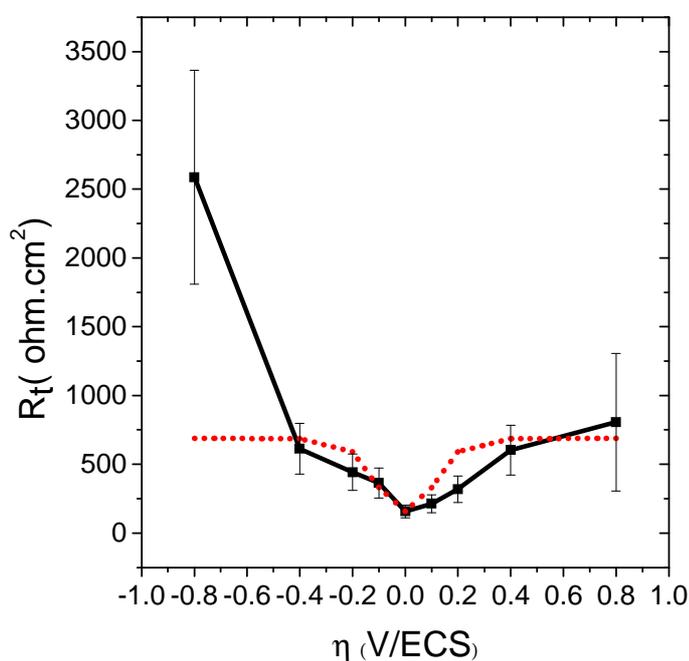


Figure III-38 : Ajustement de la variation de  $R_t$  avec la surtension  $\eta$  appliquée pour un couple ferricyanure/ferrocyanure de potassium  $10^{-2}$  M dans KCl 0,5 M sur une électrode de a-CN<sub>x</sub> P15, l'expérience (noir), la simulation (rouge).

### III.2.6. Etude électrochimique d'un couple redox sur les dépôts de CN<sub>x</sub> sur ITO P30

Nous avons montré dans la partie III-3-1-1 que les électrodes a-CN<sub>x</sub> ayant subi le protocole P30 possèdent une fenêtre de potentiel équivalente à P15 et supérieure à 2,5 V/ECS. De plus, les dépôts P30 présentent une conductivité électrique locale et des valeurs de capacité de double couche inférieures aux dépôts P15 (III-1-3-2 et III-2-2-2). Ces différents paramètres destinent ces électrodes à une utilisation comme interface polarisable. Cette

interface polarisable est utilisée dans le cadre de l'ANR DIMIPOLE (Dispositifs Microfluidiques à interfaces POLarisables pour des séparations Electrophorétiques de haute résolution) en PWF pour le contrôle en temps réel du flux électroosmotique. Nous avons entrepris d'étudier, la réponse des films de a-CN<sub>x</sub> vis à vis d'une réaction électrochimique dans la fenêtre de potentiel accessible avant et après prétraitement.

### III.2.6.1 Voltammétrie cyclique

Les électrodes sont caractérisées par voltammétrie cyclique de -1 V/ECS à +1 V/ECS avec une vitesse de balayage de 0,5 mV/s (Figure III-39) après un barbotage d'un flux d'azote dans la solution.

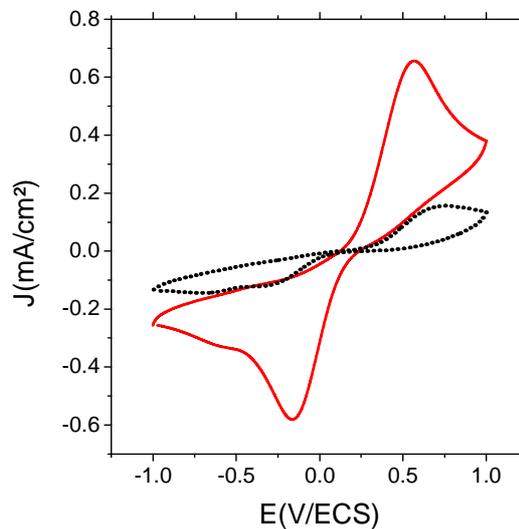


Figure III-39 : Voltammétrie cyclique d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> P15 ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) P30 dans une solution de ferricyanure/ferrocyanure de potassium  $10^{-2} \text{ M}$  dans  $0,5 \text{ M KCl}$ , après prétraitement dans  $\text{KCl } 0,5 \text{ M}$  (rouge), et avant prétraitement (pointillé) .

Les voltammétries cycliques sont réalisées pour trois électrodes. Une différence de potentiel  $\Delta E_p$  séparant les deux pics est de  $(1500 \pm 100) \text{ mV}$  avant prétraitement et de  $(710 \pm 50) \text{ mV}$  après prétraitement. La valeur obtenue largement supérieure à  $60 \text{ mV}$  montre un processus de transfert encore moins rapide que celui sur les électrodes P15. De plus, les pics ne sont pas bien définis avant prétraitement. L'intensité des pics est relativement faible à cause de la mauvaise réactivité électrochimique des dépôts avant activation.

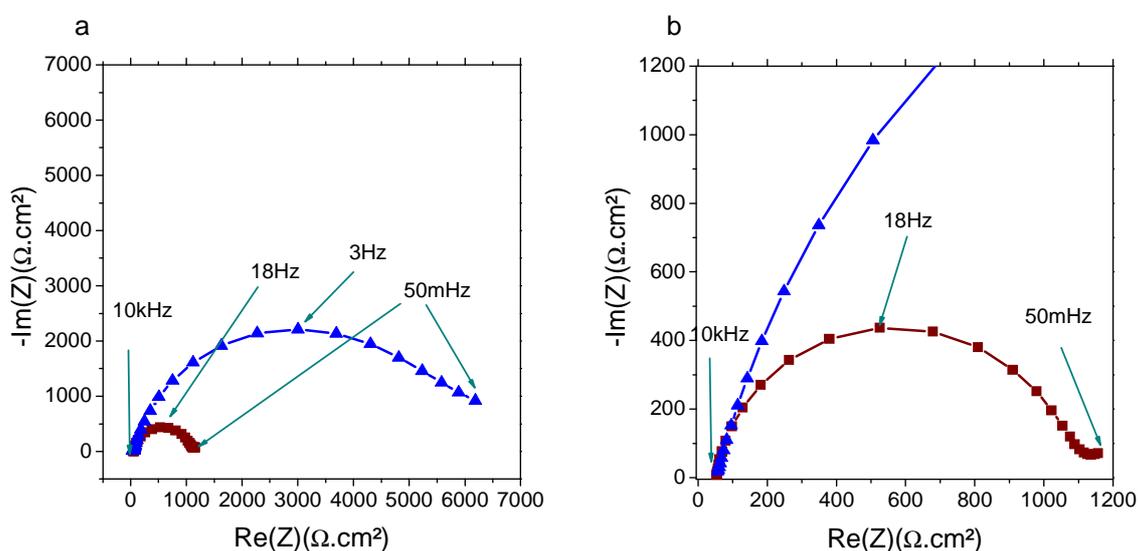
Le prétraitement dans KCl a permis d'améliorer la résolution des pics en divisant par deux l'écart entre les pics. Ceci laisse supposer que ce prétraitement dans KCl agit également

sur les dépôts P30 comme activation électrochimique de la même façon que pour les dépôts P15.

L'efficacité de ce prétraitement est également caractérisée en faisant des mesures en spectroscopie d'impédance électrochimique.

### III.2.6.2 Spectroscopie d'impédance électrochimique

De la même façon que pour les électrodes de CN<sub>x</sub> P15, les électrodes P30 sont caractérisées avant et après prétraitement dans KCl par spectroscopie d'impédance électrochimique au potentiel de circuit ouvert. La Figure III-40 montre les diagrammes d'impédance dans une représentation de Nyquist après et avant prétraitement.



**Figure III-40 : Diagramme de Nyquist d'une électrode de a-CN<sub>x</sub> ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) suivant le protocole P30 dans une solution de ferricyanure ferrocyanure de potassium  $10^{-2} \text{ M}$  dans  $0,5 \text{ M KCl}$  avant et après prétraitement a) Diagramme de Nyquist complet. b) Agrandissement de la fenêtre. ( $\Delta$ ) avant prétraitement ( $\square$ ) après prétraitement.**

Pour les électrodes P30 et P15, le diagramme de Nyquist présente une boucle pour les fréquences allant de 10 kHz à 50 mHz dans le cas avant prétraitement et de 10 kHz à 100 mHz après prétraitement. Après prétraitement un début de droite est observé pour les fréquences allant de 100 mHz à 50 mHz. Une diminution importante de la résistance de transfert de charge  $R_t$  est observée à l'aide de l'activation.

La valeur de  $\alpha$  est obtenue graphiquement en traçant  $\log(-\text{Im}(Z))$  en fonction de  $\log(\text{fréquence (Hz)})$  (Figure III-41). Ce diagramme nous permet de faire une première estimation de la valeur de  $\alpha$ , de l'ordre de 0,83 (avant prétraitement) et de 0,90 (après prétraitement). Cette valeur montre également un comportement non idéal de la capacité pour

les électrodes de CN<sub>x</sub> ayant subi le protocole P30. Une augmentation de valeur de  $\alpha$  est observée. On suppose que le prétraitement a pour effet de rendre la surface plus homogène.

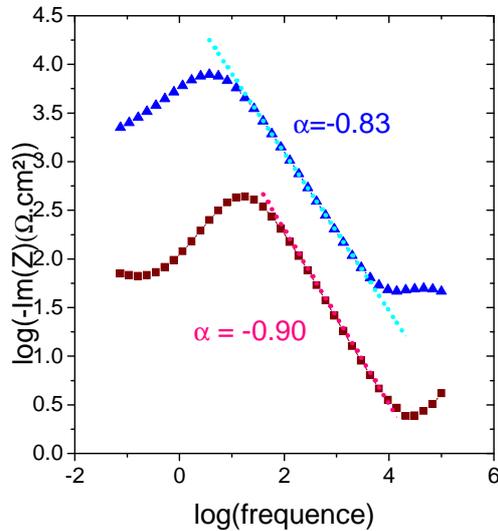


Figure III-41 : Représentation de  $\log(-\text{Im}(Z))=f(\log(\text{fréquence (Hz)}))$  pour une électrode de a-CN<sub>x</sub> suivant le protocole P30 pour une solution de ferricyanure ferrocyanure de potassium  $10^{-2}$  M dans 0,5 M KCl avant prétraitement ( $\Delta$ ). Après prétraitement dans KCl 0,5 M ( $\square$ ).

L'ajustement des paramètres avec le logiciel Simad avec le même circuit équivalent de la Figure III-27 : Circuit électrique équivalent de l'interface électrode a-CN<sub>x</sub>/solution électrolyte considérée en présence du couple redox ferricyanure/ferrocyanure.

donne les paramètres listés dans le Tableau III-25. L'ajustement des paramètres après prétraitement est réalisé pour trois électrodes.

		$R_{HF}$ ( $\Omega.cm^2$ )	$Q$ ( $F.s^{(\alpha-1)}.cm^{-2}$ )	$\alpha$	$R_t(\Omega.cm^2)$	$S_1$ ( $\Omega.s^{-1/2}.cm^2$ )	$\chi^2$
avant		52	$1,2.10^{-6}$	0,84	5640	1973	1,35
après	1	53	$1,5.10^{-5}$	0,90	1026	193	0,84
	2	42	$1,8.10^{-5}$	0,90	1234	140	0,58
	3	54	$2,1.10^{-5}$	0,88	1607	146	0,79
	moyenne	$53\pm 6$	$(1,7\pm 0,3)10^{-5}$	$0,89\pm 0,0$	$(1,3\pm 1)10^3$	$(1,6\pm 0,3)10^2$	-

Tableau III-25 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent déterminé à l'aide du logiciel Simad avant et après activation pour une électrode et après activation pour trois autres électrodes avec  $\sigma=0,01$ .

Une diminution par cinq de la résistance de transfert de charge est observée suite au prétraitement dans KCl 0,5 M. Les valeurs de  $\alpha$  et  $Q$  augmentent avec le prétraitement ce qui montre une homogénéisation de la surface lors du prétraitement.

Après prétraitement, les différentes électrodes présentent des valeurs relativement proches pour tous les paramètres déterminés avec le logiciel Simad. Il est à remarquer que nous obtenons une bonne reproductibilité pour les électrodes. La bonne concordance entre la simulation et l'expérience est illustrée par la Figure III-42:

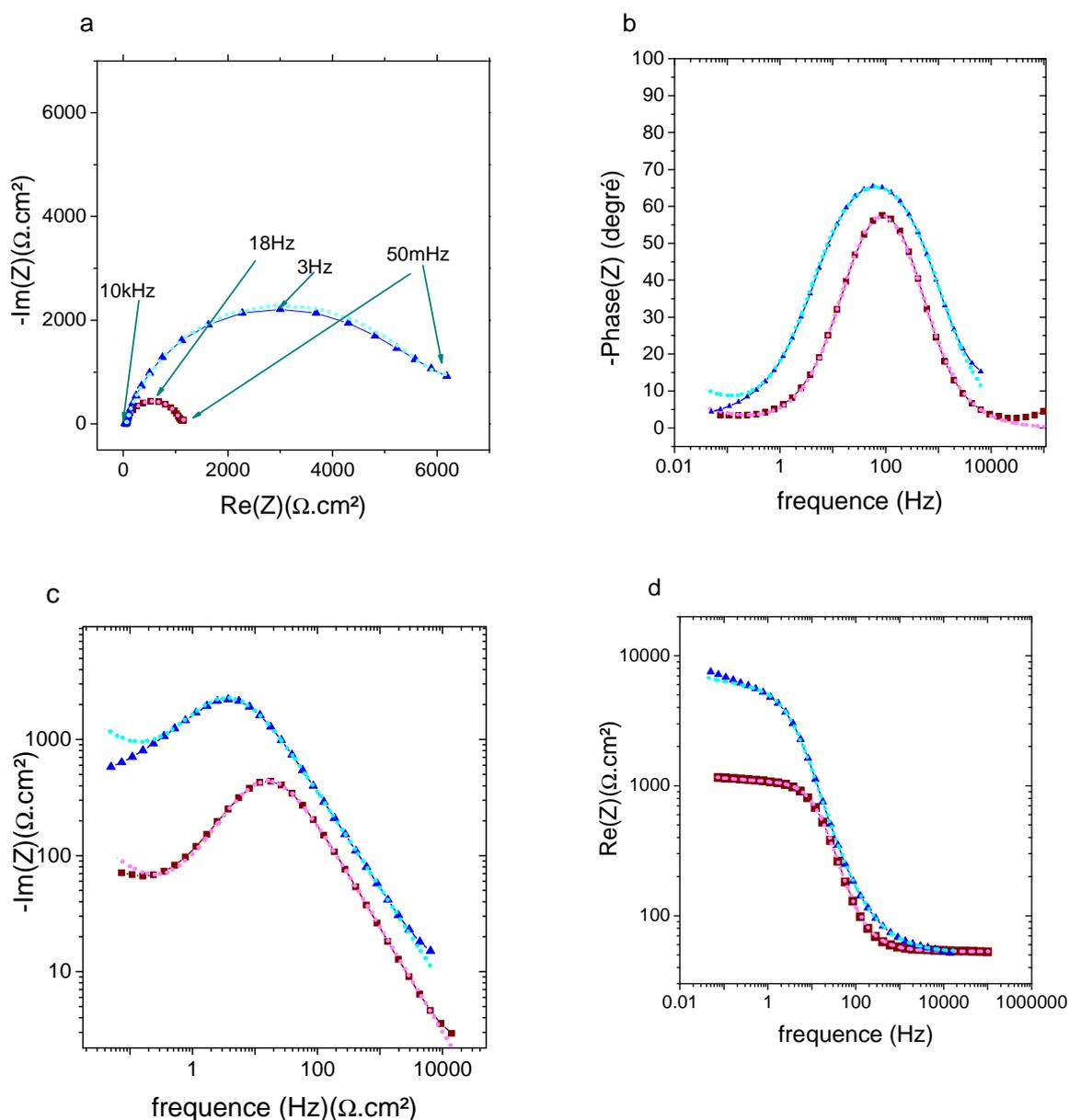


Figure III-42 : Comparaison des données de l'impédance expérimentale avant prétraitement ( $\Delta$ ), après prétraitement ( $\square$ ), expérimentale (—) et simulée (---) à l'aide du circuit équivalent de la Figure III-27 : Circuit électrique équivalent de l'interface électrode a-CN<sub>x</sub>/solution électrolyte considérée en présence du couple redox ferricyanure/ferrocyanure.

a) diagramme de Nyquist. b) phase en fonction de la fréquence. c) partie imaginaire en fonction de la fréquence. d) partie réelle en fonction de la fréquence.

Les valeurs de la capacité équivalente et de la constante de vitesse de transfert de charge sont calculées à l'aide des équations II-9 II-10 et II-18 (Tableau III-26).

	échantillons	C ( $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	$k_0 \cdot 10^{-5}(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
	avant	2,8	0,42
après	1	7,9	2,1
	2	8,1	1,7
	3	6,7	2,6
	moyenne	(7,6 $\pm$ 0,8)	(2,1 $\pm$ 0,5)

**Tableau III-26 : Valeurs de la capacité équivalente et de la constante de vitesse de transfert de charge hétérogène  $k_0$  avant et après prétraitement.**

Les valeurs de C et de  $k_0$  après prétraitement pour les 3 électrodes sont proches ce qui montre la bonne reproductibilité des films P30 après prétraitement dans KCl.

L'intérêt du prétraitement est confirmé par spectroscopie d'impédance électrochimique. En effet, la résistance de transfert de charge est diminuée d'un facteur 5 et par conséquent la constante de transfert de charge est multipliée par 5 suite au prétraitement. Cependant, dans les deux cas, les valeurs faibles de  $k_0$  traduisent un transfert moins rapide. L'activation a permis de multiplier les valeurs de capacité de double couche par environ 2,5. Cette augmentation peut être reliée à une augmentation de la surface active après activation [13].

### III.2.6.3 Comparaison entre CN<sub>x</sub> P15 et CN<sub>x</sub> P30

Les valeurs des résistances de transfert de charge, de la constante de transfert de charge  $k_0$ , de la capacité équivalente et de différence de potentiel,  $\Delta E_p$  en fonction du protocole sont répertoriées dans le Tableau III-27 pour les électrodes P15 et P30.

	activation	$R_t(\Omega \cdot \text{cm}^2)$	$C_d(\mu\text{F}/\text{cm}^2)$	$k_0 10^{-5}(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$	$\Delta E_p$ (mV)
P15	non	423	7,9	6,25	720
	oui	161	7,6	16,8	340
P30	non	5640	2,8	0,42	1500
	oui	1128	7,6	2,1	700

**Tableau III-27 : valeurs pour les dépôts de CN<sub>x</sub> P15 et P30 avant et après prétraitement**

Les électrodes P30 non prétraitées ont des résistances de transfert de charge plus de 13 fois supérieures aux électrodes P15 non prétraitées. De plus, les valeurs de  $k_0$  plus faibles pour les électrodes P30 montrent bien que les électrodes de CN<sub>x</sub> présentent une moins bonne réactivité électrochimique en comparaison aux électrodes P15. Cette faible réactivité est également confirmée par la valeur  $\Delta E_p$  qui est deux fois plus élevée pour les électrodes de P30 par rapport aux électrodes P15 dans le cas où les électrodes sont non prétraitées.

La différence de potentiel pour les électrodes P30 prétraitées est également 2 fois supérieure à celle des électrodes P15 dans le cas où un prétraitement électrochimique est réalisé. Les valeurs de capacité équivalente après prétraitement pour les électrodes P15 et P30 sont identiques. D'autre part, les valeurs des résistances de transfert de charge sont 7 fois plus grandes pour les électrodes P30 prétraitées par rapport aux électrodes P15 prétraitées.

De façon générale, même après prétraitement les électrodes P30 présentent une réactivité électrochimique moins bonne comparée à celle des électrodes P15 (prétraitées ou non). Les valeurs de  $k_0$  pour les électrodes P30 prétraitées sont 3 fois plus petites que la valeur de  $k_0$  pour les électrodes P15 non prétraitées et 8 fois plus petites que la valeur obtenue pour les électrodes P15 prétraitées.

### ***III.3. Conclusion***

Dans ce chapitre nous avons étudié des films minces de a-CN<sub>x</sub> déposés sur ITO par pulvérisation magnétron en courant continu (DC) avec différents pourcentages d'azote dans le gaz de pulvérisation (3, 7,15 et 30%). Les mesures XPS ont permis de déterminer la stoechiométrie des films a-CN<sub>0,12</sub>, a-CN<sub>0,18</sub>, a-CN<sub>0,26</sub>, a-CN<sub>0,30</sub> pour des P(N<sub>2</sub>) respectifs de 3, 7, 15 et 30%. Les mesures XPS ont également montré un rapport des liaisons C≡N sur les liaisons C=N variant selon la pression partielle d'azote dans le plasma. L'épaisseur et la rugosité varient de façon non linéaire en fonction du pourcentage atomique d'azote dans le film. Cette non linéarité confirme un mode d'insertion complexe de l'azote dans les films. De plus, les études en CS-AFM ont montré que la conductivité électrique dépend du pourcentage d'azote dans le film et en particulier des valeurs importantes de conductivité ont été obtenues pour de faibles taux d'azote. Les études CS-AFM ont également montré que la conductivité des dépôts CN<sub>x</sub> sur verre/ITO est beaucoup plus homogène que celle des substrats d'ITO nu.

D'autre part, les dépôts de CN<sub>x</sub> sur un substrat de verre/ITO n'altèrent pas la transparence initiale.

La caractérisation des films CN<sub>x</sub> sur ITO en solution a montré la mauvaise tenue mécanique des films principalement pour une faible pression partielle d'azote dans le gaz de pulvérisation (3 et 7%). La tenue mécanique des dépôts CN<sub>x</sub> sur ITO dans les solutions de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ne nous permet pas d'activer nos électrodes dans ces solutions. Un des paramètres important pour les électrodes de a-CN<sub>x</sub> est leur fenêtre de polarisabilité. Celle-ci est caractérisée dans des solutions de KCl et de LiClO<sub>4</sub> par voltammétrie cyclique, pour les électrodes ayant une bonne tenue mécanique en solution (P30 et P15). Les autres électrodes P3 et P7 ne possèdent pas une bonne résistance mécanique en solution à cause de leur faible taux d'azote. Cette fenêtre de polarisabilité est supérieure à 2,5V et est équivalente pour les deux types de protocoles (P15 et P30). Les caractérisations par SIE ont montré la présence d'un CPE dans le circuit équivalent de l'interface a-CN<sub>x</sub>/solution traduisant le caractère non idéal de cette capacité. Ceci est dû à la non homogénéité de la surface des dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur ITO. Les caractérisations par SIE en fonction du potentiel ont montré une dépendance de  $\alpha$ ,  $Q$ ,  $C_d$  et  $R_t$  en fonction du potentiel appliqué. Les valeurs de  $\alpha$  augmentent avec le potentiel, ce qui montre une homogénéisation de la surface. Les valeurs de  $R_t$  augmentent avec le potentiel puis restent relativement stables. Le tracé des courbes de Tafel a permis de conclure que la résistance de transfert de charge est liée à la réduction du dioxygène et de l'eau. La diminution des valeurs de  $R_t$  lorsque le potentiel se déplace vers les potentiels négatifs est causée par la réduction de ces deux espèces. Les valeurs de  $C_d$  diminuent jusqu'au potentiel d'environ -0,2V puis augmentent. Les valeurs moyennes de capacité de double couche augmentent avec la concentration en KCl, ce qui est conforme avec la théorie de la double couche. De plus, ces valeurs moyennes sont plus faibles pour les électrodes P30 ce qui est probablement dû à la conductivité inférieure des électrodes P30 par rapport aux électrodes P15. Dans un deuxième temps, la réactivité électrochimique a été caractérisée avec un traceur redox le ferricyanure/ferrocyanure de potassium. Les résultats par voltammétrie cyclique et par impédance ont montré que la réactivité des films diminue lorsque le pourcentage d'azote dans le gaz de pulvérisation augmente. De plus, la comparaison des valeurs des différents paramètres du circuit équivalent avant et après activations dans KCl a confirmé l'efficacité du prétraitement dans KCl. Une optimisation du prétraitement d'activation devrait être envisageable pour une amélioration de la cinétique de transfert de charge sur les substrats CN<sub>x</sub>/ITO.

La faisabilité de substrats verre/ITO/CN<sub>x</sub> en tant qu'électrodes pour une puce microfluidique tout en verre ou en verre/PDMS est rendue possible. Nos résultats ont permis, de retenir les dépôts avec un pourcentage d'azote de 15% comme matériau d'électrodes pour les puces microfluidiques dues à leurs meilleures réactivités et leurs bonnes tenues mécaniques. Les dépôts avec une pression partielle de 30 % dans le plasma plus résistifs servent d'interface « idéalement polarisables » pour moduler le flux électroosmotique dans les microcanaux. La charge de surface dans les microcanaux sera donc modulable en temps réel à l'aide des interfaces polarisables, ce qui permettra d'effectuer des analyses en puce microfluidiques en corrigeant en temps réel la résolution de celles-ci. La faible réactivité électrochimique et la large fenêtre de polarisabilité devraient être un avantage pour les matériaux à interfaces polarisables. En effet, la large fenêtre de polarisabilité permettra d'avoir accès à toute la gamme de flux électroosmotiques nécessaires à une bonne séparation. De plus, la longueur de contrôle sera maximale si le courant dans cette fenêtre est faible.

### III.4. Références

- [1] S. Méance, A. Plecis, S. Chebil, S. Korchane, I. Charhrouchni, and A. Pallandre, “Flow fiels effect transistor with polarisable interface for enhanced sample sorting in micro-tas,” *micro Tas*, pp. 596–598, 2012.
- [2] H. Cachet, C. Debiemme-Chouvy, D. Deslouis, A. Lagrini, and V. Vivier, “Correlation between electrochemical reactivity and surface chemistry of amorphous carbon nitride films,” *surface and interface analysis*, vol. 38, pp. 719–722, 2006.
- [3] A. Lagrini, C. Deslouis, H. Cachet, M. Benlahsen, and S. Charvet, “Elaboration and electrochemical characterization of nitrogenated amorphous carbon films,” *Electrochemistry Communications*, vol. 6, no. 3, pp. 245–248, 2004.
- [4] D. A. Shirley, “High-resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the valence Band of Gold,” *Physical Review B*, vol. 5, p. 4709, 1972.
- [5] J. H. Scofield, “Hartree-slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV,” *J.Electron. Spectro*, vol. 8, p. 129, 1976.
- [6] A. Lagrini, S. Charvet, M. Benlahsen, C. Debiemme-Chouvy, C. Deslouis, and H. Cachet, “Microstructure and electronic investigations of carbon nitride films deposited by RF magnetron sputtering,” *Thin Solid Films*, vol. 482, no. 1–2, pp. 41–44, 2005.
- [7] S. Jribi, “Réactivité électrochimique et fonctionnalisation de surface de films minces de nitrure de carbone amorphe: vers l’élaboration de sondes mixtes AFM-électrochimiques,” UPMC, 2012.
- [8] X. H. Zheng, J. P. Tu, and R. G. Song, “Microstructure and tribological behavior of pulsed laser deposited a-CN<sub>x</sub> films,” *Applied Surface Science*, vol. 256, no. 10, pp. 3211–3215, 2010.
- [9] M. L. Zhao, D. J. Li, M. X. Guo, Y. T. Zhang, H. Q. Gu, X. Y. Deng, R. X. Wan, and X. Sun, “The different N concentrations induced cytocompatibility and hemocompatibility of MWCNTs with CN<sub>x</sub> coatings,” *Surface and Coatings Technology*, 2012.
- [10] P. Hammer, N. M. Victoria, and F. Alvarez, “Effects of increasing nitrogen concentration on the structure of carbon nitride films deposited by ion beam assisted deposition,” *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 18, no. 5, p. 2277, 2000.
- [11] E. Ech-Chamikh, A. Essafti, Y. Ijdiyaou, and M. Azizan, “XPS study of amorphous carbon nitride (a-C:N) thin films deposited by reactive RF sputtering,” *Solar Energy Materials & Solar Cells*, vol. 90, pp. 1420–1423, 2006.
- [12] B. Bouchet-Fabre, G. Lazar, D. Ballutaud, C. Godet, and K. Zellama, “Influence on the sp<sup>3</sup>/sp<sup>2</sup> character of the carbon on the insertion of nitrogen in RFMS carbon nitride films,” *Diamond and Related Materials*, vol. 17, no. 4–5, pp. 700–704, 2008.

- [13] A. Lagrini, “Elaboration et caractérisations physico-chimiques de couches minces de carbone amorphe azoté a-CN<sub>x</sub> pour applications électrochimiques,” UPMC, 2005.
- [14] N. E. Derradji, M. L. Mahdjoubi, H. Belkhir, N. Mumumbila, B. Angleraud, and P. Y. Tessier, “Nitrogen effect on the electrical properties of CN<sub>x</sub> thin films deposited by reactive magnetron sputtering,” *Thin Solid Films*, vol. 482, no. 1–2, pp. 258–263, 2005.
- [15] F. Alibart, O. D. Drouhin, M. Benlahsen, S. Muhl, S. E. Rodil, E. Camps, and L. Escobar-Alarcon, “Comparison and semiconductor properties of nitrogen doped carbon thin films grown by different techniques,” *Applied Surface Science*, vol. 254, no. 17, pp. 5564–5568, Jun. 2008.
- [16] T. Fu, Y. Zheng, and Y. G. Shen, “Interface structure of sputter deposited CN<sub>x</sub> film on silicon substrate,” *Materials Letters*, vol. 62, no. 17–18, pp. 2685–2687, Jun. 2008.
- [17] W. Frammelsberger, G. Benstetter, J. Kiely, and R. Stamp, “C-AFM-based thickness determination of thin and ultra-thin SiO<sub>2</sub> films by use of different conductive-coated probe tips,” *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 3615–3626, 2007.
- [18] D. Guo, S. Hou, G. Zhang, and Z. Xue, “Conductance fluctuation and degeneracy in nanocontact between a conductive AFM tip and a granular surface under small-load conditions,” *Applied Surface Science*, vol. 252, pp. 5149–5157, 2006.
- [19] F. Houzé, R. Meyer, O. Schneegans, L. Boyer, R. Meyer, O. Schneegans, and L. Boyer, “Imaging the local electrical properties of metal surfaces by atomic force microscopy with conducting probes Imaging the local electrical properties of metal surfaces by atomic force microscopy with conducting probes,” *Appl.Phys.letter*, vol. 69, pp. 1–4, 1996.
- [20] Y. H. Cheng, B. K. Tay, S. P. Lau, X. L. Qiao, J. G. Chen, Z. H. Sun, and C. S. Xie, “Micromechanical properties of carbon nitride films deposited by radio-frequency-assisted filtered cathodic vacuum arc,” *Applied Physics A*, vol. 380, pp. 375–380, 2002.
- [21] S. Chowdhury, M. T. Laugier, and I. Z. Rahman, “Measurement of the mechanical properties of carbon nitride thin films from the nanoindentation loading curve,” *Diamond and Related Materials*, vol. 13, pp. 1543–1548, 2004.
- [22] Y. H. Cheng, B. K. Tay, S. P. Lau, and X. Shi, “Synthesis of superhard and elastic carbon nitride films by filtered cathodic vacuum arc combined with radio frequency ion beam source,” *J. Mater.REs*, vol. 17, pp. 521–524, 2002.
- [23] F. Demichelis, X. F. Rong, S. Schreiter, and A. Tagliaferro, “Deposition and characterization of amorphous carbon nitride thin films,” *Diamond and Related Materials*, vol. 4, pp. 361–365, 1995.
- [24] Y. Pauleau, N. Péter, and P. B. Barna, *Protective coatings and thin films: synthesis, characterization and application*, Springer. 1997, p. 215.
- [25] R. A. Serway, *Principles of Physics 2nd edition*. Fort Worth, Texas; London: Saunders College Pub, 1998, p. 602.

- [26] F. Demichelis and A. Tagliaferro, “Diamond-like properties of amorphous carbon and hydrogenated amorphous carbon thin films,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 47, pp. 218–223, 1991.
- [27] P. Hammer, A. Helmbold, K. C. Rohwer, D. Meissner, and W.-H. I. F. R. G, “Electrical characterization of plasma-deposited hydrogenated amorphous carbon films,” *Material s Science and Engineering*, vol. 139, pp. 334–338, 1991.
- [28] A. Helmbold, P. Hammer, H. J. . Thiele, K. Rohwer, and D. Meissner, “Electrical conductivity of amorphous hydrogenated carbon,” *Philosophical Magazine B*, vol. 72, no. 3, pp. 335–350, 1995.
- [29] C. Godet, N. M. J. Conway, J. E. Bourée, K. Bouamra, a. Grosman, and C. Ortega, “Structural and electronic properties of electron cyclotron resonance plasma deposited hydrogenated amorphous carbon and carbon nitride films,” *Journal of Applied Physics*, vol. 91, no. 7, p. 4154, 2002.
- [30] M. Guerino, A. P. Mousinho, M. Massi, and R. D. Mansano, “Electrical Conduction Mechanisms of Nitrogenated Amorphous Carbon Films Deposited by High-Density Plasma Chemical Vapor Deposition,” *Plasma Processes and Polymers*, vol. 2, no. 6, pp. 454–457, Jul. 2005.
- [31] D. C. Cameron, “Optical and electronic properties of carbon nitride,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 169–170, pp. 245–250, Jun. 2003.
- [32] G. Lazar, B. Bouchet-Fabre, K. Zellama, M. Clin, D. Ballutaud, and C. Godet, “Structural properties of nitrogenated amorphous carbon films: Influence of deposition temperature and radiofrequency discharge power,” *Journal of Applied Physics*, vol. 104, no. 7, p. 073534-1-073534-14, 2008.
- [33] E. L. Prociów and T. Chodzinski, “Study of electrical and optical properties of CN<sub>x</sub> thin films deposited by reactive magnetron sputtering,” *Microelectronics Reliability*, vol. 51, no. 7, pp. 1207–1212, Jul. 2011.
- [34] T. El Moustafid, H. Cachet, B. Tribollet, and D. Festy, “Modified transparent SnO<sub>2</sub> electrodes as efficient and stable cathodes for oxygen reduction,” *Electrochimica Acta* vol. 47, pp. 1209–1215, 2002.
- [35] J. Gilvarry, a. K. M. S. Chowdhury, M. Monclus, D. C. Cameron, P. J. McNally, and T. Tuomi, “Stress behaviour of reactively sputtered nitrogenated carbon films,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 98, no. 1–3, pp. 985–990, Jan. 1998.
- [36] A. Plecis, J. Tazid, A. Pallandre, P. Martinhon, D. Deslouis, Y. Chen, and A. Haghiri-Gosnet, “Flow field effect transistors with polarisable interface for FEO tunable microfluidic separation devices,” *Lab on chip*, vol. 10, pp. 1245–1253, 2010.
- [37] P. Tamiasso-Martinon, H. Cachet, C. Debiemme-Chouvy, and C. Deslouis, “Thin films of amorphous nitrogenated carbon a-CN<sub>x</sub>: Electron transfer and surface reactivity,” *Electrochimica Acta*, vol. 53, no. 19, pp. 5752–5759, Aug. 2008.

- [38] G. Adamopoulos, C. Godet, C. Deslouis, H. Cachet, a. Lagrini, and B. Saidani, “The electrochemical reactivity of amorphous hydrogenated carbon nitrides for varying nitrogen contents: the role of the substrate,” *Diamond and Related Materials*, vol. 12, no. 3–7, pp. 613–617, Mar. 2003.
- [39] A. Benchikh, C. Debiemme-Chouvy, H. Cachet, A. Pailleret, B. Saidani, L. Beaunier, M. H. Berger, and C. Deslouis, “Influence of electrochemical pre-treatment on highly reactive carbon nitride thin films deposited on stainless steel for electrochemical applications,” *Electrochimica Acta*, vol. 75, pp. 131–138, Jul. 2012.
- [40] J. Newman, *Electrochemical Systems*. principle-Hall Inc, 1973, p. 344.
- [41] G. . Brug, A. L. . Van Den Eeden, and M. S. J. . Sluyters-Rehbach, “The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element,” *J.Electroanal Chem*, vol. 176, pp. 275–295, 1984.
- [42] M. D. Osborne, B. J. Seddon, R. A. W. Dryfe, G. Lager, U. Loyal, H. Schifer, and H. H. Girault, “Excimer laser-induced electrochemical activity in carbon ink films,” *Journal of Elec*, vol. 417, pp. 5–15, 1996.
- [43] M. E. Orazem, N. Pébère, and B. Tribollet, “Enhanced Graphical Representation of Electrochemical Impedance Data,” *Jouranl of the Electrochemical Society*, vol. 153, no. 4, pp. 129–136, 2006.



# Chapitre IV

## Détection du peptide TTR en macrosystème

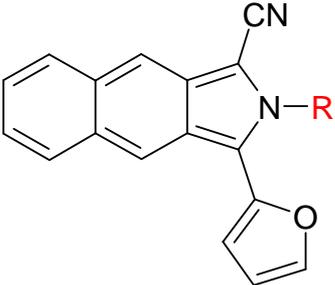
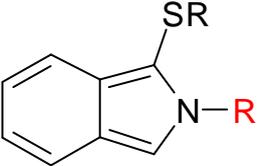
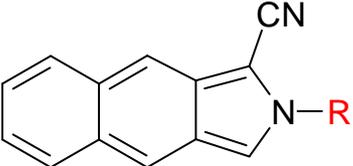
---

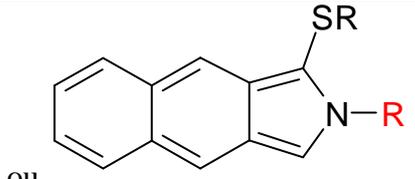
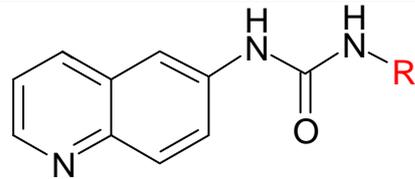
<b>IV.1.</b>	<b>Marquage d'acides aminés ou de peptides.</b>	<b>147</b>
<b>IV.2.</b>	<b>Etude électrochimique du marqueur NDA</b>	<b>152</b>
IV.2.1.	Etude du mécanisme de réduction par voltammétrie cyclique.	156
IV.2.1.1	Etude en fonction de la vitesse de balayage et de la concentration totale en NDA	156
IV.2.1.2	Etude du NDA en milieu organique	160
IV.2.1.3	Etude en fonction du pH	162
IV.2.1.3.1	Echelle de pH dans un mélange eau/MeOH	162
IV.2.1.3.2	Etude des densités de courant de pic en fonction du pH	163
IV.2.1.4	Schéma réactionnel du NDA	168
IV.2.2.	Détermination des concentrations de chaque forme	169
IV.2.2.1	Détermination de la concentration en comparant les intensités en voltammétrie cyclique	169
IV.2.2.2	Détermination des coefficients de diffusion	174
IV.2.2.3	Détermination de la concentration en utilisant les coefficients de diffusion.	177
IV.2.3.	Détermination des constantes d'équilibre	180
IV.2.4.	Etude en fonction du temps	182
<b>IV.3.</b>	<b>Dérivation du peptide et des acides aminés</b>	<b>185</b>
IV.3.3.	Sur carbone vitreux	185
IV.3.3.1	Comparaison avec différents acides aminés (AA)	185
IV.3.3.2	Comparaison des différents protocoles de marquage	187
IV.3.3.3	Comparaison avec différents acides aminés.	189
IV.3.3.4	Temps de dérivation.	191
IV.3.3.5	Stabilité de la détection	193
IV.3.3.6	Variation de la vitesse de balayage- Détermination du nombre d'électrons échangé.	195
IV.3.3.7	Confirmation de la double dérivation par spectrométrie de masse.	196
IV.3.3.8	Limite de détection	197
IV.3.4.	Sur CNx 15 % déposé sur ITO	199
IV.3.4.1	Comparaison avec différents AA par DPV avant et après activation dans KCl 0,5M	199
IV.3.4.1.1	CNx sans activation électrochimique	200
IV.3.4.1.2	CNx avec activation électrochimique	201
IV.3.4.1.3	Comparaison sur carbone vitreux et sur a-CNx avec et sans activation	203
IV.3.4.2	Comparaison entre différents acides aminés par Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) après activation du CNx	206
IV.3.5.	Détection en système 2 électrodes	210
IV.3.5.1	Avec traceur redox ferricyanure/ferrocyanure	210
IV.3.5.1.1	Electrode de travail en carbone	211
IV.3.5.1.2	Electrode de travail en platine	213
IV.3.5.2	Sans traceur redox	214
IV.3.5.2.1	Electrode de travail en carbone	215
IV.3.5.2.2	Electrode de travail en platine	216
<b>IV.4.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>217</b>
<b>IV.5.</b>	<b>Références</b>	<b>220</b>



### V.1. Marquage d'acides aminés ou de peptides.

La plupart des peptides ou des acides aminés n'étant ni électroactifs, ni fluorescents, l'utilisation d'agent dérivatif est nécessaire pour une détection indirecte. Les acides aminés ou les peptides sont pour la plupart dérivés à partir de leur groupement amine. Différentes molécules de marquage existent, comme le 3-(2-furoyl) quinoline-2-carboxyaldéhyde (FQ), l'orthophthalaldéhyde (OPA), le naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA), le 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) et l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le NDA, l'OPA et le FQ sont des composés fluorogènes. C'est-à-dire qu'ils ne sont pas naturellement fluorescents, mais qu'ils forment une molécule dérivée fluorescente. Le Tableau IV-1 suivant répertorie quelques marqueurs pour les groupements R-NH<sub>2</sub>.

Nom (abréviation)	Formule développée de la molécule dérivée	Détection	Dérivation fonction secondaire
3-(2-furoyl) quinoline-2-carboxyaldéhyde (FQ) C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>		fluorescence	Non
Orthophthalaldéhyde (OPA) C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	 N-substituant-thiolisoindole	fluorescence électrochimie	Non
naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA). C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	 Cyanobenzo[substituant]isoindole	fluorescence électrochimie  fluorescence	Non  Non

	 <p>ou</p> <p>N-substituant-1-alkylthiolben[f]isoindole</p>	électrochimie	
<p>6-aminoquinolyl-<i>N</i>-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)</p> <p><math>C_{14}H_{13}N_4O_5</math></p>	 <p>6-quinolenylaminocarbonyl-amine</p>	<p>fluorescence</p> <p>électrochimie</p>	Oui

**Tableau IV-1 : Différents marqueurs pour les groupements R-NH<sub>2</sub>.**

Plusieurs techniques de marquage existent : pré-colonne, en-colonne, post-colonne. Dans le cas de la dérivation pré-colonne, l'étape de marquage est effectuée avant l'injection de la solution dans la colonne. Si l'étape de dérivation a lieu après l'étape de séparation, on parle de marquage post-colonne. Dans la plupart des analyses de biomolécules, le marqueur est injecté dans le canal de séparation, l'analyse est alors plutôt une analyse en-colonne. Les méthodes en-colonne et post-colonne nécessitent une réaction rapide, de l'ordre de la seconde, entre le marqueur et la molécule à marquer. La stabilité à long terme de la dérivation n'est pas nécessaire. Il est à noter que la durée de la réaction de dérivation n'est pas limitée en pré-colonne, mais que celle-ci doit être stable.

Le 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) est un marqueur dont l'emploi est simple, les dérivés sont très stables et ont une forte intensité de fluorescence. En effet, des tests de stabilité ont été réalisés pour la dérivation de polyamines et ont montré une bonne stabilité de la réponse en fluorescence des dérivés. L'AQC a été utilisé initialement comme agent dérivatif fluorescent pour la détection d'acides aminés par Cohen *et al.* [1]. Contrairement aux trois autres agents dérivatifs, l'AQC réagit avec les amines primaires et secondaires [2],[3]. Il a également été montré que le produit de dérivation est électroactif grâce au groupement aromatique aminoquinoline [4]. La dérivation d'acides aminés et de peptides a été étudiée, un pic d'oxydation irréversible apparaît autour de +1,2 V/(Ag/AgCl). Les études en fonction du pH ne montrent aucune variation vis-à-vis du potentiel de pic. D'autre part, la dérivation d'acides aminés électroactifs montre un pic plus large dû à une

oxydation sur les deux sites. Dans cette étude, la limite de détection d'acides aminés a été mesurée à 2,5 pM.

L'OPA est une molécule couramment utilisée pour la dérivation d'amine primaire en présence de groupement thiol [5–9]. Plusieurs mécanismes de formation du dérivé formé ont été proposés [10]. Cependant le marquage avec l'OPA présente certains inconvénients. En effet, le marquage permet de dériver des acides aminés mais pas des peptides [11], et la molécule isoindole formée peut s'oxyder à l'air en milieu aqueux pour former 4 nouveaux composés [12].

Montigny *et al.* ont testé différents nucléophiles ( $\text{N}_3^-$ ,  $\text{NCS}^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$  et  $\text{CN}^-$ ) afin d'augmenter la stabilité des molécules formées pour la dérivation de l'alanine [13]. Ces nucléophiles ont été choisis pour leur caractère désactivant. En effet, la réactivité du cycle aromatique vis-à-vis de la substitution nucléophile diminue en leur présence. Dans l'étude de Montigny *et al.*, seules les dérivations utilisant  $\text{HSO}_3^-$  et  $\text{CN}^-$  comme nucléophiles ont donné des molécules fluorescentes. Cependant, bien que les composés formés avec le cyanure soient plus stables, l'intensité de fluorescence est moins importante comparée au 2-mercaptoethanol (2-ME) couramment utilisé [13].

Le naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA) a été synthétisé pour pallier différents problèmes liés à l'utilisation de l'OPA comme agent dérivatif. Dans un premier temps, la molécule de NDA a été synthétisée à partir du 2,3-diméthyl-naphtalène. Cependant, ce composé n'étant plus commercialisé, un autre précurseur a été développé par Carlson *et al.* [14]. Dans une première étape, le  $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -tetrabromo-o-oxylène et l'acide maléique anhydre réagissent grâce à une réaction de Diels Alder pour former l'acide naphthalène-2,3-dicarboxylique. Deux réductions en présence de tétrahydroaluminure de lithium permettent d'obtenir le 2-3 bis(hydroxyméthyl-naphtalène). Une dernière étape correspondant à une oxydation de Swern dans du DMSO, du chlorure oxalique, et du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  permet d'obtenir le NDA. Le Schéma IV-1 récapitule les différentes étapes de synthèse du NDA.

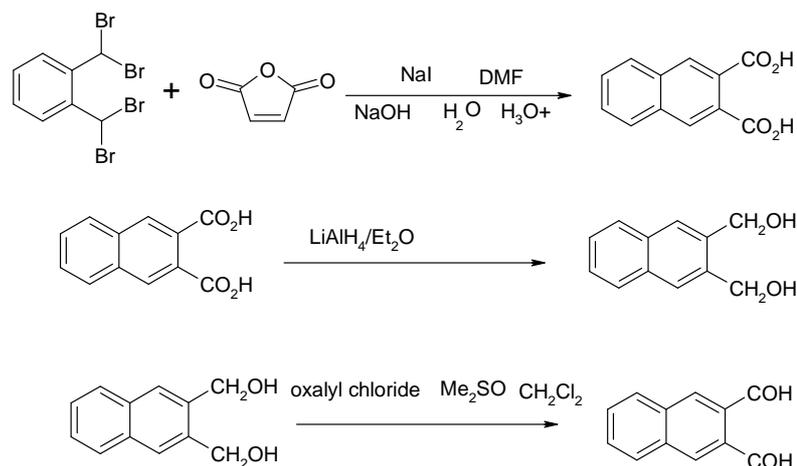


Schéma IV-1 : Synthèse du NDA à partir de l'acide maléique et de l'  $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -tetrabromo-o-oxylène [14].

Le NDA réagit avec les groupements  $R-NH_2$  en présence de cyanure ou de groupement  $R-SH$ . En utilisant le cyanure comme nucléophile, il se forme alors un composé N-2-substituant-1-cyanobenz-[f]-isoindole (CBI) qui est fluorescent et électroactif. Le Schéma IV-2 montre la réaction de formation du CBI en présence de NDA et d'ion cyanure comme nucléophile.

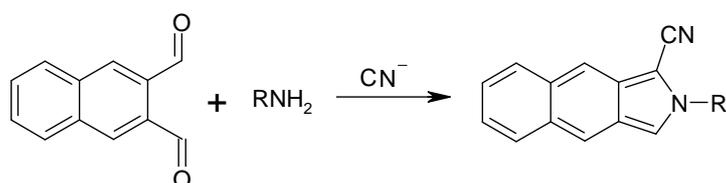


Schéma IV-2 : Réaction du NDA avec un groupement  $RNH_2$  en présence de cyanure [14].

Carlson *et al.* ont donné une hypothèse de mécanisme de formation du CBI, avec dans une première étape, la réaction avec le groupement  $R-NH_2$  puis l'addition du cyanure et enfin la perte d'un groupement  $H_2O$  (Schéma IV-3) [14].

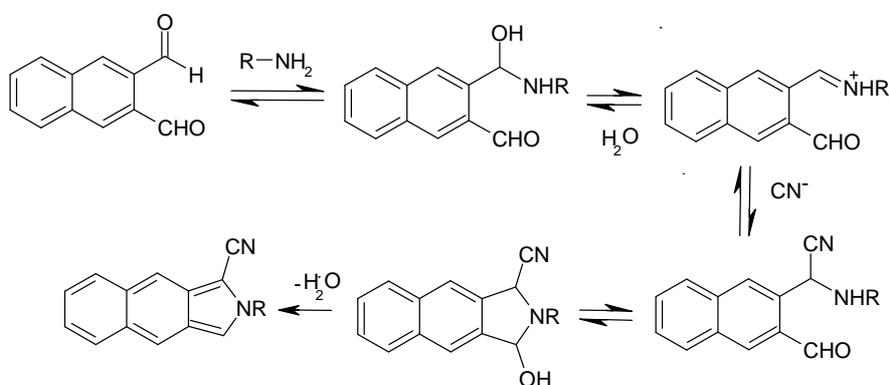


Schéma IV-3 : Réaction de formation du CBI, d'après [14].

Les composés isoindoles issus de la dérivation de biomolécules avec le NDA ou l'OPA présentent une stabilité différente. En effet, les produits de dérivation avec l'OPA sont peu stables. Pour exemple, les dérivés de la glycine avec l'OPA sont rapidement dégradés ( $t_{1/2} = 1,5\text{h}$ ) tandis que seulement 10% des composés dérivés avec le NDA ont disparu après 10 h. De plus, l'excès d'OPA accélère la dégradation du composé de dérivé, ce qui n'est pas le cas avec le NDA [13]. D'autre part, l'utilisation du NDA comme agent dérivatif permet d'augmenter la limite de détection en fluorescence. C'est le groupement isoindole formé lors de la dérivation qui donne l'activité électrochimique du composé.

La détection par fluorescence de peptides ou d'acides aminés possédant deux groupements  $\text{RNH}_2$  peut être difficile à cause « self-quenching ». Cette atténuation de la fluorescence est causée par un processus de relaxation intramoléculaire qui résulte des interactions hydrophobes des deux groupements cycliques isoindoles formés par la dérivation dans les solutions aqueuses [13],[15],[16]. Cependant ce « quenching » de fluorescence n'est pas observé pour les dérivés obtenues avec le 2-mercaptoéthanol (2-ME) [17]. Les dérivés avec le 2-ME possèdent également l'avantage d'avoir un temps de dérivation plus court que les ceux obtenus à partir de cyanure. Les dérivés utilisant le 2-ME comme nucléophile sont cependant moins stables que ceux utilisant le cyanure. Le 2-ME étant un meilleur groupement partant [13],[18],[19].

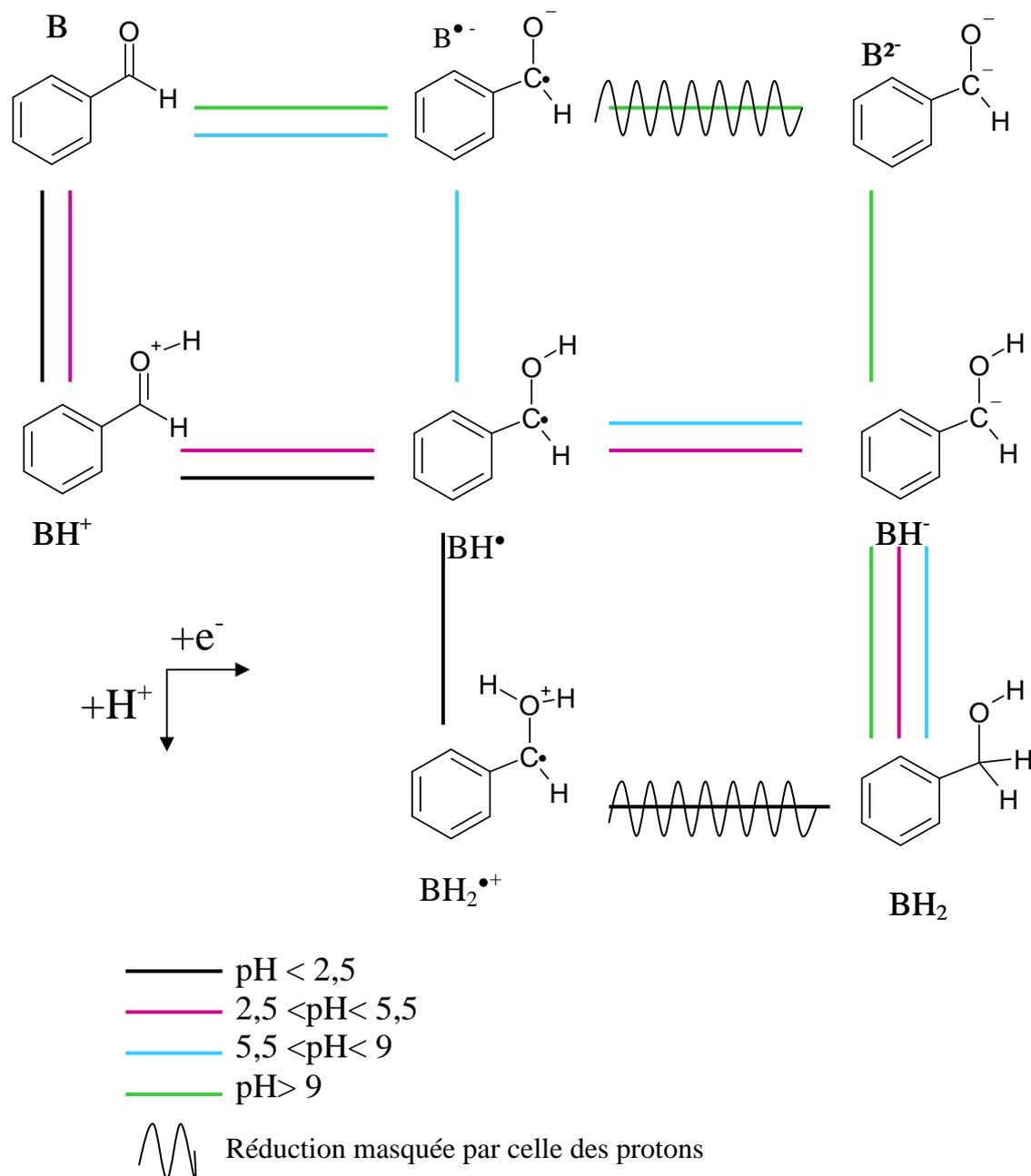
La détection électrochimique d'acides aminés (AA) ou de peptides après dérivation avec le NDA est couramment utilisée. Cette détection peut être couplée avec différentes techniques de séparation, comme la chromatographie liquide en colonne capillaire pour analyser les acides aminés [20] [15]. Oates *et al.* ont séparé par chromatographie liquide 18 AA en 50 minutes avec une limite de détection de  $5 \cdot 10^{-9}$  M [20]. Ce même groupe a analysé par chronoampérométrie 17 acides aminés avec également une limite de détection de  $5 \cdot 10^{-9}$  M [15]. L'électrophorèse en zone capillaire a également été couplée à la détection électrochimique pour la détection d'acides aminés avec une limite de détection allant du femtomole à l'atomole selon les acides aminés [21],[22]. Le marquage peut également s'effectuer directement dans une cellule biologique [23]. Les AA dérivés présents dans la cellule sont alors séparés et détectés par ampérométrie [24]. La détection et la séparation d'acides aminés et de petits peptides peuvent aussi être réalisées en microsystème avec une limite de détection inférieure au micromolaire[25].

Comme expliqué précédemment le NDA a été choisi pour mener une étude comparative du marquage et de la détection d'un peptide de la TTR (PN) dans le cadre de

l'ANR DIMIPOLE en collaboration avec le LPNSS où le peptide est étudié par fluorescence. En effet, le NDA a l'avantage de conduire à un dérivé stable et détectable par électrochimie et par fluorescence.

## ***V.2. Etude électrochimique du marqueur NDA***

Les premiers travaux en électrochimie des composés aldéhydiques remontent à la réduction polarographique du benzaldéhyde. La réduction du groupement aldéhyde est un mécanisme à deux électrons et deux protons [26]. Le mécanisme de réduction du groupement aldéhyde à l'électrode ( $H^+ \rightarrow e^- \rightarrow H^+ \rightarrow e^-$ ,  $H^+ \rightarrow e^- \rightarrow e^- \rightarrow H^+ \rightarrow e^-$ ,  $e^- \rightarrow H^+ \rightarrow e^- \rightarrow H^+$  ou  $e^- \rightarrow e^- \rightarrow H^+ \rightarrow H^+$ ) et dépend donc du pH. Ces mécanismes ont été mis en évidence par l'étude de la variation des potentiels de demi vagues en fonction du pH. Le chemin suivi dépend du pH de la solution comme le montre la Schéma IV-4 ci-dessous :



**Schéma IV-4: Réduction du benzaldéhyde en milieu tampon (acétate, borate ou phosphate) à 0,04mol/L [26].**

Dans le cas où le pH < 2,5, la solution acide possède une quantité non négligeable de  $BH^+$ . Dans ce cas, une vague à un électron est observée correspondant à la réduction de  $BH^+$  pour former  $BH^\bullet$ . Celui-ci est susceptible d'être protonné pour donner le composé  $BH_2^{\bullet+}$ . La réduction de ce composé est masquée par celle des protons. Si le pH est compris entre pH = 2,5 et pH = 5,5, deux vagues de réduction sont observées. La première vague correspond au même mécanisme que lorsque le pH < 2,5. En effet, la concentration en  $H^+$  est encore assez élevée pour former le cation  $BH^+$  en quantité suffisante. Le composé  $BH^\bullet$  formé se réduit de nouveau pour former le composé  $BH^-$  qui devient  $BH_2$  après protonation. Cette deuxième

réduction est irréversible. Lorsque le pH est compris entre 5,5 et 9, une seule vague à deux électrons est observée. Celle-ci est due à la réduction de B et de  $BH^\bullet$ . Puis lorsque le pH est supérieur à 9, la vague a une intensité qui diminue puis elle se scinde en deux. La première vague correspond à la réduction de B en  $B^{\bullet-}$  et la seconde correspond à la réduction de l'anion  $B^{\bullet-}$  en  $B^{2-}$ . Cette dernière réduction peut également être masquée par la réduction des protons. Il y a alors protonation du dianion pour former  $BH_2$ .

Dans le cas du NDA, l'hydratation des deux groupements aldéhydes ne peut pas être négligée en milieux aqueux. Un groupement aldéhyde du dialdéhyde va s'hydrater pour former une espèce monohydratée acyclique qui est elle-même en équilibre avec la forme hémiacétale cyclique (Figure IV-1). La forme hémiacétale cyclique n'est en principe pas électroactive dans les gammes de potentiels utilisées [26].

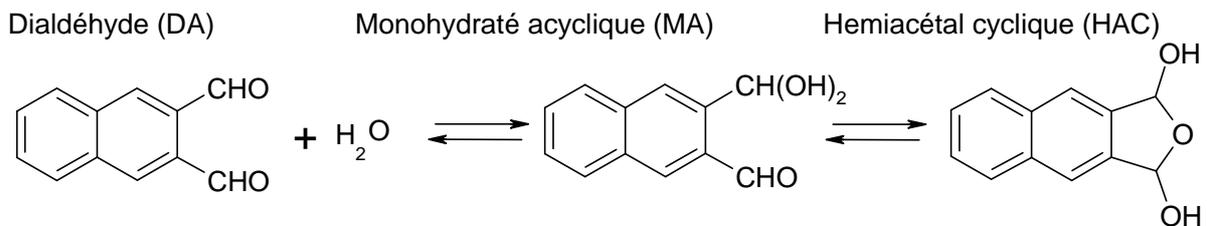


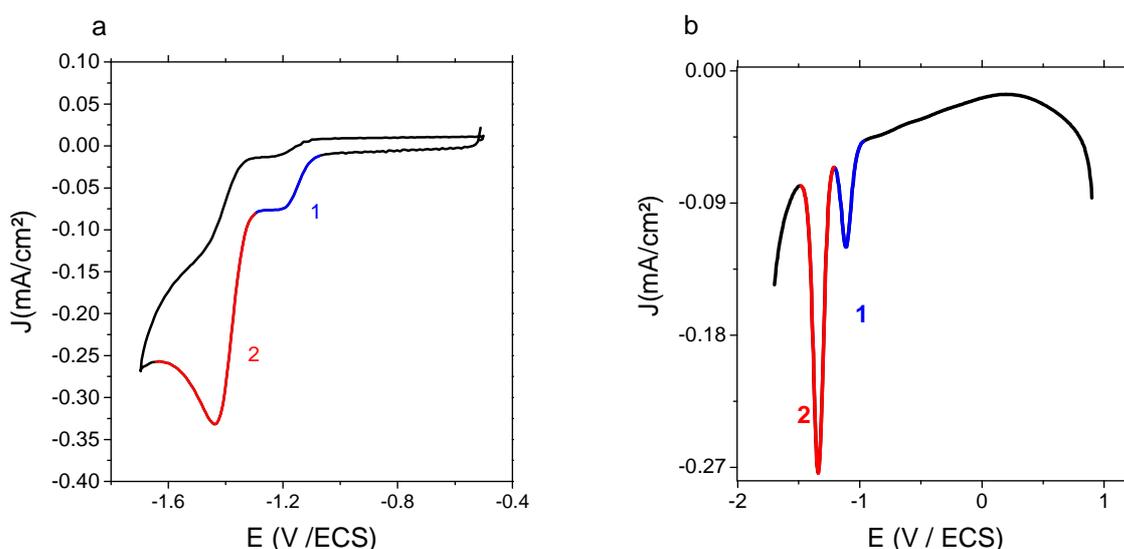
Figure IV-1 : Schéma d'hydratation et équilibre entre les formes du NDA en solution aqueuse.

Zuman *et al.* ont étudié la réduction de l'OPA par polarographie et par voltammétrie cyclique sur carbone vitreux. L'étude par polarographie a été réalisée dans un milieu aqueux en présence de 1% et de 30% d'acétonitrile pour solubiliser l'OPA. Cette étude a montré une différence notable de réponse du NDA en fonction du milieu (potentiel de pic, densité de courant). De plus, la comparaison des résultats obtenus sur goutte de mercure et sur carbone vitreux présente également des différences. Dans cette étude, le mécanisme de réduction a été établi à deux électrons et deux protons. Le même mécanisme a généralement été admis pour le NDA [27], [28].

Le milieu aqueux, considéré dans ce travail de thèse, est constitué de tampon borate 100 mM/MeOH dans une future application en puce microfluidique pour une séparation par électrophorèse capillaire en collaboration avec le LPNSS. En effet, le méthanol permet de solubiliser le NDA. Les conditions de séparation électrophorétiques ont été optimisées dans la thèse (en cours) de M<sup>me</sup> Sonia Korchane dans le cadre de l'ANR DIMIPOLE. Le milieu est constitué d'un tampon borate dans un mélange eau/MeOH 50/50 (v/v) tandis que dans les

analyses de Zuman *et al.* le milieu était constitué d'un mélange eau/acétonitrile avec 1% ou 30% d'acétonitrile. Les conditions étant différentes, la caractérisation électrochimique du NDA est nécessaire dans un tel milieu. Les techniques utilisées pour cela sont : la voltammétrie cyclique (VC) et la voltammétrie différentielle pulsée (DPV) dans le but d'étudier le mécanisme de réduction. Pour déterminer le type de réactions mises en jeu, le potentiel et la densité de courant des pics ont été étudiés en fonction de la vitesse de balayage, et de la concentration globale en NDA.

Nos résultats dans un milieu tampon borate 100 mM /MeOH (50/50 v/v) montrent que le NDA présente deux vagues de réductions irréversibles chimiquement en VC. A pH 9, les deux vagues de réduction se situent respectivement à environ -1,1 V/ECS et -1,4 V/ECS pour une vitesse de balayage de 100 mV/s (Figure IV-2). La réponse électrochimique en DPV est donnée à titre indicatif (le potentiel du premier pic est égal à -1,11 V/ECS et celui du deuxième pic est égal à -1,34 V/ECS) pour une vitesse de balayage de 25 mV/s. Nous reviendrons ultérieurement sur les avantages de cette technique électrochimique



**Figure IV-2 :** a) Voltammétrie cyclique à 100 mV/s du NDA à 1 mM en milieu tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH 50/50 v/v sur une électrode de carbone vitreux,  $S = 0,071 \text{ cm}^2$ . b) DPV à 25 mV/s du NDA à 1 mM en milieu tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH 50/50 v/v sur une électrode de carbone vitreux,  $S = 0,071 \text{ cm}^2$ .

Les vagues en VC sont dues aux réactions de réduction des fonctions aldéhydes : réductions supposées à deux protons et deux électrons. Si on se base sur la littérature, le premier pic serait dû à la réduction d'un groupement aldéhyde du dialdéhyde [27]. Dans un premier temps, on considère que les équilibres sont figés. Cette hypothèse sera vérifiée dans

le chapitre IV.2.4. D'autre part, le rapport des densités de courant des pics 1 et 2 ( $J_{\text{pic1}}/J_{\text{pic2}}$ ) n'étant pas inférieur ou égal à 1, il ne peut pas s'agir uniquement d'une réaction consécutive à la première réduction, c'est-à-dire la réduction de la deuxième fonction aldéhyde de la forme réduite du dialdéhyde. En effet, le rapport  $J_{\text{pic2}}/J_{\text{pic1}}$  est égal à 4,0 pour une vitesse de 100 mV/s. Le pic 2 est donc dû à deux réactions se produisant au même potentiel, vraisemblablement la réduction du second groupement aldéhyde du dialdéhyde et du groupement l'aldéhyde du monohydraté acyclique formé.

## **V.2.1. Etude du mécanisme de réduction par voltammétrie cyclique.**

### **V.2.1.1 Etude en fonction de la vitesse de balayage et de la concentration totale en NDA**

L'étude de la variation des densités de courant de pics et des potentiels de pics en fonction de la vitesse de balayage et de la concentration totale en NDA nous permettra de déterminer le type de mécanisme qui est mis en jeu.

Une étude, en faisant varier la concentration, est faite pour cinq concentrations comprises entre 1 mM et 5 mM et pour une vitesse de balayage fixée à 100 mV.s<sup>-1</sup>. L'augmentation de la concentration en NDA est réalisée en ajoutant la même quantité de NDA entre chaque expérience. La densité de courant des pics est reportée en fonction de la concentration totale en NDA (Figure IV-3).

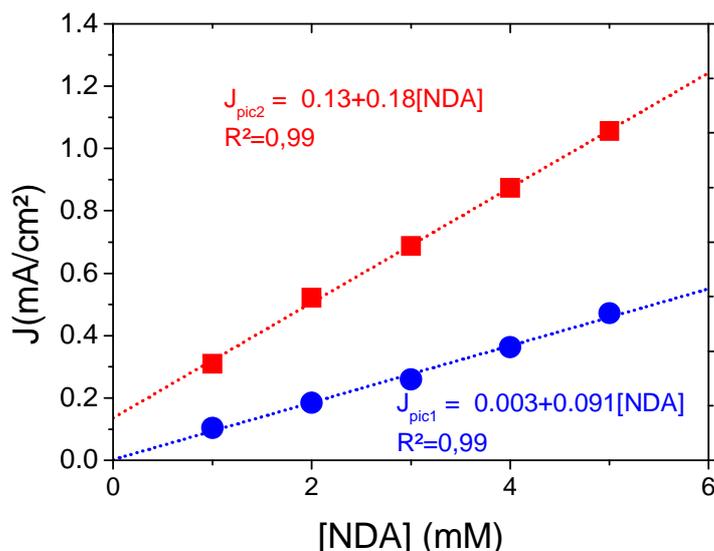


Figure IV-3 : Variation de la densité de courant des différents pics 1 et 2 en fonction de la concentration totale en NDA dans un mélange tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH 50/50 v/v, en bleu, le pic 1 ,et en rouge, le pic 2, sur une électrode de carbone vitreux (S = 0,071 cm<sup>2</sup>) avec une vitesse de balayage de 100 mV.s<sup>-1</sup>.

La variation de la densité de courant des pics en fonction de la concentration est linéaire. Les variations des potentiels de pics sont répertoriées dans le Tableau IV-2.

Concentration (mM)	1	2	3	4	5
E <sub>pic1</sub> (V/ECS)	-1,189	-1,191	-1,199	-1,189	-1,189
E <sub>pic2</sub> (V/ECS)	-1,451	-1,447	-1,450	-1,444	-1,450

Tableau IV-2 : Variations des potentiels de pics 1 et 2 en fonction de la concentration totale en NDA

Les potentiels de pics expérimentaux ne varient pas avec la concentration. On peut donc écarter les mécanismes de réduction impliquant une réaction de type second ordre, telle qu'une réaction de dimérisation entre les formes du NDA en solution.

Par la suite, la variation de la vitesse de balayage de la solution de NDA est étudiée en gardant une concentration constante en NDA totale à 1 mM. La densité de courant des pics est reportée en fonction de la racine de la vitesse de balayage (Figure IV-4).

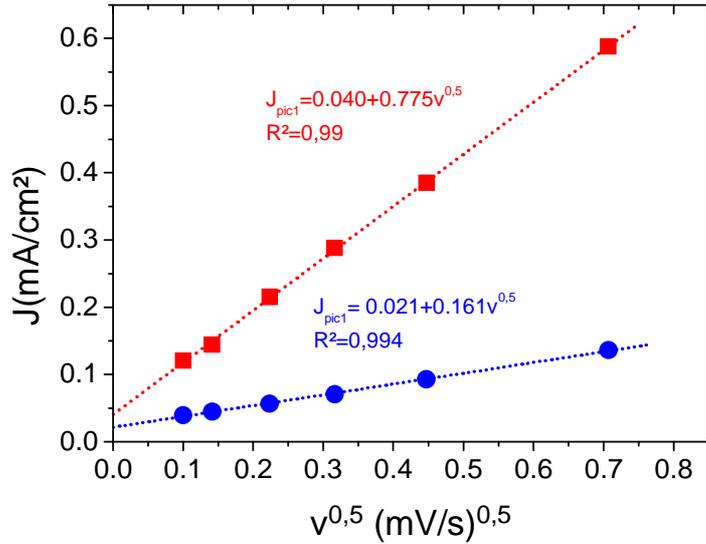


Figure IV-4 : Variation des densités de courant des pics pour 1 mM NDA totale dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH 50/50 v/v en fonction de la vitesse de balayage sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ). En bleu le pic 1 et en rouge le pic 2.

La variation du rapport  $J_2/J_1$  est représentée dans la Figure IV-5. Le rapport des densités de courant varie avec la vitesse de balayage de façon non linéaire. Après 100 mV/s le reste relativement constant. On peut donc supposer que pour des valeurs de vitesse de balayage de 100 mV/s, les équilibres sont figés.

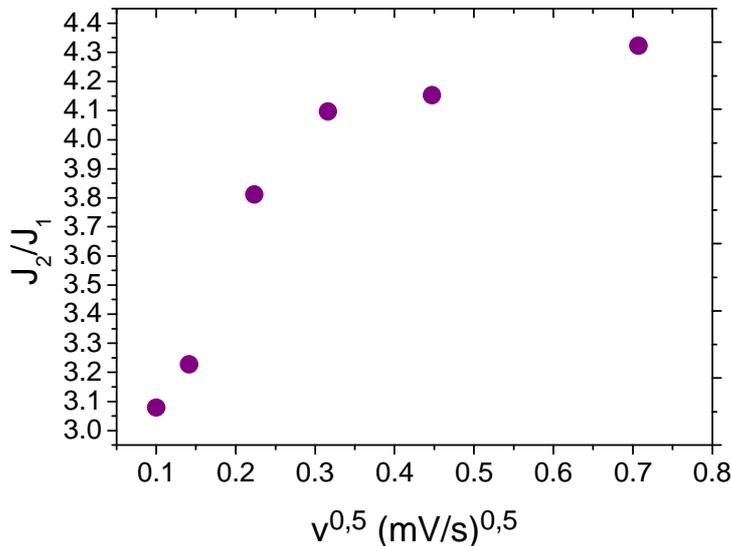
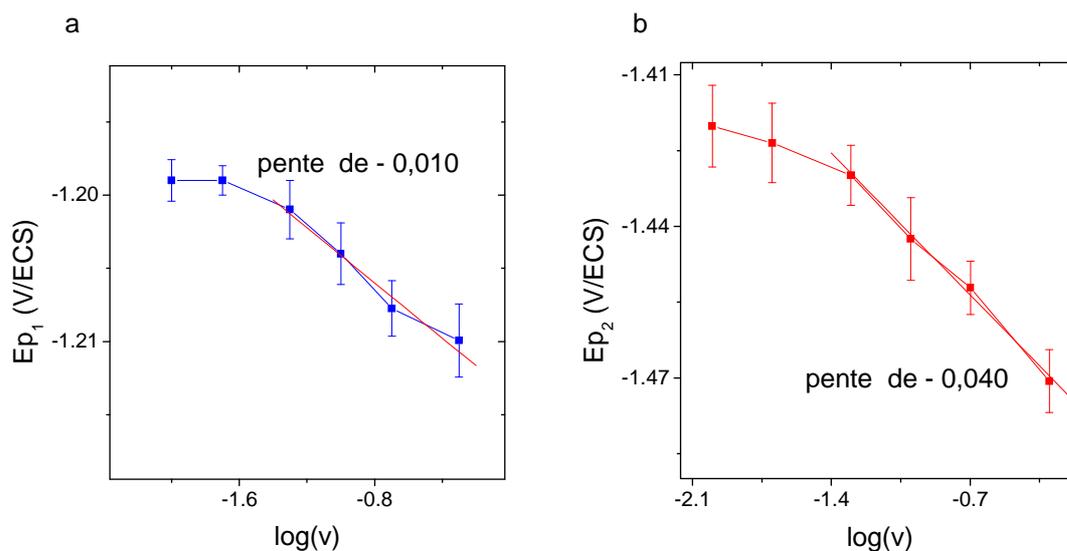


Figure IV-5 : Variation du rapport  $J_2/J_1$  en fonction de la vitesse de balayage dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH 50/50 v/v en fonction de la vitesse de balayage sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ).

Les valeurs des potentiels de pics sont tracées en fonction du logarithme de la vitesse de balayage (Figure IV-6).



**Figure IV-6 : Variation des potentiels de pic en fonction du logarithme de la vitesse de balayage dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH 50/50 v/v en fonction de la vitesse de balayage sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071\text{cm}^2$ ). a) Potentiel du pic1. b) Potentiel du pic2.**

L'aplatissement en début de courbe est dû à la convection aux faibles vitesses de balayage. Nous remarquons que les potentiels des pics 1 et 2 sont sensibles à la variation du logarithme de la vitesse de balayage, indiquant là aussi, que des réactions chimiques sont impliquées dans le mécanisme. Nous notons entre autre que le deuxième pic est plus sensible à la variation du logarithme de la vitesse de balayage, 40 mV par décade pour le pic 2, alors que pour le pic 1 nous avons 10 mV par décade.

La densité de courant des pics du NDA varie bien en fonction de la racine de la vitesse de balayage. Après les quelques observations préliminaires, nous prenons comme hypothèse que la densité de courant de pics en fonction de la vitesse de balayage suit l'équation établie pour un mécanisme EC. Dans le cas d'un système irréversible chimiquement, la densité de courant des pics en fonction de la vitesse de balayage suit une loi de type EC [29]:

$$I_p = 0.496 \cdot n \cdot F \cdot C^0 \cdot S \cdot D^{0.5} \cdot \left( \frac{F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{0.5} \quad \text{Equation IV-1}$$

avec  $D$ , étant le coefficient de diffusion de l'espèce red,  $F$  la constante de Faraday,  $T$ , la température,  $n$  le nombre d'électrons échangés,  $S$ , la surface de l'électrode et  $C^0$  la concentration en DA dans le cas du premier pic et en MA et DA,r dans le cas du second pic.

Pour l'instant la concentration exacte de chaque espèce n'est pas connue.

D'autre part, les ordonnées à l'origine des droites sont non nulles, vraisemblablement dues à des réactions chimiques intervenant dans le mécanisme comme évoqué précédemment.

### V.2.1.2 Etude du NDA en milieu organique

Une étude électrochimique du NDA est effectuée dans un solvant organique (acétonitrile, 0,1 M tétrabutylammonium tetrafluoroborate ((CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub>)). Dans ce milieu, seulement la forme dialdéhyde est théoriquement présente en solution. La Figure IV-7 montre le voltammogramme de 1 mM de NDA dans l'acétonitrile à 100 mV/s avec une référence Ag/AgCl.

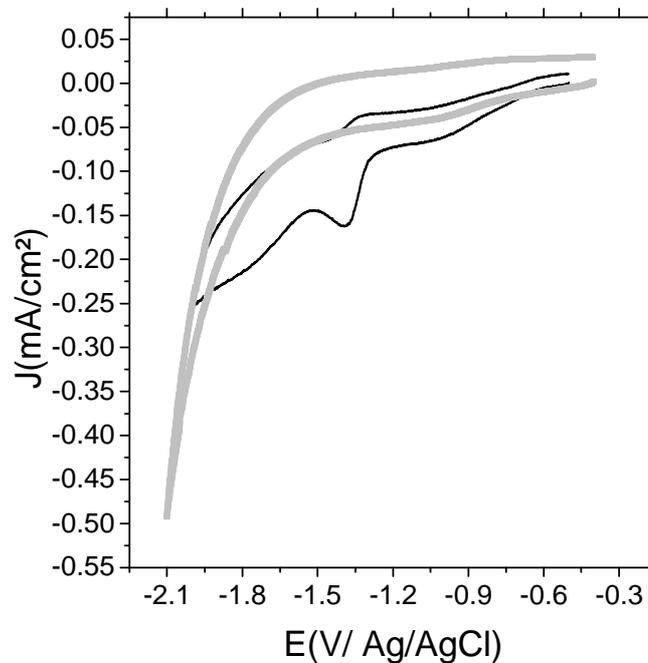
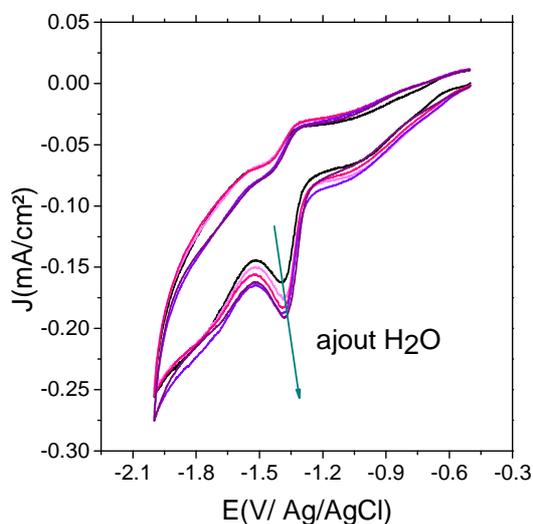


Figure IV-7 : Voltammogramme dans de l'acétonitrile, 0,1 M CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> sur une électrode de carbone vitreux (S = 0,071 cm<sup>2</sup>), v = 100 mV.s<sup>-1</sup>. NDA 1mM (noir) blanc (gris)

Dans ce cas une vague de réduction est observée à -1,4 V vs Ag/AgCl avec un retour à -1,33 V vs Ag/AgCl. Cependant, le pic n'est pas complètement réversible, il doit rester de faibles traces d'eau dans la solution (provenant de l'acétonitrile ou du sel de fond) entraînant la formation des formes hydratées du NDA. Le pré-palier situé à -0,9 V/ECS est également présent dans le blanc. Ces observations nous replacent à peu près dans les mêmes conditions que précédemment (IV.1.1) avec des réactions à deux électrons et deux protons.

Pour accentuer ces observations, de très faibles quantités d'eau (2  $\mu\text{L}$  pour chaque ajout) ont été ajoutées au milieu (Figure IV-8). Un pic correspondant à la réduction de la forme hydratée devrait donc apparaître.



**Figure IV-8 : Evolution des voltammogrammes de 1mM dans de l'acétonitrile, 0,1 M  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{34}\text{NBF}_4$  sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ,  $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) après ajout de traces de  $\text{H}_2\text{O}$ .**

Un décalage du pic initialement à  $-1,4 \text{ V}/(\text{Ag}/\text{AgCl})$  vers le potentiel plus positif est observé ainsi qu'un épaulement vers  $-1,6 \text{ V}/(\text{Ag}/\text{AgCl})$ . Les valeurs des potentiels du premier pic et de la densité de courant sont indiquées dans Tableau IV-3.

	Sans ajout	1 <sup>er</sup> ajout	2 <sup>ème</sup> ajout	3 <sup>ème</sup> ajout	4 <sup>ème</sup> ajout
$E_{\text{pic}} \text{ (V)}$	-1,397	-1,389	-1,388	-1,384	-1,381
$J_{\text{pic}} \text{ (mA/cm}^2\text{)}$	0,080	0,085	0,093	0,094	0,10

**Tableau IV-3 : Variation des potentiels de pic et de la densité de courant avec l'ajout de traces d'eau.**

La variation de la densité de courant de pic en fonction de l'ajout d'eau est linéaire et à une ordonnée à l'origine non nulle. En comparant les voltammogrammes à ceux obtenus en solution aqueuse, on peut supposer que le premier pic correspond donc à la forme non hydratée tandis que le deuxième à la forme hydratée. Le pré-palier situé vers  $-0,9 \text{ V}/(\text{Ag}/\text{AgCl})$  est dû au traces d'eau en solution. La densité de courant en fonction de l'ajout d'eau est linéaire ce qui confirme le rôle non négligeable des réactions d'hydratation.

D'après les informations obtenues par voltammétrie cyclique, on a donc un schéma réactionnel suivant (Schéma IV-5) :

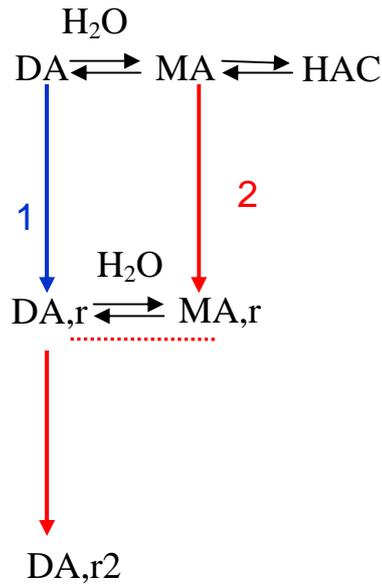


Schéma IV-5 : Réaction du NDA dans un mélange tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH 50/50 v/v.

Les résultats préliminaires ont permis de montrer la présence des différentes formes du NDA en solution. La densité de courant du pic 1 dépend de la concentration en DA. Le rapport des densités de courants des pics 1 et 2 indique que le pic 2 est dû à deux réactions de réduction se produisant aux même potentiel, la réduction de la forme DA,r et de la forme MA.

### V.2.1.3 Etude en fonction du pH

#### V.2.1.3.1 Echelle de pH dans un mélange eau/MeOH

L'échelle de pH d'un solvant amphiprotique pure ou en mélange est limitée par le pH = 0 et par pH = pK<sub>ap</sub> avec K<sub>ap</sub> la constante d'autoprotolyse dans le mélange. Dans un mélange binaire eau/MeOH, l'autoprotolyse est définie par quatre équilibres de transfert de protons [29].



La constante d'autoprotolyse est égale à :

$$K_{ap} = 10^{-(14,00x_{H_2O} + 20,82x_{MeOH})} x_{H_2O}^2 + 10^{-(12,98x_{H_2O} + 14,56x_{MeOH})} x_{H_2O} x_{MeOH} + 10^{-16,77} x_{MeOH}^2 \quad \text{Equation IV-6}$$

Dans le cas d'un mélange eau/MeOH 50/50 v/v, le  $pK_{ap}$  est égal à 14,14 (le  $pK_a$  dans l'eau pure est de 14).

Bosch *et al.* ont montré que la même limite de pH acide peut être utilisée dans le cas de mélange eau pure et eau/MeOH [30]. Dans le cas des pH inférieur à pH 8 (eau pure), le pH eau pure et eau /MeOH sont identiques. Cependant pour des pH plus basiques, l'activité du solvant MeOH doit être pris en compte. Dans ce cas, le pH de la solution est calculé comme suit  $pH = pK_{ap} - \log(\text{activité du solvant})$ . Dans notre cas, les valeurs de pH sont obtenues avec une erreur maximale de 0,14.

#### V.2.1.3.2 *Etude des densités de courant de pic en fonction du pH*

Le but de cette étude est de déterminer à quel pH, les formes DA et MA sont le plus présentes en solution. En effet, ces deux formes sont susceptibles de réagir avec des groupements R-NH<sub>2</sub>. L'optimisation du pH est un critère important pour avoir les meilleures conditions de marquage possible. Le NDA étant présent sous trois formes en solution, la variation des pics en fonction du pH est étudiée (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Cette étude est réalisée en voltammétrie différentielle pulsée (DPV), cette dernière est utilisée pour augmenter la sensibilité de mesure du courant faradique par rapport au courant capacitif. Le potentiel et la densité de courant de pic sont relevés en fonction du pH des solutions adapté pour un mélange binaire H<sub>2</sub>O/MeOH.

L'irréversibilité est confirmée en DPV pour une vitesse de balayage de 25 mV/s (Figure IV-9). En effet, les largeurs à mi-hauteur du premier pic et du second pic sont respectivement de 95 mV et 97 mV pour le pH 9,3. Ces deux largeurs à mi-hauteur sont supérieures à la valeur théorique de  $90,4/n$  mV soit 45,2mV pour deux électrons. La Figure IV-9 montre une forte sensibilité de la densité de courants des pics et des potentiels en fonction du pH.

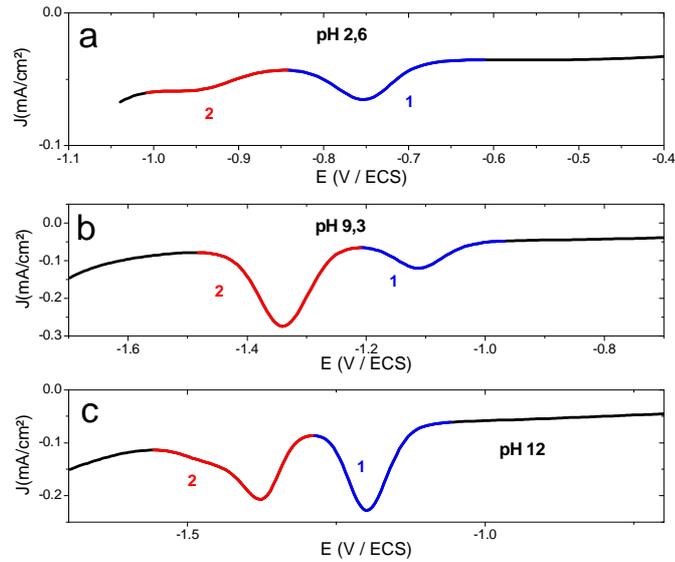


Figure IV-9 : Effet du pH sur la DPV à 25 mV/s d'une solution de 1 mM NDA dans une solution tampon 100 mM borate / MeOH (50/50 v/v) sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ). En bleu le pic 1 et en rouge le pic 2. a) pH 2,6. b) pH 9,3. c) pH 12.

Les mesures de variation des pics ont été faites systématiquement pour la gamme de pH allant de 1,8 à 13. La variation de la densité de courant est indiquée dans la Figure IV-10.

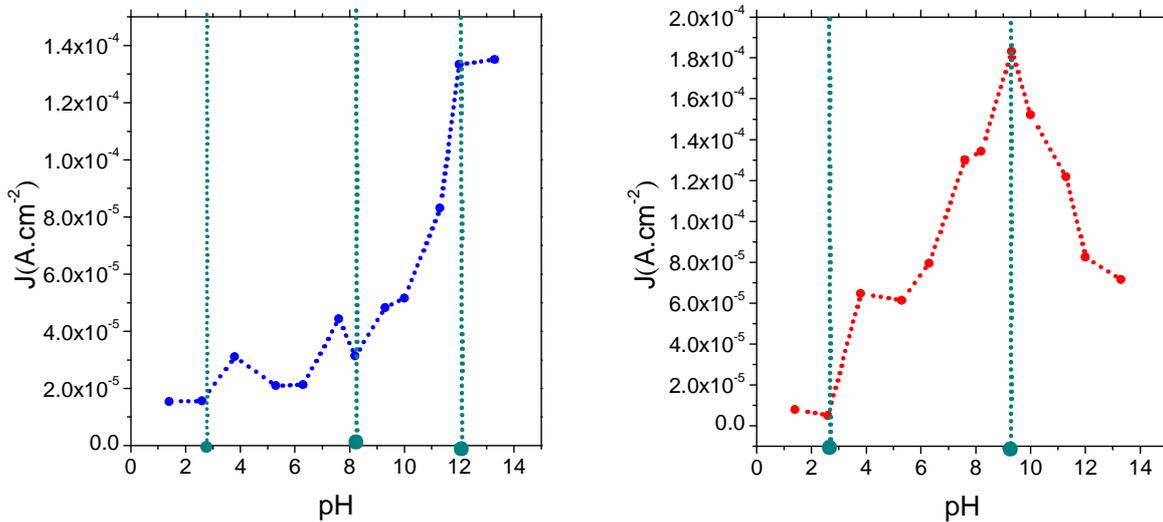
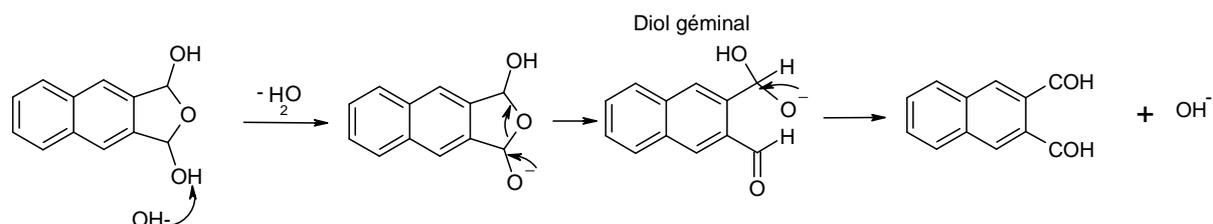


Figure IV-10 : Variation de la densité de courant des pics en fonction du pH d'une solution de 1 mM NDA dans une solution tampon 100 mM borate / MeOH (v/v 50/50) sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ). En bleu le pic 1 et en rouge le pic 2.

Nous remarquons que les densités de courant de pics  $J_{\text{pic1}}$  et  $J_{\text{pic2}}$  sont indépendants du pH pour des pH inférieurs à 3. De plus, la densité de courant du second pic est inférieure à celle du premier pic dans cette gamme de pH. Par conséquent, la concentration en MA est

inférieure à la concentration en DA. Pour la densité de courant  $J_{\text{pic1}}$  une légère augmentation est observée entre les pH 3 et 8, la concentration en DA augmente donc entre ces deux pH. D'autre part, entre les pH 3 et 9, une forte augmentation de la densité de courant pic 2 est observée. Celle-ci est liée à l'augmentation de la concentration en DA en  $\text{DA}_r$  ainsi qu'en MA. L'augmentation conjointe de ces deux formes induit une diminution de la concentration en hémiacétal cyclique. Pour les pH allant de 8 à 12, la densité de courant  $J_{\text{pic1}}$  augmente fortement et donc la concentration en DA également, cette augmentation est probablement due à la déshydratation catalytique par  $\text{OH}^-$  (Schéma IV-6).



**Schéma IV-6 : Déshydratation catalytique par  $\text{OH}^-$  de HAC pour une augmentation de pH.**

Ceci a également été observé par Zuman *et al.* dans un milieu aqueux avec 1% d'acétonitrile [27], [28].

La densité de courant du pic 1 est de nouveau indépendante du pH lorsque celui-ci est supérieur à 12. D'autre part, la densité de courant du pic 2 chute après pH 9. Lorsque le pH est supérieur à 12, la concentration en DA reste constante, et donc celle en  $\text{DA}_r$  également. La concentration en MA diminue donc et la concentration en HA augmente.

On observe un troisième pic de réduction visible à pH 13, dont la valeur de  $E_{\text{pic}}$  est de  $-1,53\text{V/ECS}$ . Nous pouvons attribuer ce pic à la réduction du diol germinale (Schéma IV-7 et Figure IV-11)). L'existence de cette forme a déjà été proposée par Zuman *et al.* dans le cas de l'OPA dans une solution eau avec 1% d'acétonitrile. Ici nous avons une observation claire de ce pic en DPV dans le cas du NDA (Figure IV-11).

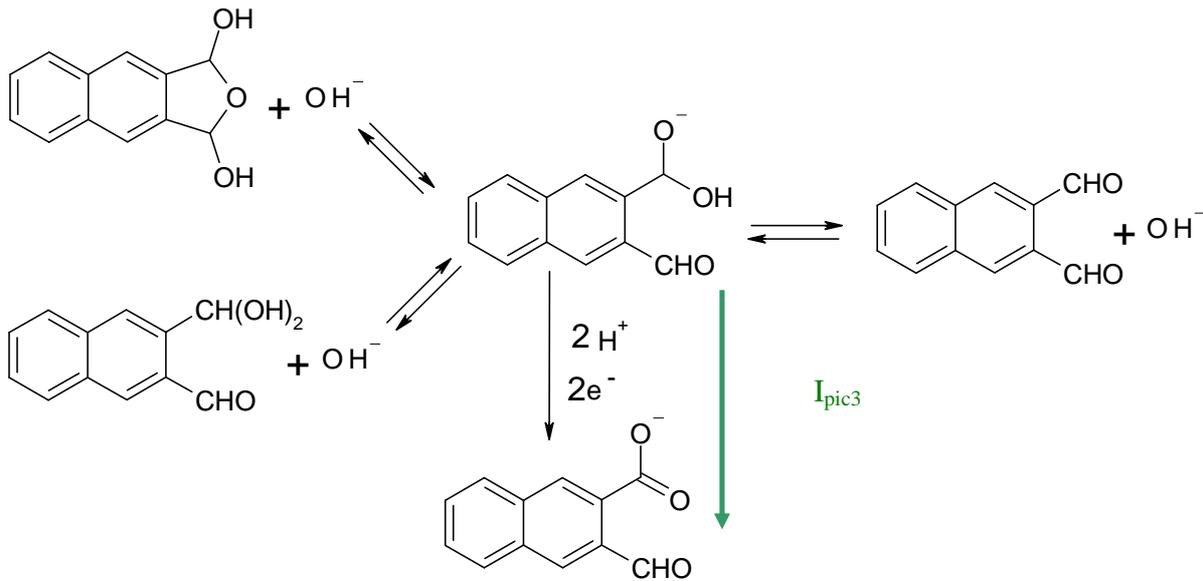


Schéma IV-7 : Schéma réactionnel adapté pour la formation du diol géminé à partir de la réduction du NDA d'après le schéma proposé par Zuman *et al.* pour l'OPA [27].

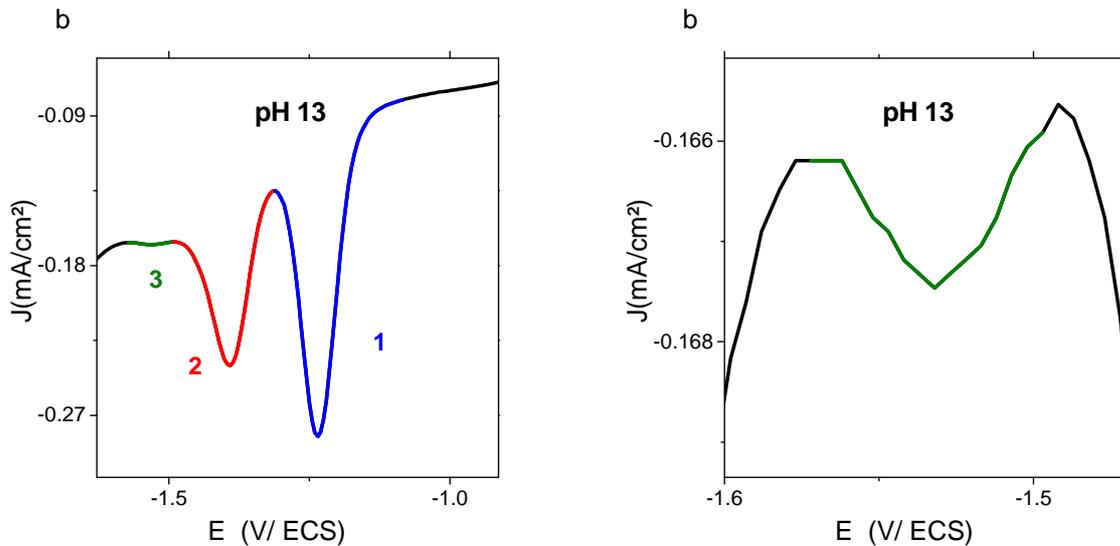


Figure IV-11 : DPV à 25mV/s d'une solution de 1mM NDA dans une solution tampon 100 mM borate / MeOH (v/v 50/50) à pH 13 sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ). En bleu le pic 1 et en rouge le pic 2, en vert le pic 3. a) fenêtre de potentiel de 1,0V à -1,7V. b) Agrandissement de la fenêtre de -1,6 V/ECS à -1,47 V/ECS.

Pour comparer la concentration en DA et en MA, la densité de courant du pic 2 et la densité du pic 1  $J_{\text{pic1}}$  multipliée par deux ( $2 J_{\text{pic1}}$ ) sont tracées en fonction du pH (Figure IV-12). En effet, si on considère les coefficients de diffusion de DA et de MA égaux, le ratio  $[\text{MA}]/[\text{DA}]$  devrait être égal à  $(J_{\text{pic2}} - J_{\text{pic1}}) / J_{\text{pic1}}$ . Donc, la concentration en MA est nécessairement supérieure à celle en DA si  $J_{\text{pic2}} > 2J_{\text{pic1}}$ , et inférieure si  $J_{\text{pic2}} < 2J_{\text{pic1}}$ . D'après la

Figure IV-12,  $[MA] < [DA]$  avant pH 3 et après pH 11, et  $[MA] > [DA]$  pour le pH allant de 3 à 11. La Figure IV-12 correspond au tracé de  $J_{pic_2} - J_{pic_1} / J_{pic_1}$ , ce qui correspond à  $[MA] / [DA]$ . Lorsque ce rapport est compris entre 0 et 1, alors  $[MA] < [DA]$ , si il est égal à 1 alors  $[MA] = [DA]$  et si ce rapport est supérieur à 1 alors  $[MA] > [DA]$  (pH 3 à 11). Pour les concentrations très acides et très basiques, le rapport  $J_{pic_2} - J_{pic_1} / J_{pic_1}$  est inférieur à 1, donc il n'y a pas ou peu de MA en solution, la densité de courant est due à la réduction de la forme DA,r.

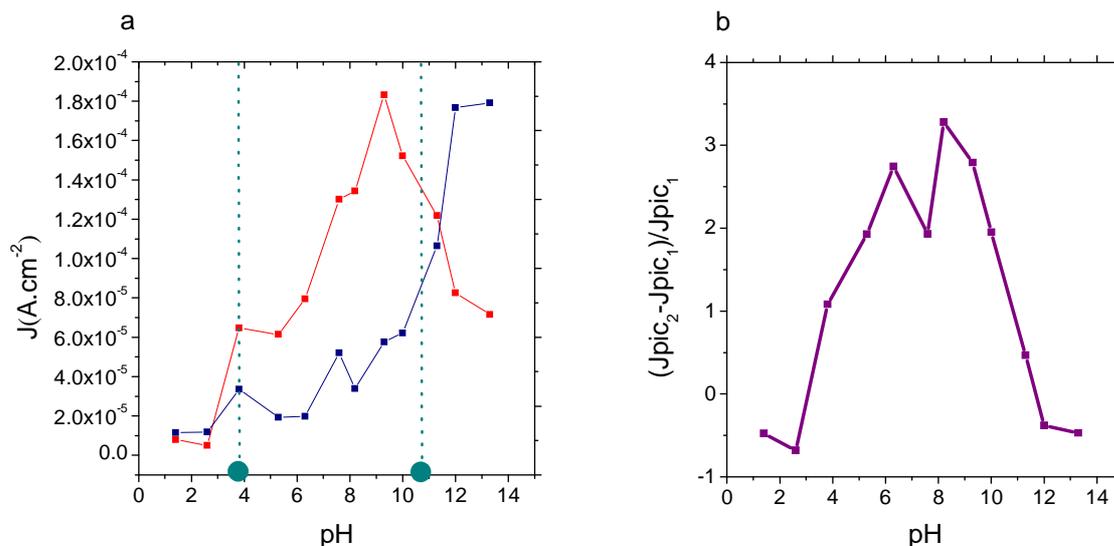
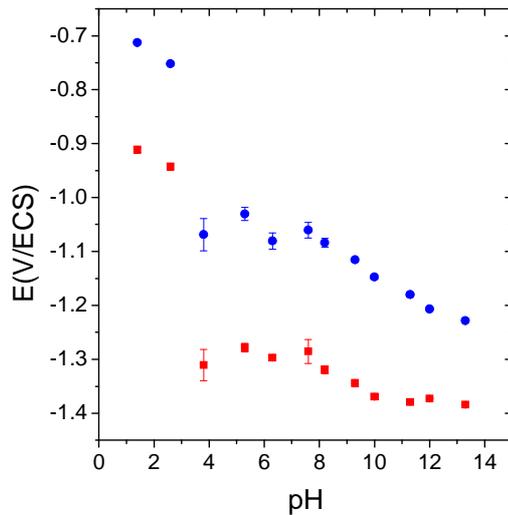


Figure IV-12 : Variation de la densité de courant en fonction du pH d'une solution de 1 mM NDA dans une solution tampon 100 mM borate / MeOH (v/v 50/50) sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071\text{cm}^2$ ) a) en rouge  $J_{pic_2}$  et en bleu  $2J_{pic_1}$ . b) ratio  $(J_{pic_2} - J_{pic_1}) / J_{pic_1}$ .

Les expériences montrent que le potentiel de pic varie également avec le pH, ce qui confirme que le mécanisme de réduction est un mécanisme avec un transfert de protons. Une forte diminution du potentiel de pic est observée pour des valeurs de pH inférieures à 4 puis une relative stagnation et enfin une décroissance (Figure IV-13).



**Figure IV-13 : Variation du potentiel de pic avec le pH d'une solution de 1 mM NDA dans une solution tampon 100 mM borate / MeOH (v/v 50/50) sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) en rouge Epic<sub>2</sub> et en bleu Epic<sub>1</sub>.**

La variation abrupte entre les pH 3 et 4 (forte diminution) pourrait s'expliquer par la formation d'une quantité non négligeable de la forme protonée  $\text{DAH}^+$  en milieu acide ( $\text{pH} < 3,8$ ). Dans ce cas la réduction entraînerait la formation de l'espèce  $\text{DAH}^\bullet$  qui se protonerait pour former l'espèce  $\text{DAH}_2^{\bullet+}$  qui se réduit en  $\text{DA}_r$ . On peut également supposer que comme dans le cas du benzaldéhyde, la réduction de l'espèce chargée  $\text{DAH}^+$  est beaucoup plus rapide que celle de l'espèce neutre. Tandis que, pour des pH supérieurs à 3,8, la réduction est due à la forme  $\text{DA}$  et non plus  $\text{DA}_r$  ce qui entraîne un décalage vers les potentiels de pics plus négatifs.

Dans ce diagramme potentiel-pH, les pentes des courbes sont difficilement exploitables. En effet, le décalage observé pour les potentiels de pics n'est pas dû qu'aux effets de pH. Le type de mécanisme de réduction, et notamment la vitesse de la réaction chimique pourrait être modifiée selon le pH, et par conséquent influencer sur la position du potentiel de pic. En effet Molina *et al.* ont montré que les valeurs des potentiels de pics en DPV dépendent du mécanisme mis en jeu [31]. En effet, pour un mécanisme CE, plus la réaction chimique est rapide, plus le potentiel de pic se décale vers les potentiels négatifs. Dans le cas d'un mécanisme EC, les potentiels se décalent vers les potentiels positifs

#### V.2.1.4 Schéma réactionnel du NDA

Les résultats de l'étude en fonction du pH montrent que la réduction de chaque forme est une réduction globale à 2 électrons et 2 H<sup>+</sup> (Schéma IV-8). Le pH 9 choisi pour l'étude est un pH où les formes DA et MA sont en proportions importantes, ce pH est en accord avec les conditions optimales du marquage qui sont obtenues de manières empiriques. Les études en fonction du pH nous ont permis de déterminer les pKa et les potentiels standard des différents couples électrochimiques. Salem *et al.*, ont déterminé les pKa de l'OPA et du NDA. Dans le cas du NDA, le pKa obtenu est de 4,5 (pKa correspondant à la réaction de la forme DA et MA avec les ions hydroxyde pour former un diol géminale) [28].

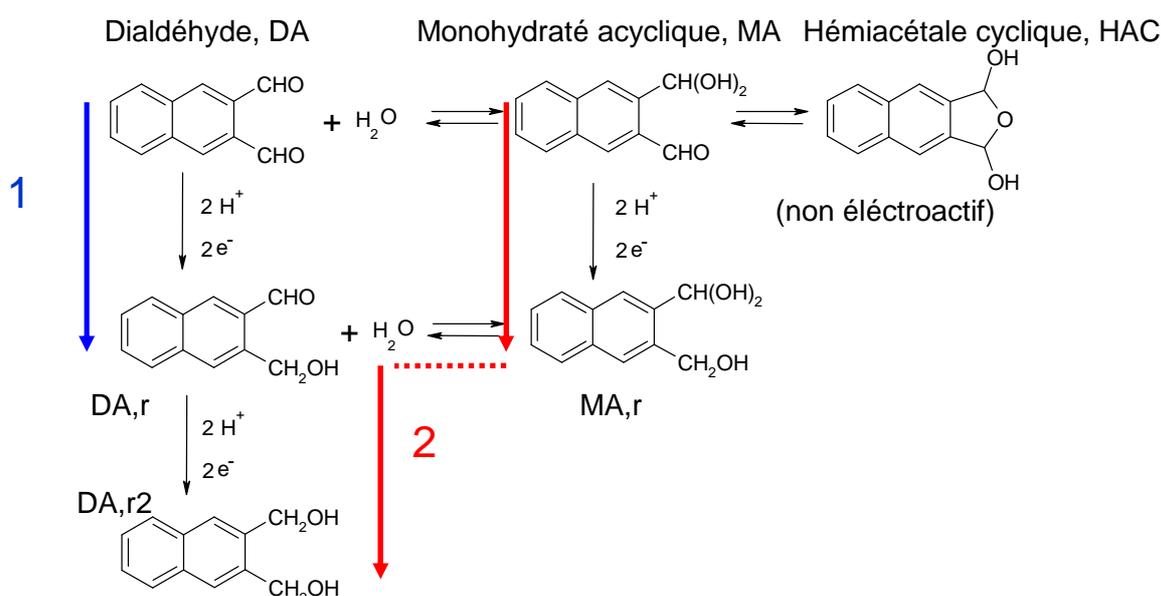


Schéma IV-8 : Schéma réactionnel de la réduction du NDA dans un mélange tampon borate/MeOH (50/50 v/v).

## V.2.2. Détermination des concentrations de chaque forme

Nous avons vu que le NDA existe sous 3 formes en solution, il est donc utile d'en connaître la concentration de chaque forme. Nous avons décidé de comparer les densités de courant des pics de réduction NDA avec la densité de courant du pic de réduction de la benzoquinone pour déterminer les concentrations en solution. La benzoquinone a été choisie car le mécanisme de réduction est le même que celui du NDA, c'est-à-dire une réduction à deux électrons et deux protons.

### V.2.2.1 Détermination de la concentration en comparant les intensités en voltammétrie cyclique

Dans un premier temps, les voltammogrammes du NDA sont comparés à ceux de la benzoquinone (BQ) dans les mêmes conditions (pH, force ionique) pour déterminer les concentrations. Cette procédure est largement utilisée en électrochimie lorsque l'on cherche à déterminer le nombre d'électrons échangés. Ici nous appliquons la même procédure, non pas pour connaître le nombre d'électrons échangés mais pour déterminer la concentration en chaque forme.

Le rapport des intensités de pic est obtenu à partir des relations théoriques donnant l'intensité des pics en fonction de la vitesse de balayage ainsi que les autres paramètres de l'équation IV-7.

Le premier pic  $I_{p1}$  est relatif au dialdéhyde non hydraté, qui s'exprime de la manière suivante :

$$I_{p1} = 0.496 \cdot n \cdot F \cdot C_{DA} \cdot S \cdot D_{DA}^{0.5} \cdot \left( \frac{F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{0.5} \quad \text{Equation IV-7}$$

L'intensité relative à la réduction de la benzoquinone dans le cas d'un système réversible :

$$I_{p_{BQ}} = 0.446 \cdot n \cdot F \cdot C_{BQ} \cdot S \cdot D_{BQ}^{0.5} \cdot \left( \frac{F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{0.5} \quad \text{Equation IV-8}$$

En réalisant le rapport théorique des deux pics de réduction, la concentration en DA peut être exprimée :

$$C_{DA} = 1,11 \cdot \frac{I_{p1}}{I_{p_{BQ}}} \cdot \left( \frac{D_{BQ}}{D_{DA}} \right)^{1/2} C_{BQ} \quad \text{Equation IV-9}$$

Le deuxième étant le pic de réduction de la forme réduite du dialdéhyde et du monoaldéhyde, il devrait nous permettre de déterminer la concentration en monoaldéhyde. En considérant les coefficients de diffusion de DA,r, MA et DA égaux (et noté  $D$ ), l'intensité du pic 2  $I_{p2}$  peut s'exprimer comme ci-dessous :

$$I_{p2} = 0.496 \cdot n \cdot F \cdot (C_{DA,r} + C_{MA}) \cdot S \cdot D^{0.5} \cdot \left( \frac{F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{0.5} \quad \text{Equation IV-10}$$

d'où

$$\frac{Ip_2}{Ip_{BQ}} = 1,11 \cdot \left( \frac{D}{D_{BQ}} \right)^{1/2} \cdot \frac{C_{DA,r} + C_{MA}}{C_{BQ}} \quad \text{Equation IV-11}$$

$$C_{MA} = 1,11 \cdot \left( \frac{D_{BQ}}{D} \right)^{1/2} \cdot \frac{Ip_2}{Ip_{BQ}} C_{BQ} - C_{DA,r} \quad \text{Equation IV-12}$$

$$C_{MA} = 1,11 \cdot \left( \frac{D_{BQ}}{D} \right)^{1/2} \cdot \frac{Ip_2}{Ip_{BQ}} C_{BQ} - \delta \cdot C_{DA} \quad \text{Equation IV-13}$$

$\delta$  étant la proportion de DA réduit en DA,r. Dans notre cas, on considère que tout le DA s'est réduit en DA,r, alors  $\delta = 1$ , ce qui conduit à :

$$C_{MA} = 1,11 \cdot \left( \frac{D_{BQ}}{D} \right)^{1/2} \cdot \frac{Ip_2}{Ip_{BQ}} C_{BQ} - C_{DA} \quad \text{Equation IV-14}$$

En considérant en première approximation, les coefficients de diffusion de DA, DA,r, MA et BQ égaux, les concentration s'expriment comme suit:

$$C_{DA} = 1,11 \cdot \frac{Ip_1}{Ip_{BQ}} \cdot C_{BQ} \quad \text{Equation IV-15}$$

$$C_{MA} = 1,11 \cdot \frac{Ip_2}{Ip_{BQ}} C_{BQ} - C_{DA} \quad \text{Equation IV-16}$$

La concentration en hémiacétale cyclique est déduite des concentrations en DA et en MA de la façon suivante.

$$C_{HAC} = C_{NDA,tot} - C_{DA} - C_{MA}$$

Equation IV-17

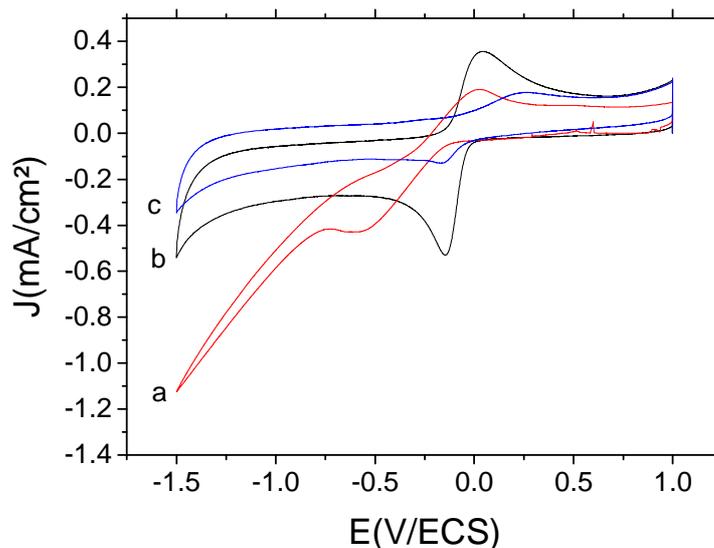
L'application numérique est faite avec une concentration en BQ égale à la concentration totale en NDA, soit 1 mM. Les résultats pour une vitesse de balayage de 100 mV/s sont indiqués dans le tableau suivant (Tableau IV-4).

Forme	DA	MA	HAC
Concentration (mM)	0,99	1,94	-

**Tableau IV-4 : Valeurs estimées des concentrations en DA, MA et HAC, en comparant les intensités des pics de la BQ avec ceux du NDA dans les mêmes conditions d'analyses ( $v = 100$  mV/s, tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v)).**

Les résultats trouvés en utilisant la benzoquinone ne sont pas satisfaisants, les concentrations obtenues sont aberrantes. En effet, la concentration en MA obtenue est largement supérieure à la concentration initiale en NDA total de 1 mM.

De manière à expliquer cette aberration, la benzoquinone est étudiée dans trois milieux différents : 100% méthanol avec 0,1 M KCl, 100% tampon borate à 100mM et pH 9, et notre milieu d'étude constitué du tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH 50/50 v/v (Figure IV-14). En comparant, le voltammogramme dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH 50/50 v/v ou 100% tampon borate à 100mM et pH 9, une diminution de l'intensité du pic est observée dans le mélange 50/50. Au regard du voltammogramme, la benzoquinone dans le milieu tampon borate 100 mM pH 9 /MeOH 50/50 v/v doit probablement se dégrader.



**Figure IV-14 :** Voltammogramme de 1 mM de BQ à 100 mV/s sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ). a) BQ dans un tampon 100 mM borate. b) BQ dans MeOH 100 mM KCl. c) BQ dans un mélange tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (50/50 v/v).

Une expérience dans un mélange 90/10 (v/v) tampon borate/ MeOH est réalisée pour confirmer ces observations. L'évolution des densités de courants de pics en fonction du temps est reportée. Une diminution de la densité de courant des pics est effectivement observée en fonction du temps. D'autre part, la solution initialement de couleur jaune devient de plus en plus foncée au cours du temps. Ces deux résultats tendent à confirmer que la benzoquinone se dégrade dans ce milieu (Figure IV-14 et Figure IV-15). On peut supposer qu'il y a formation de la quinhydrone (QH) réaction de l'hydroquinone et de la benzoquinone [32].

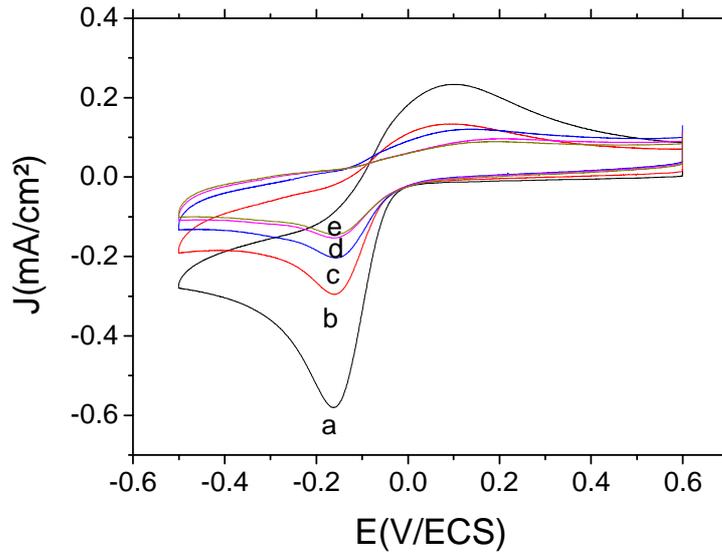


Figure IV-15 : Voltammogramme de 1 mM de la BQ à 100 mV/s. a) BQ dans une solution de tampon 100 mM borate. b) BQ dans une solution de tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (90/10 v/v) pour t = 0 min. c) BQ dans une solution de tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (90/10 v/v) pour t=10 min. d) BQ dans une solution de tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (90/10 v/v) pour t = 20 min. e) BQ dans une solution de tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (90/10 v/v) pour t = 40 min.

La benzoquinone ne peut donc pas être utilisée de manière fiable pour comparer les intensités avec celles du NDA. En effet, la benzoquinone se dégrade dans le temps dans notre milieu tampon borate/ MeOH, l'intensité du pic pour 1 mM de benzoquinone ne peut être déterminée dans les mêmes conditions d'analyse que le NDA. La benzoquinone ne permettant pas de déterminer la concentration de chaque forme, les formules des intensités en fonction de la vitesse de balayage (Equation IV-7 et IV-10) sont directement utilisées pour déterminer la concentration des différentes formes du NDA. Cependant pour utiliser ces formules, les coefficients de diffusion de chaque forme doivent être déterminés.

### V.2.2.2 Détermination des coefficients de diffusion

Différentes formules existent pour estimer le coefficient de diffusion. On peut citer celle de Wilke-Chang [33], Scheibel [34], Reddy-Doraiswamy [35] et Lusi-Ratcliff [36].

L'estimation la plus couramment utilisée est la méthode de Wilke-Chang établie en 1955 [32]. Cette formule est basée sur la relation de Stokes Einstein.

$$D_{AB} = 7,4 \cdot 10^{-12} \cdot \frac{T \cdot (X M_B)^{1/2}}{\eta_B V_{A,m}^{0,6}} \quad \text{Equation IV-18}$$

Dans cette formulation les indices  $B$  et  $A$  correspondent respectivement au solvant et au soluté.  $M_B$  correspond à la masse molaire du solvant (en g/mol),  $V_m$  est le volume molaire au point d'ébullition (en L/mol),  $\eta$  la viscosité (en cP) et  $T$  la température. Le paramètre  $X$  correspond au paramètre d'association du solvant. Ce paramètre prend en compte les interactions solvant/soluté. Il définit une masse moléculaire effective du solvant qui tient compte du phénomène de diffusion. Ce paramètre est de 2,6 pour l'eau et de 1,9 pour le méthanol.

La deuxième formule est la celle de Scheibel établie en 1954 [34].

$$D_{AB} = 8,2 \cdot 10^{-12} \cdot T \cdot \frac{1}{\eta_B V_{A,m}^{1/3}} \left( 1 + \left( \frac{3V_{B,m}}{V_{A,m}} \right)^{2/3} \right) \quad \text{Equation IV-19}$$

Contrairement à la formule de Wilke-Chang, cette formulation n'inclut pas de paramètre d'association lequel est remplacé par l'introduction des volumes molaires du solvant ( $V_{B,m}$ ) et du soluté ( $V_{A,m}$ ).

La troisième formulation est celle de Reddy-Doraiswamy établie en 1967 [35]. De même que pour la formule de Scheibel, le paramètre d'association n'est pas présent. Le volume molaire du solvant est introduit pour prendre en compte la diffusion.

$$D_{AB} = Const \cdot \frac{T \cdot (M_B)^{1/2}}{\eta_B V_{B,m}^{1/3} V_{A,m}^{1/3}} \quad \text{Equation IV-20}$$

Dans cette formule la constante,  $Const$ , dépend du rapport des volumes molaires. Cette constante vaut  $8,5 \times 10^{-12}$  si  $V_B > 1,5V_A$  et  $10 \times 10^{-12}$  si  $V_B \leq 1,5V_A$

La dernière formulation est celle de Lusis-Ratcliff qui a été développée en 1968 pour déterminer le coefficient de diffusion dans des solvants organiques [36] :

$$D_{AB} = 8,5 \cdot 10^{-12} \cdot T \cdot \frac{1,4 \cdot \left( \frac{V_{B,m}}{V_{A,m}} \right)^{1/3} + \frac{V_{B,m}}{V_{A,m}}}{\eta_B V_{B,m}^{1/3}} \quad \text{Equation IV-21}$$

Avant de déterminer le coefficient de diffusion des différentes formes, les paramètres ( $V_{x,m}$ ,  $M_x$ ,  $\eta$ ) doivent être calculés :

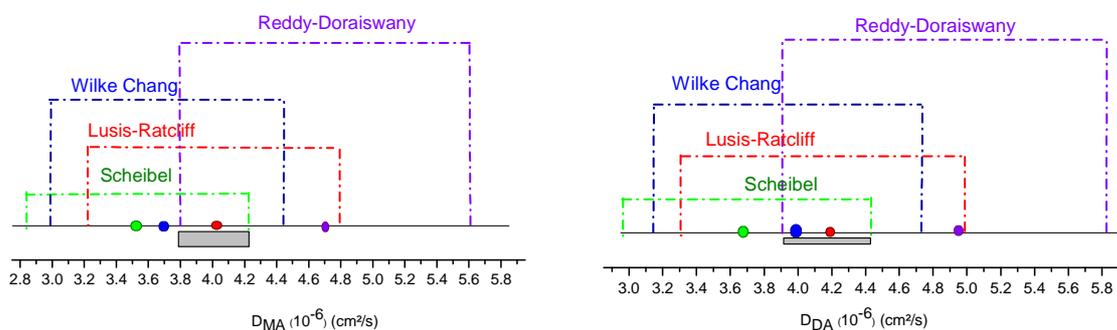
- La masse molaire du solvant est :  $M_B = x_{\text{eau}}M_{\text{eau}} + x_{\text{MeOH}}M_{\text{MeOH}} = 22,3 \text{ g.mol}^{-1}$ , avec  $x_{\text{eau}}$  et  $x_{\text{MeOH}}$  les fractions molaires de l'eau et du méthanol dans le mélange. Les fractions molaires ont été calculées pour l'eau et le méthanol, donnant  $x_{\text{eau}} = 0,692$  et de  $x_{\text{MeOH}} = 0,308$ .
- Le paramètre d'association a été calculé et vaut  $X = x_{\text{eau}}X_{\text{eau}} + x_{\text{MeOH}}X_{\text{MeOH}} = 2,38$  avec  $X_{\text{eau}} = 2,6$  et  $X_{\text{MeOH}} = 1,9$ .
- Le volume molaire  $V_{B,m} = x_{\text{eau}}V_{\text{eau,m}} + x_{\text{MeOH}}V_{\text{MeOH,m}} = 24,47 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  avec  $V_{\text{eau,m}} = 18,9 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  et  $V_{\text{MeOH,m}} = 37 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ .
- Dans nos conditions de mélange 50/50 v/v H<sub>2</sub>O/MeOH, la viscosité du solvant est de 1,7 à 25°C [36].
- Le volume molaire du dialdéhyde est égal à 201,2 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup> et 220,6 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup> pour la forme monohydrate acyclique. Les volumes molaires au point d'ébullition sont déterminés par combinaison des volumes molaires des atomes des différents constituants. Ces valeurs ont été déterminées à partir des données de Wilke-Chang [32].

Les valeurs des coefficients de diffusion selon les 4 formules sont données dans le Tableau IV-2 avec un pourcentage d'erreur de 20% pour les 4 formules:

	Wilke-Chang	Scheibel	Reddy-Doraiswamy	Lusis-Ratcliff
$D_{DA} (\times 10^{-06} \text{ cm}^2 .\text{s}^{-1})$	(3,92±0,78)	(3,70 ±0,74)	(4,87±0,97)	(4,18 ±0,83)
$D_{MA} (\times 10^{-06} \text{ cm}^2 .\text{s}^{-1})$	(3,71±0,74)	(3,52±0,70)	(4,72±0,94)	(4,02±0,80)

**Tableau IV-2 : Valeurs des coefficients de diffusion estimées avec les équations IV-18 ; IV-19 ; IV-20 et IV-21.**

Les marges d'erreur pour les valeurs des différents coefficients peuvent être illustrées sous la forme des graphiques comme indiqué ci-dessous (Figure IV-16):



**Figure IV-16 : Schéma représentant les coefficients de diffusion et leurs écarts types, les points correspondants aux valeurs moyennes, en vert les valeurs estimées avec la formule de Scheibel, en bleu avec la formule de Wilke Chang, en rouge avec la formule de Lusion-Ratcliff et en violet avec la formule de Reddy-Doraiswany.**

Sur le graphique, la plage grisée correspond aux valeurs statistiques pour les quatre formules (Wilke-Chang, Scheibel, Reddy-Doraiswany et Lusion-Ratcliff). Dans le cas du calcul du coefficient de diffusion de DA les valeurs de  $D_{DA}$  estimées pour toutes les formules sont comprises entre  $4,89 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $4,44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour une moyenne de  $4,17 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , tandis que le coefficient  $D_{MA}$  est compris entre  $3,78 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $4,22 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour une moyenne de  $4,00 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

Grâce aux formules empiriques (Wilke-Chang, Scheibel, Reddy-Doraiswany et Lusion-Ratcliff) nous avons pu estimer expérimentalement les coefficients de diffusion dans le cas de mélange eau/MeOH. Avec la formule de Wilke-Chang et de Scheibel, les pourcentages d'erreur sont respectivement de 8% et 14 %. D'autre part, les valeurs calculées sont inférieures à la valeur expérimentale. Pour la corrélation de Reddy-Doraiswany, le pourcentage d'erreur moyen est également de 17%. Celui-ci est inférieur à 1% en utilisant la formule de Lusion-Ratcliff.

### V.2.2.3 Détermination de la concentration en utilisant les coefficients de diffusion.

Pour la concentration en dialdéhyde, l'équation IV-32 de l'intensité du pic 1 irréversible est appliquée :

D'où

$$\frac{I_{p1}}{0.496 \cdot n \cdot F \cdot S \cdot D_{DA}^{0.5} \cdot \left(\frac{F \cdot v}{R \cdot T}\right)^{0.5}} = C_{DA} \quad \text{Equation IV-22}$$

Pour la concentration en monohydraté acyclique, l'intensité du pic 2 est utilisée :

$$I_{p2} = 0.496 \cdot n \cdot F \cdot S \cdot \left(\frac{F \cdot v}{R \cdot T}\right)^{0.5} (C_{DA,r} D_{DA,r}^{0.5} + C_{MA} D_{MA}^{0.5}) \quad \text{Equation IV-23}$$

Etant donné les valeurs estimées précédemment, les coefficients de diffusion de MA et de DA,r sont pris égaux à celui de DA, avec n = 2 pour le nombre d'électrons échangés.

$$I_{p2} - I_{p1} = 0.992 \cdot F \cdot S \cdot \left(\frac{F \cdot v}{R \cdot T}\right)^{0.5} \cdot D_{DA}^{0.5} ((\delta - 1)C_{DA}^0 + C_{MA}^0) \quad \text{Equation IV-24}$$

Par la suite on suppose que  $\delta = 1$ , d'où :

$$\frac{I_{p2} - I_{p1}}{0.992 \cdot F \cdot S \cdot \left(\frac{F \cdot v}{R \cdot T}\right)^{0.5} \cdot D^{0.5}} = C_{MA}^0 \quad \text{Equation IV-25}$$

Le Tableau IV-5 suivant résume les résultats des concentrations obtenus avec les différents coefficients de diffusion déterminés précédemment :

	Concentration en mM					
	Formule de Wilke Chang	Formule de Reddy-Doraiswamy	Formule de Lusion-Ratcliff	Formule de Scheibel	moyenne	Écart type
[MA]	0,57	0,50	0,54	0,58	0,55	0,03
[DA]	0,28	0,25	0,27	0,295	0,27	0,02
[HAC]	0,15	0,24	0,18	0,13	0,18	0,05

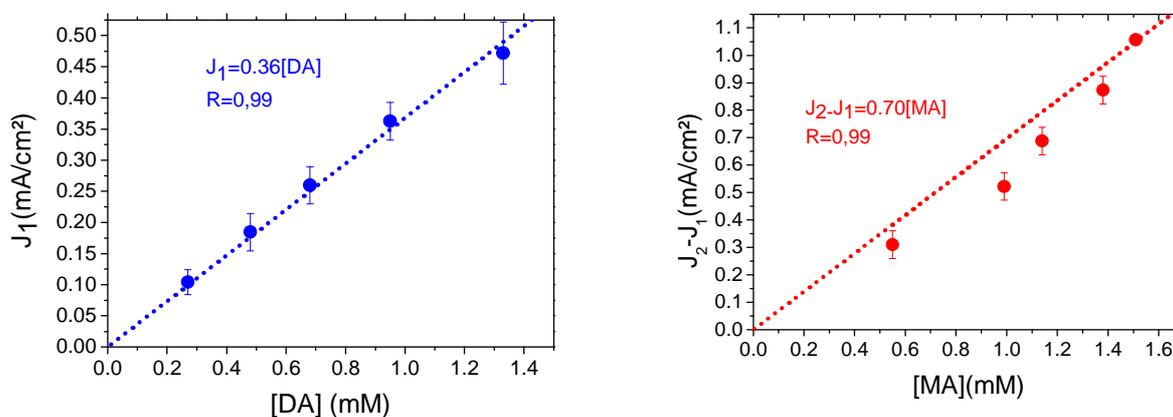
Tableau IV-5 : Valeurs des concentrations des différentes formes du NDA calculées à partir des équations IV-22 , IV-25 et IV-17 et des valeurs moyennes des coefficients de diffusion.

Les concentrations des différentes formes peuvent de la même façon être calculées en fonction de la concentration globale en NDA (Tableau IV-6). Les valeurs données dans le tableau sont calculées en utilisant les coefficients de diffusion trouvés avec la formule de Lysis-Ratcliff. En effet, les valeurs calculées à partir de cette formule donne une valeur proche de la moyenne des valeurs trouvées avec les autres méthodes. Les valeurs déterminées avec la formule de Lysis-Ratcliff donne donc une meilleure approximation de la véritable valeur.

[NDA] <sub>tot</sub> (mM)	1	2	3	4	5
[MA](mM)	0,57	0,90	1,14	1,38	1,51
[DA](mM)	0,28	0,48	0,68	0,95	1,33
[HAC] (mM)	0,15	0,62	1,18	1,67	2,16

**Tableau IV-6 :** Valeurs des concentrations des trois formes en solution aqueuse en fonction de la concentration globale en NDA calculées à partir des coefficients de diffusion déterminés par la formule de Lysis-Ratcliff.

Les graphiques des densités de courant ( $J_1$  et  $J_2-J_1$ ) sont retracés cette fois ci en fonction de la concentration en DA ou en MA (Figure IV-17), et non plus en fonction de la concentration totale en NDA (Figure IV-7).

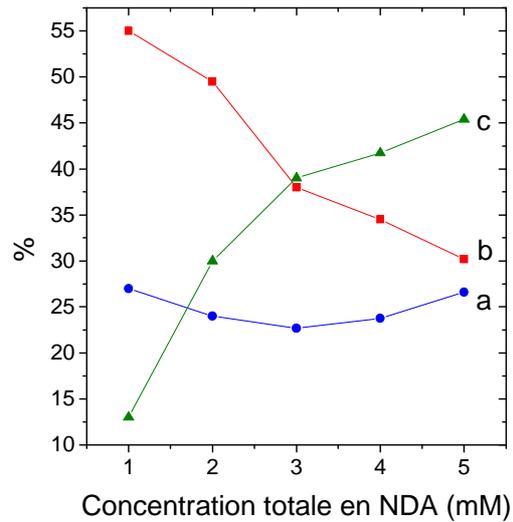


**Figure IV-17 :** a)Variation de la densité de courant du pic  $J_1$  en fonction de la concentration en DA b) Variation de la densité de courant du pic  $J_2-J_1$  en fonction de la concentration en MA à 100 mV/s.

Contrairement à la Figure IV-4, les Figure IV-17 a et b donnent des corrélations linaires pour la densité de courant en fonction des deux formes électroactives du NDA. L'ordonnée à l'origine est quasiment nulle. On peut aussi remarquer que l'on obtient bien un

rapport de 2 entre les pentes  $J_1$  et  $J_2-J_1$  en fonction de la concentration en DA et MA. Ceci confirme que la densité de courant suit bien une forme de l'équation 7 et IV-24.

Le pourcentage pour la concentration de chaque forme est représenté dans la Figure IV-18 en fonction de la concentration totale en NDA. Le pourcentage en DA reste relativement constant, tandis que le pourcentage en MA diminue et celui en HC augmente en fonction de la concentration totale.

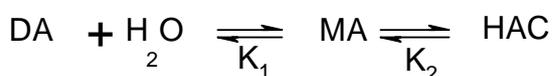


**Figure IV-18 : Variation du pourcentage de chaque forme en solution en fonction de la concentration totale en NDA à 100 mV/s. a) Pourcentage pour la concentration en DA . b) Pourcentage pour la concentration en MA. c) Pourcentage pour la concentration en HAC.**

A titre indicatif, les concentrations des différentes formes du NDA ont été déterminées par polarographie par l'équipe de Zuman *et al.* dans un milieu aqueux contenant 1% d'acétonitrile. Pour cela, les pics du NDA ont été comparés à ceux de l'isophtalaldehyde (IPA). L'IPA a été choisi car il n'est présent qu'à 3% sous forme hydratée à l'équilibre en milieu aqueux [27]. Dans leur cas, le NDA est présent à 7% sous sa forme non hydratée et à 78% sous sa forme cyclique. Pour déterminer ces concentrations Zuman *et al.* ont considéré les coefficients de diffusion de l'IPA et du NDA égaux, ce qui n'est en réalité pas le cas.

### V.2.3. Détermination des constantes d'équilibre

Les constantes d'équilibre des différentes réactions chimiques peuvent être déterminées pour le mécanisme proposé dans le Schéma IV-8:



**Equation IV-26**

$K_1$  correspond à la constante d'équilibre de formation de MA, et  $K_2$  à celle de la formation de HAC.

avec :

$$K_1 = \frac{[MA]}{[DA].[H_2O]} = \frac{D_{DA}^{0,5}(Ip_2 - Ip_1)}{D_{MA}^{0,5}Ip_1.[H_2O]} \quad \text{Equation IV-27}$$

$$\text{et } K_1' = \frac{[MA]}{[DA]} = \frac{D_{DA}^{0,5}(Ip_2 - Ip_1)}{D_{MA}^{0,5}Ip_1} \quad \text{Equation IV-28}$$

$$K_2 = \frac{[HAC]}{[MA]} \quad \text{Equation IV-29}$$

$$K_H' = K_2.K_1' \quad \text{Equation IV-30}$$

avec  $K_H'$ , la constante de la réaction  $DA + H_2O = HAC$

Les valeurs de différentes constantes sont estimées d'après les différentes formules des coefficients de diffusion sont indiquées dans le Tableau IV-7.

	Coefficient de Wilke Chang	Coefficient de Reddy-Doraiswamy	Coefficient de Lusi-Ratcliff	Coefficient de Scheibel	moyenne	Écart type
$K_1'$	2,03	2,00	2,01	2,02	2,02	0,01
$K_2$	0,27	0,45	0,34	0,22	0,3	0,1
$K_H'$	0,54	0,97	0,68	0,45	0,7	0,2

**Tableau IV-7 : Valeurs des constantes d'équilibre calculées à partir des coefficients de diffusion et des équations IV-28, IV-29 et IV-30 pour une concentration en 1 mM.**

On obtient des valeurs de  $K_H'$  et  $K_2$  qui sont inférieures à 1. La formation de MA ou de Da à partir de HAC est donc défavorable. De plus  $K_1'$  est supérieur à 1, la formation de DA à partir de MA est par contre favorable. Le Tableau IV-8 indique les valeurs des constantes d'équilibre calculées à partir de la formule de Lusi-Ratcliff pour différentes concentrations totales en NDA.

[NDA]	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM
$K_1'$	2,03	1,87	1,68	1,45	1,13
$K_2$	0,27	0,69	1,04	1,21	1,43
$K_H'$	0,54	1,29	1,74	1,76	1,62

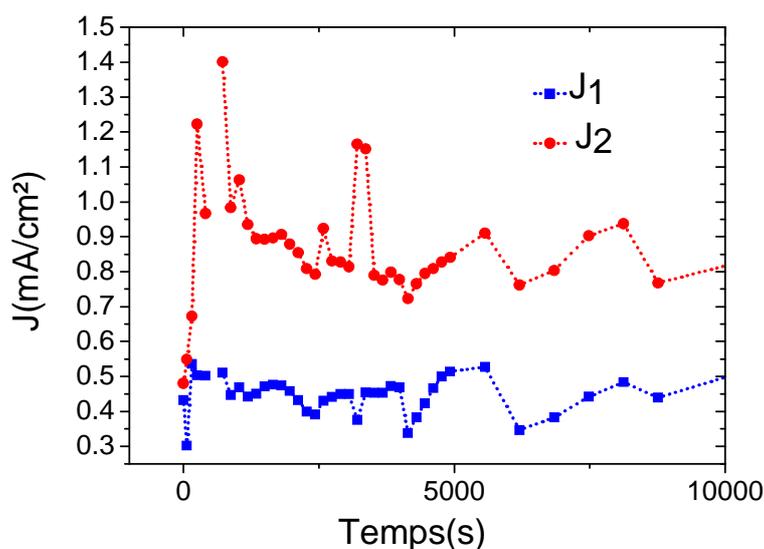
**Tableau IV-8 : Valeurs des constantes d'équilibre  $K_1'$  et  $K_2$  calculées à partir du coefficient de diffusion de la formule de Lusi-Ratcliff et des équations IV-29, IV-29 et IV-30 pour une les différentes concentrations totales en NDA.**

Une diminution de la valeur de  $K_1'$  et une augmentation des valeurs de  $K_H'$  et  $K_2$  sont observées lorsque la concentration totale en NDA augmente. En augmentant la concentration totale en NDA, la formation de DA à partir de MA devient de moins en moins favorable tandis que la formation de MA à partir de HAC devient favorable.

Zuman *et al.*, pour les analyses de l'OPA dans de l'eau, ont obtenu des valeurs de  $K_1$  et  $K_H$  inférieures à 1 et de  $K_2$  supérieures à 1. De plus, ils ont montré une dépendance de ces valeurs en fonction de la température. L'augmentation de la température a pour effet de décaler l'équilibre en faveur des formes acycliques. Ces études ont également montré que les valeurs de  $K_H$  diminuent avec le pourcentage d'eau dans les mélanges eau/Acétonitrile. Cette diminution peut être expliquée par la baisse de l'activité de l'eau due à la solvation dans l'acétonitrile [27].

#### **V.2.4. Etude en fonction du temps**

La densité de courant des pics est étudiée en fonction du temps par voltammétrie cyclique sur une électrode de carbone de 1 mm de diamètre et une électrode de référence de Ag/AgCl pour observer la stabilité de chaque forme du NDA dans le temps. En effet, les expériences en fonction de la concentration étant faites par ajout de NDA dans la solution, nous voulons vérifier la stabilité dans le temps des différentes formes du NDA. Cette étude est faite avec une concentration initiale en NDA égale à 5 mM dans un mélange 50 mM à pH 9 tampon borate/ MeOH (50/50 v/v). La procédure consiste à effectuer une voltammétrie cyclique toutes les 2 minutes pendant 1 heure, puis toutes les 10 minutes pendant 1 heure puis enfin toutes les 30 minutes. Un dégazage de la solution est réalisé entre chaque voltammétrie. Les densités de courant des deux pics sont mesurées en fonction du temps (Figure IV-19).



**Figure IV-19 : Variation des densités de courant des pics 1 et 2 pour une solution de NDA 5 mM dans un mélange tampon 50 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v) en fonction du temps sur une électrode de carbone de 1 mm de diamètre à 100 mV/s.**

Nous observons que les densités de courant des pics 1 et 2 restent relativement constantes au cours du temps pendant au moins 3h. Dans un second temps, le rapport ( $J_{pic_2} - J_{pic_1} / J_{pic_1}$ ) est également tracé en fonction du temps en Figure IV-20, ce rapport représente le ratio  $[MA]/[DA]$  en considérant les deux coefficients de diffusion égaux. Ce rapport de densité de courant reste relativement constant dans le temps et donc le ratio  $[MA]/[DA]$  également. Sachant que le pic 1 correspondant à la concentration en DA est également constant, on peut supposer que la concentration en MA et donc en HAC est aussi relativement constante dans le temps. On peut donc dire que les équilibres sont figés comme supposer dans la partie IV.2.1.1.

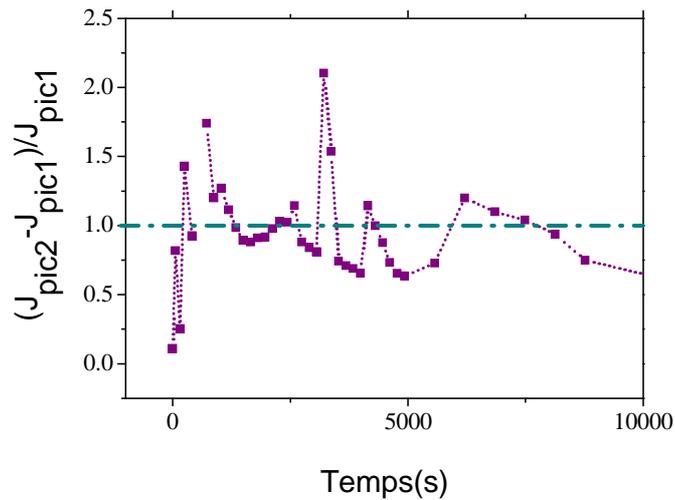


Figure IV-20 : Variation de la densité de courant de  $(J_{pic2} - J_{pic1})/J_{pic1}$  pour une solution de NDA 5 mM dans un mélange tampon 50 mM pH 9 borate/MeOH (50/50 v/v) en fonction du temps sur une électrode de carbone de 1 mm de diamètre à  $v = 100$  mV/s.

En utilisant les formules IV-45 et IV-49 avec les coefficients de diffusion déterminés grâce à la formule de Lulis-Ratcliff, la concentration en chaque forme peut être tracée en fonction du temps (Figure IV-21).

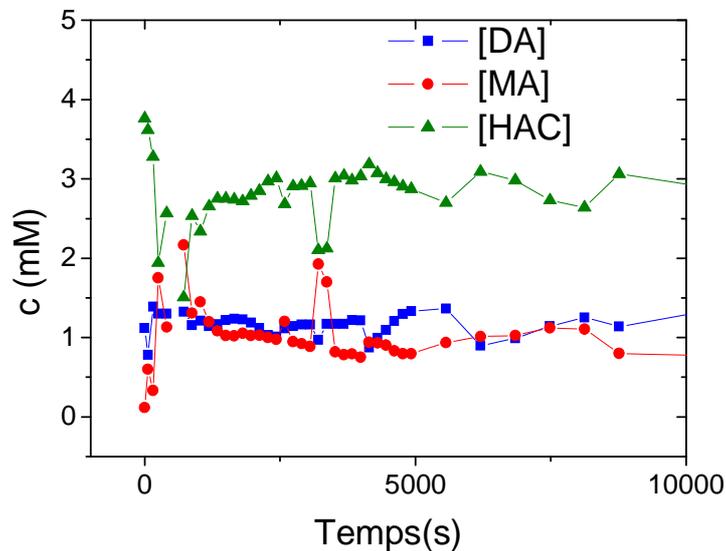


Figure IV-21 : Variation des concentrations en chaque forme pour une solution de NDA 5 mM dans un mélange tampon 50 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v) en fonction du temps sur une électrode de carbone de 1 mm de diamètre. En bleu la concentration en DA, en rouge en MA et en vert en HAC. Les concentrations sont calculées à partir des formules IV-20 et IV-24.

Les concentrations en chaque forme sont donc bien relativement constantes dans le temps et les équilibres figés.

### ***V.3. Dérivation du peptide et des acides aminés***

Comme mentionné au chapitre I.1.1, le peptide de cette étude est celui correspondant aux acides aminés 49 à 70 de la protéine native TTR que nous noterons PN. Ce peptide synthétique est donc composé de 22 acides aminés.

N-term TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK-C term

Le NDA est utilisé pour la dérivation de 4 acides aminés ainsi que pour le PN. Ces quatre acides aminés sont la lysine, la sérine, l'histidine ainsi que la thréonine. Ils sont tous présents dans le peptide PN :

- en position N-terminale ainsi qu'en position 11 et 12 pour la thréonine (T),
- en position 2 et 4 pour la sérine (S),
- en position 8 pour l'histidine (H),
- en position C-terminale pour la lysine (K).

Le choix de ces acides aminés s'est fait en fonction de différents paramètres :

- la position dans le peptide, position terminale pour la thréonine et la lysine,
- la possibilité de double marquage pour la lysine,
- le caractère neutre ou basique de leur chaîne latérale, respectivement pour la l'histidine et la sérine. En effet, l'histidine a un caractère plus basique que la sérine. Cette dernière a une chaîne latérale neutre. Le PN possède deux groupements NH<sub>2</sub> libres, celui de la thréonine en N terminale ainsi que le NH<sub>2</sub> de la chaîne latérale de la lysine.

#### **V.3.3. Sur carbone vitreux**

##### **V.3.3.1 Comparaison avec différents acides aminés (AA)**

La détection de la dérivation du PN est analysée en DPV à 25 mV/s sur une électrode de carbone vitreux de surface 0,071 cm<sup>2</sup>. Nous avons choisi une électrode de carbone vitreux à titre de comparaison avec le carbone azoté amorphe. Dans cette partie la concentration finale en PN est de 25 µM. Les Figures IV-22 et IV-23 montrent les signaux obtenus pour le peptide seul, le NDA seul, et pour la dérivation du PN avec le NDA. La dérivation est réalisée pour un ratio molaire NDA/CN de 1 et un ratio NDA/peptide de 100 dans une solution

tampon borate 100 mM pH 9/MeOH (50/50 v/v). Dans un premier temps, ce pH a été sélectionné en regardant la variation du pic du NDA en fonction du pH. Pour le pH choisi, les concentrations en DA et en MA sont importantes et donc une grande proportion des formes électroactives du NDA peut réagir avec le cyanure et le peptide. En effet, a priori le CBI peut être formé aussi bien à partir du DA que du MA. De plus à ce pH, HAC devient DA suivant une réaction de déshydratation catalytique. Aucun pic de réduction ou d'oxydation n'est observé pour le peptide seul. Ceci confirme que le peptide n'est pas électroactif dans cette fenêtre de potentiel malgré la présence d'un acide aminé électroactif (la tyrosine) dans le PN. On peut supposer que la tyrosine n'est pas accessible dans le peptide pour être oxydée. De plus, le NDA n'est pas électroactif dans la fenêtre des potentiels d'oxydation (Figure IV-22), mais est électroactif dans la fenêtre des potentiels de réduction avec la présence de deux pics de réduction pour les groupements aldéhydiques à -1,35 V/ECS et -1,1 V/ECS (Figure IV-23). Une diminution de la densité de courant pour les pics de réduction des fonctions aldéhydes est observée après dérivation du peptide PN avec le NDA. Cette diminution est due à une consommation du NDA en solution. La diminution des densités de courant des deux pics du NDA libre laisse bien supposer que la dérivation peut s'effectuer aussi bien à partir de la forme non hydratée (DA) que de la forme hydratée (MA). D'autre part, un pic est observé à 0,55 V/ECS pour le PN dérivé correspondant à l'oxydation du CBI, ce pic n'est pas réversible. D'autre part, il y a seulement un pic, ceci confirme que le caractère électroactif de la tyrosine est bien non accessible.

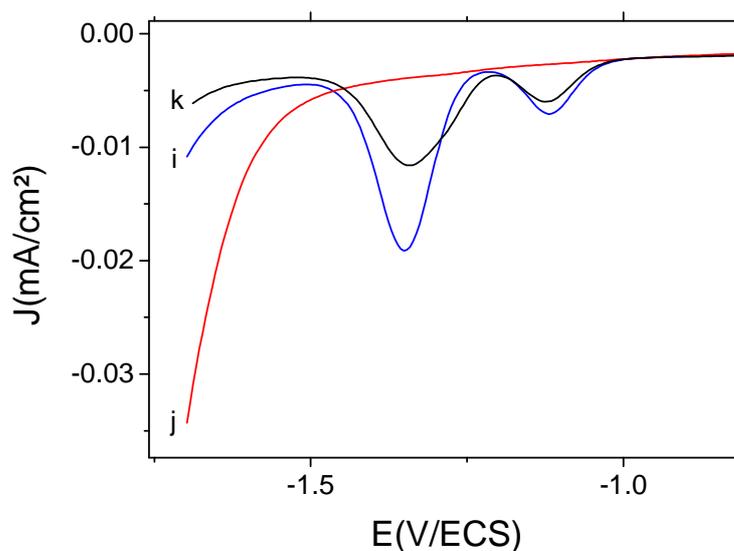


Figure IV-22 : DPV à 25 mV/s sur carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) fenêtre de potentiel de réduction (i) NDA dans le tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH 50/50 v/v. (j) PN dans du tampon 100 mM pH 9 borate. (k) Dérivation du peptide PN avec le NDA dans du tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (50/50), ratio molaire de 100.

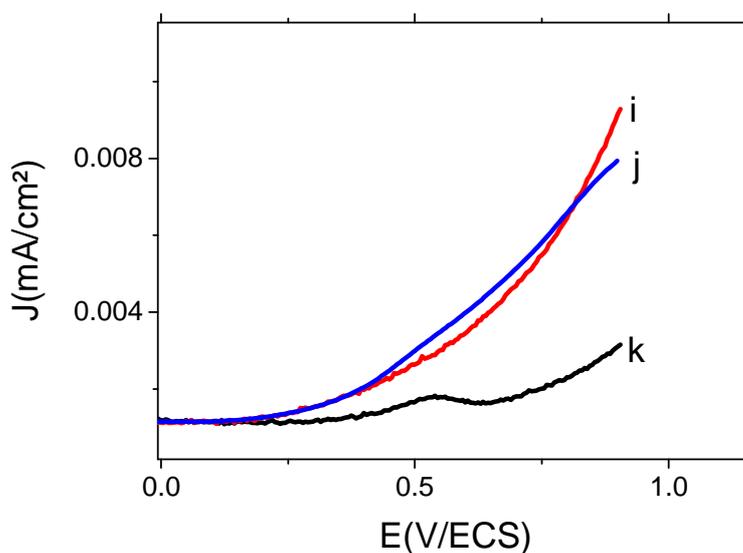


Figure IV-23 : DPV à 25 mV/s sur carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) fenêtre de potentiel d'oxydation. (i) NDA dans le tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH 50/50 v/v. (j) PN dans du tampon 100 mM pH 9 borate. (k) Dérivation du peptide PN avec le NDA dans du tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (50/50), ratio molaire de 100.

### V.3.3.2 Comparaison des différents protocoles de marquage

Nous avons cherché à optimiser le protocole de marquage en DPV, avec une concentration finale en PN de 25  $\mu\text{M}$ . Nous avons fait varier le pH et le ratio NDA/PN dans les proportions suivantes :

- NDA/PN = 100, pH du tampon = 10,
- NDA/PN = 40, pH du tampon = 10,
- NDA/PN = 40, pH du tampon = 9,
- NDA/PN = 100, pH du tampon = 9.

Comme montré sur la Figure IV-24, le pic d'oxydation est situé à 0,55 V/ECS pour tous les protocoles. Cette observation souligne que la réaction n'est pas sensible aux protons. Cependant, la densité de courant du pic dépend du protocole utilisé en particulier en fonction du ratio NDA/PN (Tableau IV-9). Les Figures IV-24 a et d, obtenues pour des ratios de 100 montrent deux pics tandis que les voltammogrammes obtenus avec un ratio de 40 ne présentent qu'un seul pic. Les pics situés à 0,55 V/ECS et 0,69 V/ECS seront appelés pic CBI-PN,1 et CBI-PN,2 respectivement.

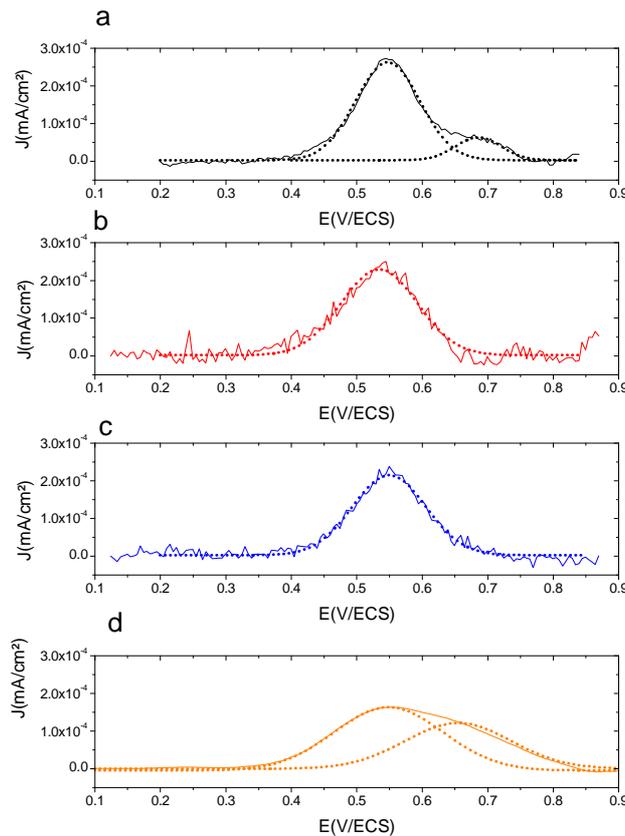


Figure IV-24 : DPV de CBI-PN du PN vitesse de balayage = 25 mV/s. (a) Tampon borate à pH = 10, NDA/PN ratio molaire 100. (b) Tampon borate pH = 9, NDA/PN ratio molaire 40. (c) Tampon borate pH = 10, NDA/PN ratio molaire 40. (d) Tampon borate pH = 9, NDA/PN ratio molaire 100.

Méthode	$J_{\text{CBI-PN},1}$ ( $10^{-4}$ mA/cm <sup>2</sup> )	$J_{\text{CBI-PN},2}$ ( $10^{-4}$ mA/cm <sup>2</sup> )	Aire pic CBI-PN, <sub>1</sub> $\times 10^{-5}$	Aire pic CBI-PN, <sub>2</sub> $\times 10^{-5}$
NDA/PN = 100, pH du tampon = 10,	2,63	0,63	(3.2 ± 0.3)	(0,5 ± 0.1)
NDA/PN = 40, pH du tampon = 10	2,29	-	(3.3 ± 0.2)	-
NDA/PN = 40, pH du tampon = 9	2,15	-	(3.2 ± 0.2)	-
NDA/PN = 100, pH du tampon = 9	1,8	1,07	(3,7 ± 0.3)	(0,7 ± 0.3)

**Tableau IV-9 : Aire des pics en fonction de la méthode de dérivation utilisée sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071$  cm<sup>2</sup>) dans un mélange tampon borate/MeOH ( $v/v$  50/50) et NDA/KCN = 1,  $[\text{PN}]_f = 25$   $\mu\text{M}$ .**

La comparaison des protocoles avec un ratio molaire de 40 aux deux pH montre une aire quasiment identique. De plus, pour un même pH de 10, l'aire du pic pour le premier protocole avec un ratio molaire de 100 est plus importante que celle obtenue avec le ratio 40. De même pour le pH 9, l'aire pour le quatrième protocole avec un ratio 100 est supérieure au protocole à 10 et ratio 100. La densité de courant du pic d'oxydation doit être maximale quand  $\text{pH} \cong \text{pKa}$ , on peut supposer ici que l'on se situe proche du pKa des acides aminés du peptide par lequel il est dérivé [38][39]. Le pKa de la thréonine est de 9,10 et celui de la lysine de 9. Nos observations confirment donc que la densité de courant du pic est maximale autour des pKa des formes dérivées.

Pour les deux protocoles à ratio molaire NDA/peptide = 100, le pic peut être décomposé en deux pics différents, un premier correspondant au doublement dérivé à 0,55 V/ECS et un second correspondant au simplement dérivé à 0,69 V/ECS. Le peptide simplement dérivé est plus difficilement oxydable que les acides aminés, car il possède une chaîne longue composée de 22 acides aminés.

### V.3.3.3 Comparaison avec différents acides aminés.

Le pic du CBI-PN en DPV est comparé aux potentiels de pic pour 4 acides aminés dérivés : CBI-histidine, CBI-lysine, CBI-sérine, CBI-thréonine pour une dérivation à pH 9, avec un rapport NDA/AA ou PN = 100 et  $[\text{PN}]_f = 25$   $\mu\text{M}$  (Figure IV-25). Les valeurs

trouvées figurent dans le Tableau IV-10. Notre étude confirme que le potentiel de pic du CBI est caractéristique de l'acide aminé ou du peptide comme observé par Nussbaum *et al.* [40]. Dans cette étude, le paramètre suivi est le potentiel de demi vague de la dérivation pour 18 acides aminés (NDA/AA = 83 ; NDA/KCN = 0,5) dans un tampon borate pH 9,9 par voltammétrie sur une électrode de carbone vitreux tourante.

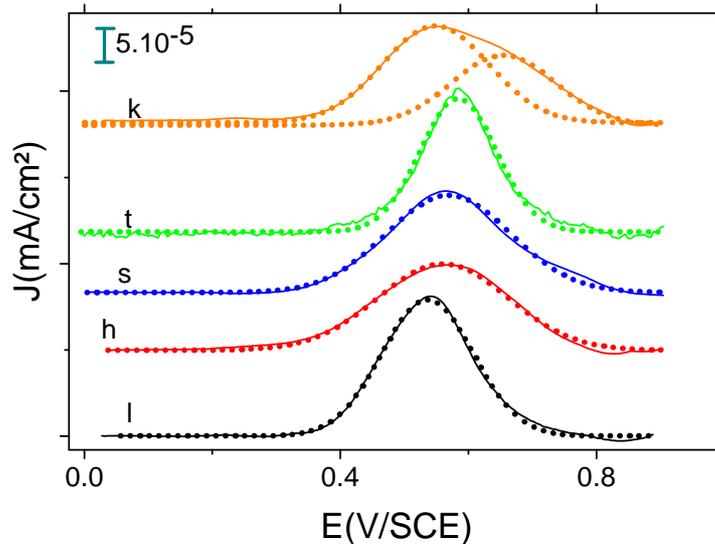


Figure IV-25 : DPV à 25 mV/s sur carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) tampon 100 mM pH 9 / MeOH (50/50 v/v). (h) CBI-(histidine), NDA/histidine = 100. (l) CBI-(lysine), NDA/lysine = 100. (t) CBI-(thréonine), NDA/thréonine = 100. (s) CBI-(serine) NDA/serine = 100. (k) CBI-PN. NDA/PN = 100.  $[\text{PN ou AA}]_f = 25 \mu\text{M}$ .

Acide amine ou peptide	$pK_a$	$E$ (mV)	$L_{1/2}$ (mV)
lysine	9,06	$540 \pm 3$	170
histidine	9,33	$570 \pm 4$	240
thréonine	9,10	$580 \pm 5$	210
serine	9,21	$590 \pm 5$	140
PN simplement marqué	x	$555 \pm 4$	190
PN Doublement marqué		$690 \pm 6$	190

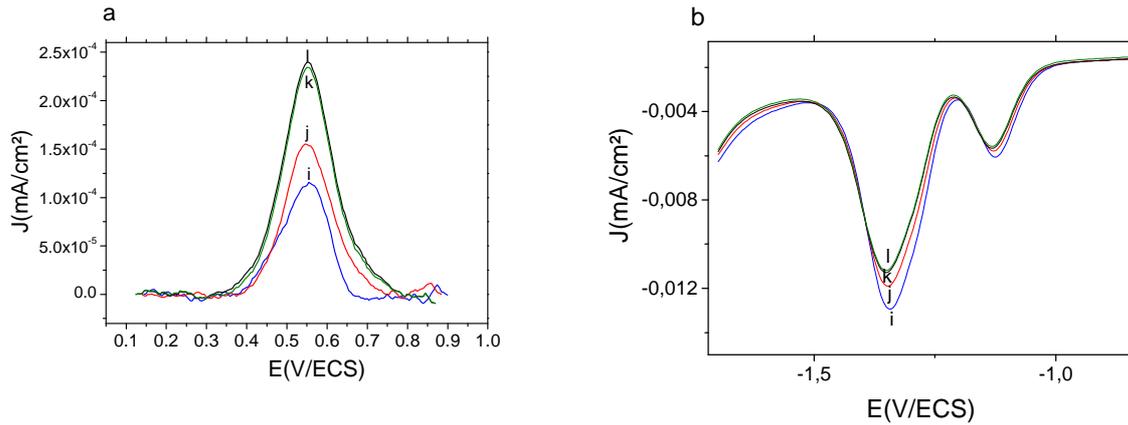
Tableau IV-10 : Valeurs des potentiels de pic et de la largeur à mi hauteur  $L_{1/2}$  pour les différents groupements  $\text{NH}_2$  dérivés, sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) dans tampon 100 mM pH 9 borate/ MeOH (50/50) avec un ratio molaire NDA/(AA ou peptide) de 100 et NDA/KCN = 1,  $[\text{PN ou AA}]_f = 25 \mu\text{M}$ .

Nos résultats montrent que la lysine qui est doublement dérivée est plus facilement oxydable que les 3 autres acides aminés. D'autre part, les acides aminés avec une chaîne plus basique (histidine) sont plus facilement oxydables que ceux avec une chaîne plus acide (sérine). De même, la thréonine possède une chaîne plus acide que l'histidine, mais moins que la sérine. L'ordre des potentiels, selon l'acide aminé, est donc  $E_{p(\text{CBI-lysine})} < E_{p(\text{CBI-histidine})} < E_{p(\text{CBI-thréonine})} < E_{p(\text{CBI-sérine})}$ . Ces résultats sont en accord avec les travaux de Nussbaum *et al.* qui ont suivi des potentiels de demi-vague par voltammétrie. Dans ses conditions l'ordre de potentiels de demi vague était  $E_{p/2(\text{CBI-lysine})} < E_{p/2(\text{CBI-histidine})} < E_{p/2(\text{CBI-thréonine})} < E_{p/2(\text{CBI-sérine})}$  [39].

Le potentiel de pic dépend également du nombre de groupements  $\text{NH}_2$  dérivé et de la longueur de la chaîne peptidique. Le potentiel de pic du CBI-PN est relativement proche de celui du CBI-lysine. Cette observation indique que le CBI-PN est relativement facilement oxydable. En considérant, la séquence de 22 acides aminés du PN, nous supposons que le PN est doublement dérivé, une première fois par la thréonine et une seconde fois par le second groupement  $\text{NH}_2$  de la lysine pour former le CBI-TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK-CBI. Les potentiels de pic sont pour le simplement marqué de 0,55 V/ECS et de 0,69V/ECS pour le doublement marqué.

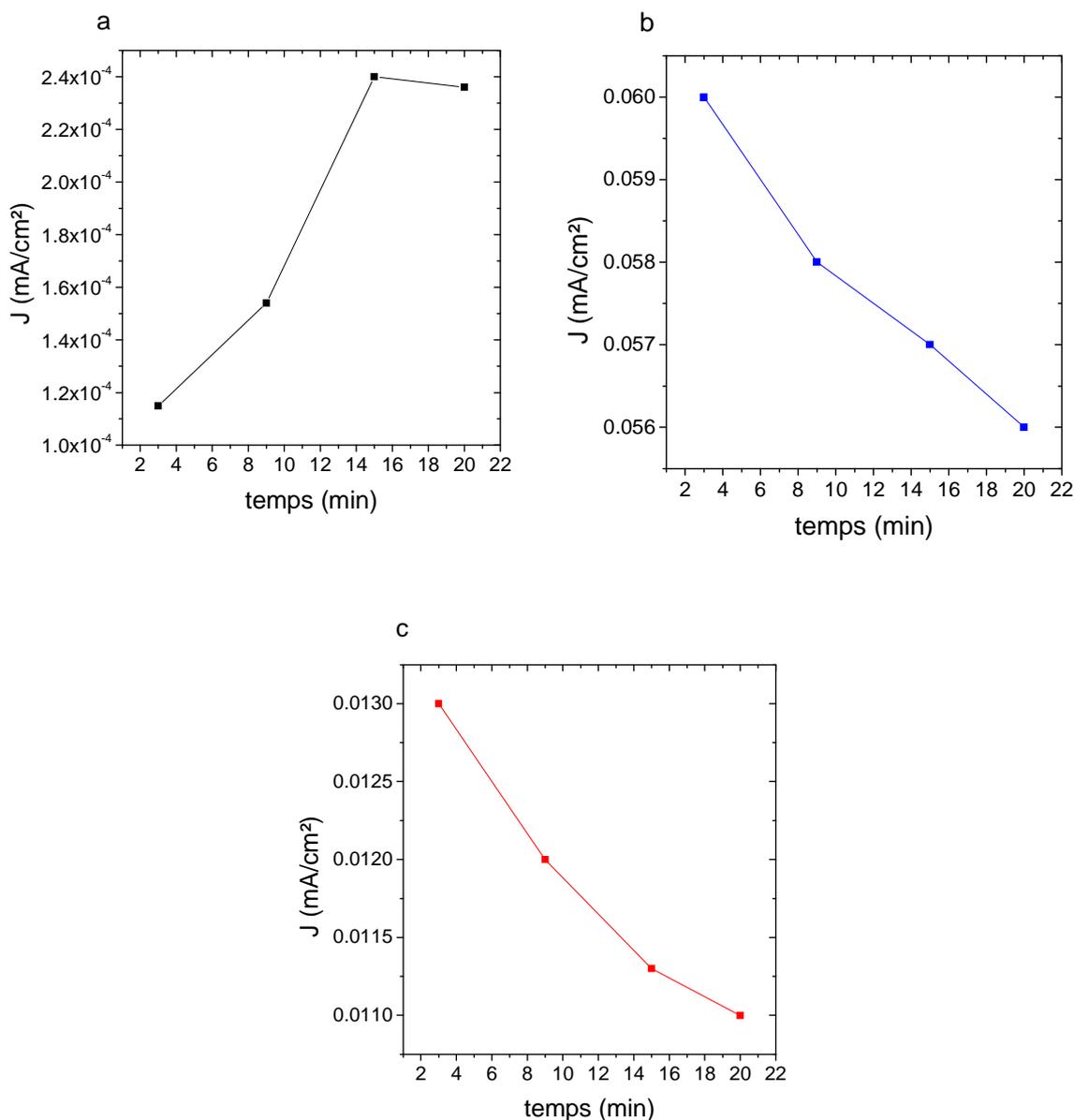
#### **V.3.3.4 Temps de dérivation.**

Un des paramètres important de la dérivation est le temps de celle-ci pour avoir une densité de courant de pic optimale. La variation de densité de courant de pic en fonction du temps est donc étudiée. Le protocole de dérivation est effectué à pH 10 avec un ratio molaire de 40, et  $[\text{PN}]_f = 25 \mu\text{M}$ . Comme observé sur la Figure IV-26 a, la densité de courant du pic augmente avec l'augmentation du rendement de formation du CBI. La densité de courant du pic du CBI peut être corrélée à la diminution de densité de courant de pics de la réduction successive des deux formes aldéhyde du NDA (Figure IV-26b). Le suivi de la diminution de densité de courant des deux pics de réduction du NDA nous permet de suivre la dérivation du peptide PN. Bien qu'un temps de dérivation de 3 minutes soit suffisant pour observer le pic de dérivation du NDA, la densité de courant maximale du pic est obtenue après 15 minutes de dérivation. Pour un temps de 20 minutes la densité de courant ne varie plus.



**Figure IV-26 : DPV du CBI-PN. a) Fenêtre d'oxydation sur une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ), mélange tampon 100 mM pH 10 borate / MeOH (50/50 v/v) ratio molaire NDA(1 mM)/PN(25  $\mu\text{M}$ ) = 40. b) Fenêtre de réduction. (i) Temps de dérivation de 3 min. (j) Temps de dérivation de 9 min. (k) Temps de dérivation de 15 min. (l) Temps de dérivation de 25 min.**

La Figure IV-27 représente les densités de courant des pics pour les deux pics du NDA et pour le pic de dérivation du CBI-PN. Une diminution des deux pics du NDA est observée. Dans le cas du CBI-PN, après 15 minutes, la densité de courant tend à se stabiliser.



**Figure IV-27 : Variation des densités de pic en fonction du temps de dérivation. a) Densité de courant de pic du CBI-PN. b) Densité de courant du premier pic du NDA (correspondant à la réduction de la forme DA). c) Densité de courant du deuxième pic du NDA (correspondant à la réduction des formes DA,r et MA).**

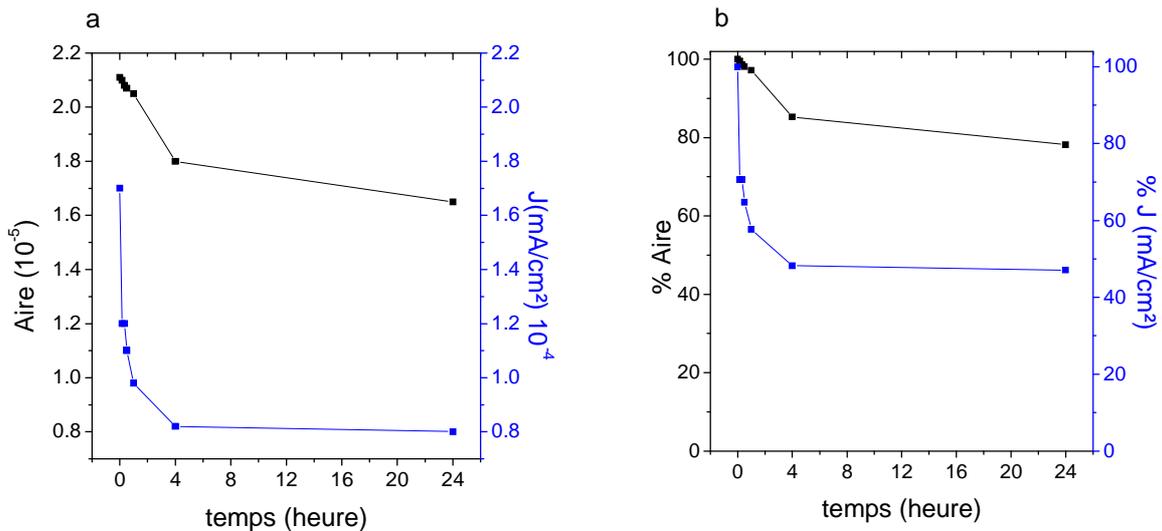
### V.3.3.5 Stabilité de la détection

La stabilité dans le temps du CBI-PN est étudiée. Entre chaque mesure la solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Le temps optimal de dérivation étant de 15 minutes, les mesures de stabilité sont réalisées après un temps initial de dérivation de 15 min. Le Tableau IV-11 répertorie les mesures d'aire du pic ainsi que de la densité de courant. Le pourcentage du pic initial pour ces deux grandeurs est calculé en considérant que 100% correspond au

temps de 15 minutes. La Figure IV-28 montre les variations d'aire et de la densité de courant en fonction du temps ainsi que les variations en pourcentage pour ces deux paramètres.

Temps de dérivation	Aire ( $10^{-5}$ )	J(mA/cm <sup>2</sup> )( $10^{-4}$ )	% Aire	% J(mA/cm <sup>2</sup> )
15 min	2,11	1,7	100	100
+10 min	2,10	1,2	99,5	70,6
+20 min	2,08	1,2	98,6	70,6
+30 min	2,07	1,1	98,1	64,7
+1 h	2,04	0,98	97,1	57,6
+4 h	1,8	0,82	85,3	48,2
+24 h	1,65	0,8	78,2	47,1

**Tableau IV-11 : Valeurs des aires et des densités de courant en fonction du temps de dérivation avec un rapport KCN/NDA = 1 et NDA/PN = 40 , la concentration finale en PN de 25  $\mu$ M dans une solution tampon 100 mM pH 10 borate / MeOH (50/50 v/v).**



**Figure IV-28 : a) Variation de l'aire et de la densité de courant en fonction du temps. b) Variation du pourcentage du pic initial pour l'aire et pour la densité de courant en fonction du temps pour une dérivation avec un rapport KCN/NDA = 1 et NDA/PN = 40 avec la concentration finale en PN de 25  $\mu$ M dans une solution tampon 100 mM pH 10 borate / MeOH (50/50 v/v).**

Ces données montrent que le dérivé CBI-PN est relativement stable dans le temps. En effet, l'aire a diminué seulement de 20 % en 24 h. Cependant, une diminution beaucoup plus importante de la densité de courant est observée, elle est de plus de 50 % sur la même période. Nous observons que les pics ont donc une tendance à s'élargir avec le temps de dérivation. D'autre part, après plusieurs heures, un précipité orangé se forme. Ce précipité est vraisemblablement le CBI-PN car une agitation préalable de la solution avant analyse est

nécessaire pour observer un pic. La réponse de la dérivation du PN a été également étudiée par fluorescence pour un temps de dérivation de 15 min avec un ratio molaire KCN/NDA = 1 et NDA/PN = 40 dans un tampon borate pH 9. Cette étude a montré que le CBI-PN est stable pour au moins 5 heures lorsque celui-ci est conservé à l'abri de la lumière car il photoblanchit rapidement pendant la manipulation de fluorescence [41].

Cette bonne stabilité dans le temps montre que la dérivation pré colonne du peptide peut être envisagée pour une détection par électrochimie, de préférence à une détection optique, où le risque de photoblanchiment est amoindri [42].

### V.3.3.6 Variation de la vitesse de balayage- Détermination du nombre d'électrons échangé.

Pour déterminer le mécanisme de réaction de réduction du CBI, la variation de densité de courant des pics ainsi que le potentiel des pics sont étudiés en fonction de la vitesse de balayage de 100 à 300 mV/s par voltammétrie cyclique. La Figure IV-29 montre la variation de densité de courant selon la vitesse de balayage après soustraction du blanc constitué d'un mélange 50/50 v/v tampon pH 10 borate /MeOH. Nous avons choisi un temps de dérivation du peptide de 15 minutes pour un pH de 10 et un ratio molaire de 40. La concentration en PN finale est de 25  $\mu\text{M}$ .

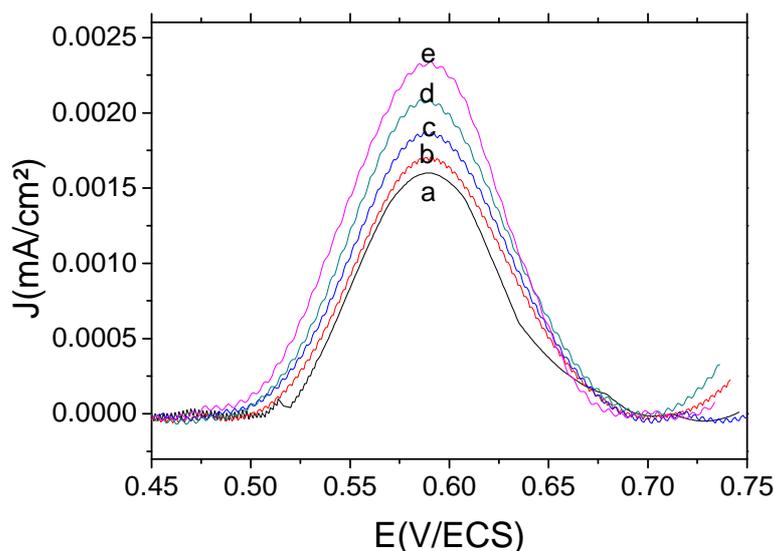


Figure IV-29 : Variation de la densité de courant du pic en fonction de la vitesse de balayage par voltammétrie cyclique sur carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) après soustraction du blanc. Mélange tampon 100 mM pH 10 borate /MeOH (50/50 v/v), ratio molaire NDA/PN = 40 et NDA/KCN = 1 ; vitesse de balayage de : a) 100 mV/s. b) 150 mV/s. c) 200 mV/s. d) 250 mV/s. e) 300 mV/s.  $[\text{PN}]_f = 25 \mu\text{M}$ .

De la même façon que précédemment, le coefficient de diffusion est calculé à l'aide de l'équation de Lysis-Ratcliff. Dans un premier temps, le volume molaire de la molécule et la masse molaire sont calculés dans le cas d'un double marquage. La molécule possède un volume molaire de  $3100 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  et une masse molaire de  $2805 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . La formule de Lysis-Ratcliff donne la valeur de  $1,56 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Le tracé de  $I_{\text{pic}}$  en fonction de  $v^{0,5}$  donne une droite d'équation  $I_{\text{pic}} = 2,29 \cdot 10^{-7} v^{0,5} + 3 \cdot 10^{-8}$ . En appliquant la même formule que précédemment pour le NDA :

$$\left( \frac{\text{pente}}{0,496 \cdot F \cdot C^0 \cdot S \cdot D^{0,5} \cdot \left( \frac{F}{R \cdot T} \right)^{0,5}} \right) = n \cdot \quad \text{Equation IV-31}$$

On trouve une valeur de  $n$  de 3,8 soit 4 électrons.

Dans les études en milieu aqueux/ acétonitrile, l'oxydation du dérivé provenant de l'OPA apparaît être un transfert de 2 électrons [5]. Pour cela, le 1-tert-butylthiol-2-n-propylisoindole a été synthétisé et l'intensité du pic en voltammétrie cyclique a été comparée à celui de la méthylhydroquinone. Dans le cas de l'OPA et du NDA, c'est le groupement isoindole qui est électroactif. On peut supposer que chaque groupement isoindole induit une oxydation à deux électrons en milieu aqueux. On retrouve bien que le dérivé du peptide est doublement marqué. Le CBI-PN possède deux groupements isoindoles ce qui explique le fait d'avoir 4 électrons transférés lors de la réaction d'oxydation.

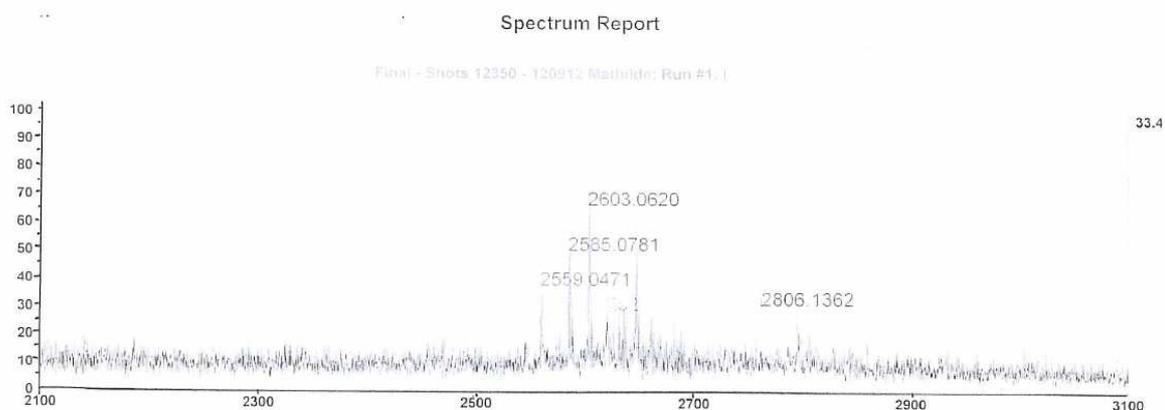
### V.3.3.7 Confirmation de la double dérivation par spectrométrie de masse.

Une analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) est réalisée sur une solution contenant le CBI-PN (Figure IV-30). Cette analyse est réalisée à la plateforme de spectrométrie de masse et protéomique de l'UPMC. Cette technique est caractérisée par la finesse des pics et donc possèdent une bonne résolution. Le MALDI (désorption-ionisation laser assistée par matrice) est une ionisation douce couramment utilisée pour l'analyse de biomolécule. Le mélange matrice/échantillon déposé sur une surface métallique est désorbé et ionisé à l'aide d'un faisceau laser. L'ionisation peut conduire à la formation d'ions monochargés, des ions  $[\text{Molécule} + n\text{H}^+]^{n+}$  ou encore d'adduit avec d'autres ions comme  $[\text{molécule} + \text{Na}]^+$ . L'analyseur à temps de vol (TOF) mesure le temps que met un ion à

parcourir une distance après avoir été accéléré par un champ électrique. Les ions de rapport masse/charge plus petit parviendront au détecteur en premier. La masse molaire du peptide seul est de  $2455,5 \text{ g.mol}^{-1}$ , la masse du simplement marqué est donc de  $2630 \text{ g.mol}^{-1}$  et celle du doublement marqué est de  $2805 \text{ g.mol}^{-1}$ . En effet lors de dérivation, le peptide perd deux hydrogènes, tandis que le NDA perd ces deux oxygènes ainsi que un hydrogène pour former le dérivé. A cette masse, il faut également ajouter la masse du cyanure. La masse du peptide simplement marqué vaut donc :  $M(\text{peptide}) + M(\text{NDA}) - 2*M(\text{H}) + M(\text{CN}) - 2*M(\text{O}) - M(\text{H})$ . La masse du NDA vaut  $184 \text{ g.mol}^{-1}$ . Dans le cas du peptide doublement marqué la masse vaut donc :  $M(\text{peptide}) + 2* M(\text{NDA})-2*2*M(\text{H}) + 2* M(\text{CN})-2* 2 M(\text{O})-2*M(\text{H})$ .

La dérivation est réalisée avec un ratio NDA/PN = 100 et NDA/CN =1 dans un tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v). La concentration finale en PN est de 25  $\mu\text{M}$ . Pour éliminer les sels présents dans notre solution celle-ci est passer à travers un ZIP-TIP (extraction sur phase solide) pour les éliminer.

La masse  $m/z = 2603$  (Figure IV-30) correspond au simplement dérivé qui a perdu le cyanure ( $M(\text{simplement dérivé})-M(\text{HCN})$ ). La masse  $m/z = 2806$  correspondant à correspond au double dérivé ionisé. Les deux autres pics sont à 2585,07 et 2559,04 sont également présents dans le blanc et ne sont donc pas des peptides dérivés.



**Figure IV-30 : Spectre de masse du CBI-PN, NDA/PN = 100 et NDA/CN =1 dans un tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v).**

La spectrométrie de masse confirme que l'on a bien le simplement dérivé et le doublement dérivé en solution.

### V.3.3.8 Limite de détection

La limite de détection en CBI est déterminée en gardant un rapport KCN/NDA NDA/PN constant. L'étude est effectuée avec un pH de 10 et un ratio molaire NDA/PN de 40. Les pics du CBI-PN sont toujours situés à 0,55 V/ECS. Quand la concentration en PN augmente, le rendement de formation du CBI-PN augmente également. Le potentiel de pic est indépendant de la concentration en CBI-PN formé (Figure IV-31). Donc  $\partial E_p / \partial(\log(\text{concentration})) = 0$ , il n'y a pas de réaction de type second ordre.

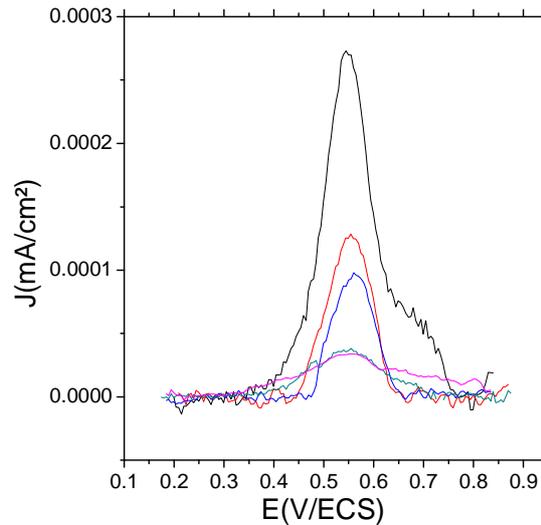


Figure IV-31 : Variation de la densité de pic en fonction de la concentration totale en PN dans le mélange tapon borate 100 mM pH 10 /MeOH (50/50 v/v).

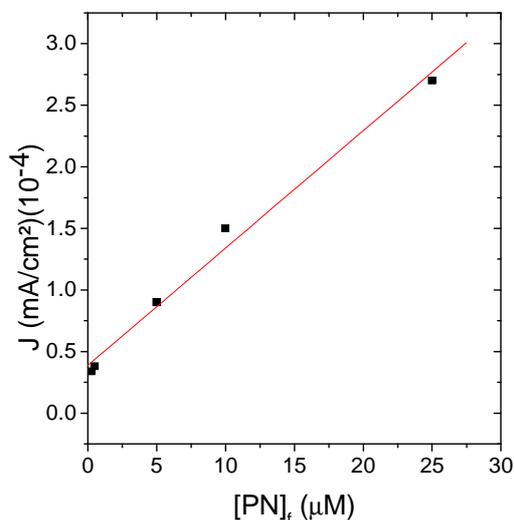
Les résultats des aires et des densités de courant pour le pic du CBI -PN sont répertoriés dans le Tableau IV-12.

[NDA] <sub>f</sub> (mM)	[PN] <sub>f</sub> (µM)	Aire (10 <sup>-5</sup> )	<i>J</i> doublement marqué (mA/cm <sup>2</sup> )(10 <sup>-4</sup> )
1	25	3,7	2,7
0,4	10	1,9	1,5
0,2	5	1,55	0,9
0,02	0,5	0,75	0,38
0,01	0,25	0,73	0,34

Tableau IV-12 : Variation de la densité de courant de pic et d'aire en fonction de la concentration en PN final dans le mélange tapon borate 100 mM pH 10 /MeOH (50/50 v/v).

De plus, on observe le simplement marqué seulement pour la concentration la plus élevée en PN. Il faut une concentration suffisamment importante pour avoir une proportion visible de simplement marqué.

La Figure IV-32 montre la variation de la densité de courant en fonction de la concentration en peptide final. La densité de courant du pic varie bien linéairement avec la concentration en PN.



**Figure IV-32: Variation de J pour le doublement dérivé en fonction de la concentration en PN final pour une dérivation avec un rapport KCN/NDA =1 et NDA/PN =40 dans une solution tampon 100 mM pH 10 borate/ MeOH (50/50 v/v) pour un temps de dérivation de 15 minutes.**

La courbe de calibration ne passe pas par l'origine. Ceci peut être dû à la présence à la fois du simplement dérivé et du doublement dérivé. En effet, on peut supposer que les pics plus larges au faible concentration sont causés par la présence à la fois du simplement dérivé et du doublement dérivé, ce qui a tendance à augmenter l'intensité du signal si on considère seulement la présence doublement marqué.

### V.3.4. Sur CN<sub>x</sub> 15 % déposé sur ITO

#### V.3.4.1 Comparaison avec différents AA par DPV avant et après activation dans KCl 0,5M.

Les électrodes dans la puce microfluidique devant être en CN<sub>x</sub>, la dérivation est réalisée sur les dépôts de CN<sub>x</sub> P15 avec un temps de 20 min et une puissance de dépôts de 200 W. Les conditions optimales de marquage pour une détection électrochimique, optimisées sur carbone vitreux, sont utilisées dans cette étude. La dérivation est donc réalisée dans un tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v). Le ratio molaire de NDA/CN = 1 et NDA/AA ou NDA/PN vaut 100. La concentration finale en acides aminés ou en peptide vaut 25 µM. Le temps de dérivation est fixé à 15 minutes. Trois expériences sont réalisées pour

chaque dérivation. Ces expériences sont faites à chaque fois sur des électrodes de CNx P15 différentes. Le protocole de dépôts et de réalisation des électrodes est le même que celui du chapitre III.1.2.3 et III.3. Les expériences sont faites en DPV à 25 mV/s.

### V.3.4.1.1 CNx sans activation électrochimique

Dans un premier temps, les expériences sont effectuées sur les dépôts de CNx P15 sans prétraitement particulier. La Figure IV-33 montre les voltammogrammes pour les CBI des 4 acides aminés, ainsi que le CBI-PN. Les traits pleins correspondent aux voltammogrammes expérimentaux et les pointillés aux simulations par une fonction type courbe de Gauss.

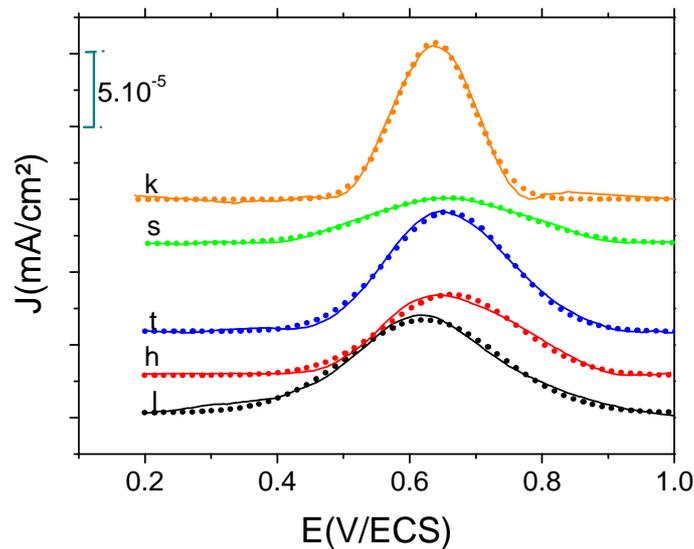


Figure IV-33 : DPV à 25 mV/s sur CNx P15 ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) dans un tampon 100 mM à pH 9 borate/MeOH (50/50 v/v), dérivation avec un ratio NDA/CN = 1 et NDA/(AA ou PN) = 100. (h) CBI-histidine.(l) CBI-lysine. (t) CBI-thrionine. (s) CBI-serine. (k) CBI-PN. En trait plein le voltammogramme expérimental et en pointillé la simulation correspondante.  $[AA \text{ ou PN}]_t = 25 \mu\text{M}$ .

Le Tableau IV-13 résume les valeurs des potentiels, des aires, des densités de courant et des largeurs à mi-hauteur,  $L_{1/2}$ , pour chaque pic selon les différents acides aminés ou peptide dérivés.

	E (mV/ECS)	Aire ( $10^{-5}$ )	$L_{1/2}$ (mV)	J(mA.cm <sup>2</sup> ) ( $10^{-5}$ )
Serine	650±50	0,9±0,1	280	3,1±0,7
Thrionine	650±60	1,3±0,7	250	4,1±0,9
Lysine	610±20	1,8±0,8	220	4,5,±1

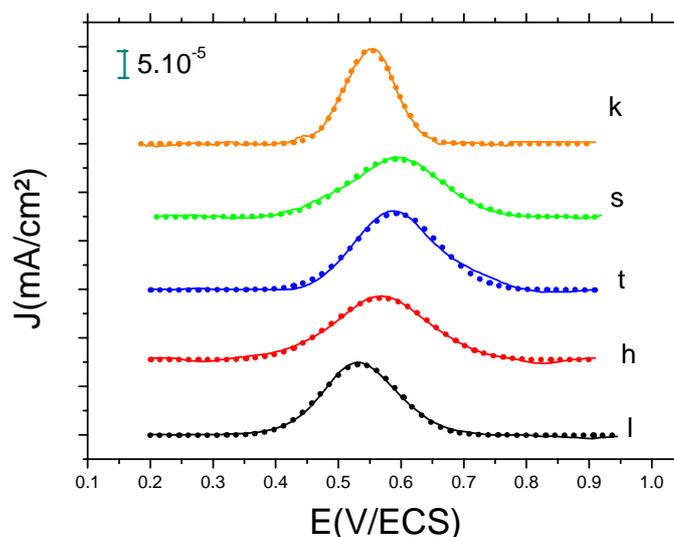
Histidine	640±40	1,8±0,6	250	8±0,9
Peptide PN	640±20	2,1±0,9	170	11±1

**Tableau IV-13 : Valeurs des potentiels de pic, de l'aire, de la densité de courant des pics ainsi que de la largeur à mi-hauteur pour les différents CBI-R. Résultats sans activation préalable des électrodes P15.**

Les voltammogrammes cycliques sans prétraitement particulier du CNx montrent des pics larges et possèdent une densité de courant de pic relativement faible. De plus, les valeurs de potentiels des pics ainsi que des écarts type importants ne permettent pas d'identifier clairement l'acide aminé dérivé comme sur le carbone vitreux. Toutes ces valeurs sont dues à la réactivité non contrôlée du a-CNx déposé sur ITO sans activation. En effet, bien que le CBI-lysine soit bien la molécule avec le potentiel de pic le plus faible, les autres acides aminés possèdent relativement tous la même valeur de potentiel de pic. Une étape de prétraitement est absolument nécessaire pour caractériser clairement la dérivation des espèces marquées.

#### V.3.4.1.2 CNx avec activation électrochimique

Bien que les électrodes de a-CNx soient généralement prétraitées dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M [41], nous avons montré dans le chapitre III.3.1.2 que ce prétraitement était trop agressif dans le cas d'électrodes verre/ITO/CN<sub>0,26</sub>. L'activation électrochimique des électrodes pour la détection de la dérivation est décrite dans la partie III.3.3. La Figure IV-34 montre les résultats des dérivations des 4 acides aminés et du peptide sur ces électrodes activées électrochimiquement.



**Figure IV-34 : DPV à 25 mV/s sur les électrodes CNx P15 activées électrochimiquement (S = 0,282 cm<sup>2</sup>) dans un tampon 100 mM pH 9 borate, dérivation avec un ratio NDA/CN = 1 et NDA/(AA ou PN) = 100.**

(h) CBI-histidine.(l) CBI-lysine. (t) CBI-thréonine. (s) CBI-serine. (k) CBI- PN. en trait plein le voltammogramme expérimental et en pointillé la simulation correspondante.  $[AA \text{ ou } PN]_f = 25 \mu\text{M}$ .

Le Tableau IV-14 résume les valeurs des potentiels de pic, des aires, des densités de courants et des largeurs à mi-hauteur des pics selon les différents acides aminés ou peptide analysés sur CNx P15 activée électrochimiquement.

	E(mV/ECS)	Aire ( $10^{-5}$ )	$L_{1/2}$ (mV)	J(mA.cm <sup>-2</sup> ) ( $10^{-4}$ )
Serine	590±5	3,5±0,5	180	2,9±0,7
Thréonine	580±3	4,5±0,5	150	2,8±0,5
Lysine	537±3	5,3±0,5	140	2,9±0,2
Histidine	570±5	4,0±0,3	170	2,5±0,3
Peptide PN	552±3	4,4±0,4	100	3,2±0,6

**Tableau IV-14 : Valeurs des potentiels de pic, de l'aire, de la densité de courant des pics ainsi que de la largeur à mi- hauteur pour les différents CBI(-R) dans un tampon 100 mM pH = 9 borate / MeOH (50/50 v/v), dérivation avec un ratio NDA/CN = 1 et NDA/(AA ou PN) = 100. Résultats obtenus après activation**

L'activation électrochimique dans KCl a permis de mieux caractériser la dérivation électrochimique. Les avantages sont les suivants :

- les potentiels de pic ont été diminués de 60 à 88 mV grâce à l'activation. D'autre part, les potentiels de pics sont plus repérables avec un écart type 6 à 20 fois plus petit. Un même ordre des potentiels que sur carbone vitreux est observé selon le groupement R-NH<sub>2</sub> dérivé avec  $E_{p(\text{CBI-lysine})} < E_{p(\text{CBI-PN})} < E_{p(\text{CBI-histidine})} < E_{p(\text{CBI-thréonine})} < E_{p(\text{CBI-sérine})}$ ,
- les aires des pics sont multipliées par 2 ou 4 et la densité de courant des pics par 3 à 9 selon l'acide aminé ou le peptide à l'aide de l'activation. Le facteur multiplicatif qu'entraîne l'activation est répertorié dans le Tableau IV-15,
- la largeur à mi-hauteur a été diminuée de 70 à 100 mV. Les largeurs à mi-hauteur sont donc diminuées d'au moins un facteur 0,6 après l'activation.

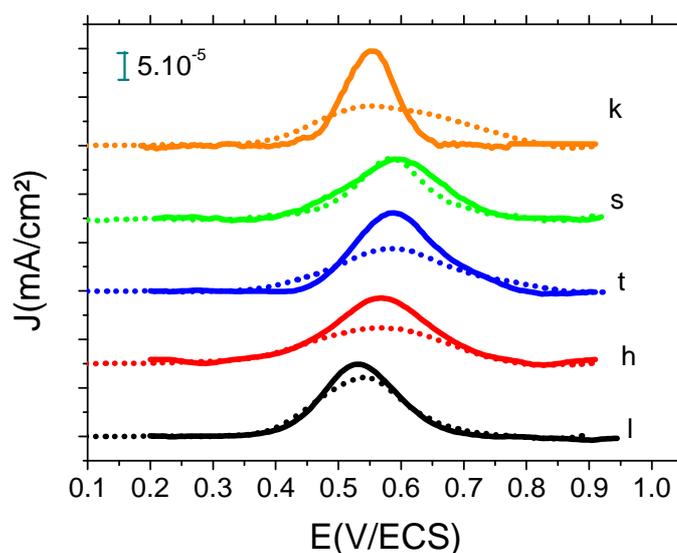
	Facteur multiplicatif pour l'aire	Facteur multiplicatif pour J
Serine	3,9	9,4
Thréonine	3,5	6,8
Lysine	2,9	6,4
histidine	2,2	3,1
Peptide PN	2,1	2,9

**Tableau IV-15 : Valeurs du coefficient multiplicatif de l'aire et de la densité de courant de l'aire des pics pour les différents CBI(-R) dans un tampon 100 mM à pH 9 borate /MeOH (50/50v/v), dérivation avec un ratio NDA/CN = 1 et NDA/(AA ou PN) = 100. Electrode P15 ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ).**

L'activation des films de a-CN<sub>x</sub> a donc permis une meilleure définition des pics avec une aire et une densité de courant plus importantes. Cette activation a également permis de caractériser l'acide aminé et le peptide dérivé par rapport à son potentiel de pic. De plus, le CBI-AA et le CBI-PN pourraient être caractérisés par leur largeur à mi-hauteur,  $L_{1/2}$ , et leur potentiel  $E_p$ . Le protocole de dérivation avec un pH de dérivation a été optimisé pour la détection du CBI-PN, il est logique que la densité de courant soit plus importante pour le CBI-PN que pour les acides aminés, celle-ci étant optimale lorsque  $\text{pH} \cong \text{pKa}$ .

#### V.3.4.1.3 Comparaison sur carbone vitreux et sur a-CN<sub>x</sub> avec et sans activation

Les voltammogrammes de la dérivation réalisés sur CN<sub>x</sub> P15 après activation et sur carbone vitreux sont comparés sur la Figure IV-35.



**Figure IV-35 : DPV à 25 mV/s dans un tampon 100 mM à pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v), dérivation avec un ratio NDA/CN = 1 et NDA/(AA ou PN) = 100. (h) CBI-histidine. (l) CBI-lysine. (t) CBI-thréonine. (k) CBI-PN. En trait plein sur CN<sub>x</sub> P15 activée ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ) et en pointillés sur carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ).**

On peut voir que les pics sont plus fins et mieux définis sur les électrodes de CN<sub>x</sub> P15 activées que sur les électrodes de carbone vitreux. Bien que, les aires des pics sur ces deux types d'électrode soient quasi identiques, les électrodes de CN<sub>x</sub> donnent une meilleure réponse, car les pics sont plus fins. De plus, les potentiels de pics sont similaires sur CN<sub>x</sub> et

sur carbone vitreux. A ce stade, la double dérivation du peptide n'est pas visible clairement sur les électrodes de CNx, un seul pic très fin est observé pour cette dérivation, un autre type d'activation électrochimique devrait augmenter la réactivité des dépôts. On peut supposer que la double dérivation n'est pas visible sur a-CNx et dépend du type d'activation des électrodes qui reste encore à optimiser en fonction de l'application visée.

Pour comparer les paramètres tels que la largeur à mi-hauteur, la densité de courant, et l'aire pour les trois types d'électrodes (carbone vitreux, CNx sans activation, CNx avec activation), des histogrammes de ces valeurs sont tracés en fonction de l'acide aminé et du type d'électrode (Figure IV-36, Figure IV-37, Figure IV-38). Ces histogrammes ne comparent pas les valeurs pour le peptide, car aucun épaulement de pic n'est visible sur CNx aussi bien avant qu'après dérivation.

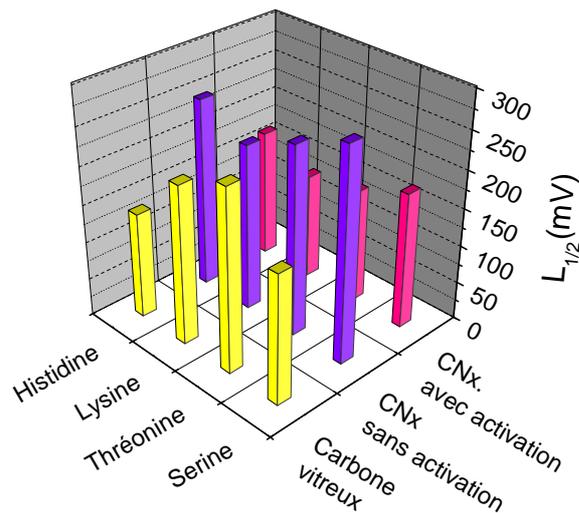
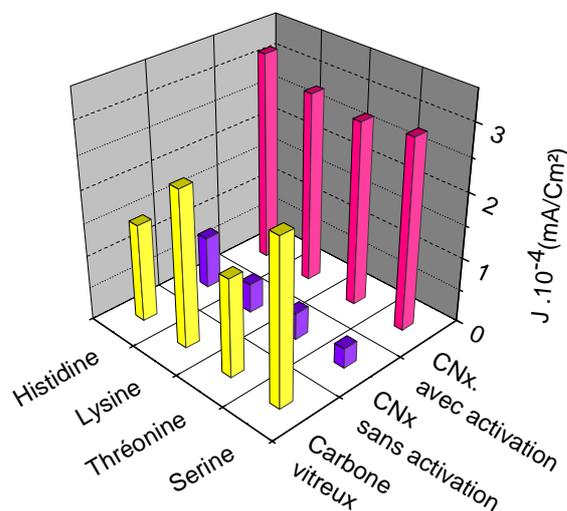


Figure IV-36 : Valeurs de  $L_{1/2}$  en fonction de l'acide aminé dérivé (lysine, thréonine, histidine et sérine) et du type d'électrode c'est-à-dire carbone vitreux, a-CNx sur ITO P15 non activée et activée. Dérivation dans un mélange tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH 50/50 (v/v), NDA/KCN = 1, NDA/AA = 100 pour une concentration en AA de 25  $\mu$ M.

Les valeurs de  $L_{1/2}$  sont beaucoup plus importantes sur CNx sans activation que sur les deux autres types d'électrode. Les électrodes de CNx après prétraitement possèdent des pics plus fins pour la lysine, l'histidine et la thréonine, avec une largeur à mi-hauteur de 30 à 40 mV inférieure. Tandis que pour la sérine,  $L_{1/2}$ , est inférieure sur carbone vitreux de 40 mV par rapport aux électrodes CNx après activation.

La comparaison des densités de courant pour les trois électrodes montre que  $I_{\text{CNx après activation}} > I_{\text{Carbone vitreux}} > I_{\text{CNx avant activation}}$  pour tous les acides aminés. Les densités de courant sont 1,2 à 1,7 fois supérieures sur CNx après activation que sur carbone vitreux.



**Figure IV-37 : Valeurs de  $J$  en fonction de l'acide aminé dérivé (lysine, thréonine, histidine et sérine) et du type d'électrode c'est-à-dire carbone vitreux, a-CNx sur ITO P15 non activée et activée. Dérivation dans un mélange tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH 50/50 (v/v) , NDA/KCN = 1, NDA/AA = 100 pour une concentration en AA de 25  $\mu\text{M}$ .**

La comparaison des densités de courant pour les trois électrodes montrent que  $A_{\text{CNx après activation}} > A_{\text{Carbone vitreux}} > A_{\text{CNx avant activation}}$  pour l'histidine, la thréonine et la lysine. Dans le cas de la sérine  $A_{\text{Carbone vitreux}} > A_{\text{CNx après activation}} > A_{\text{CNx avant activation}}$ . Cependant cette augmentation d'aire reste relativement faible.

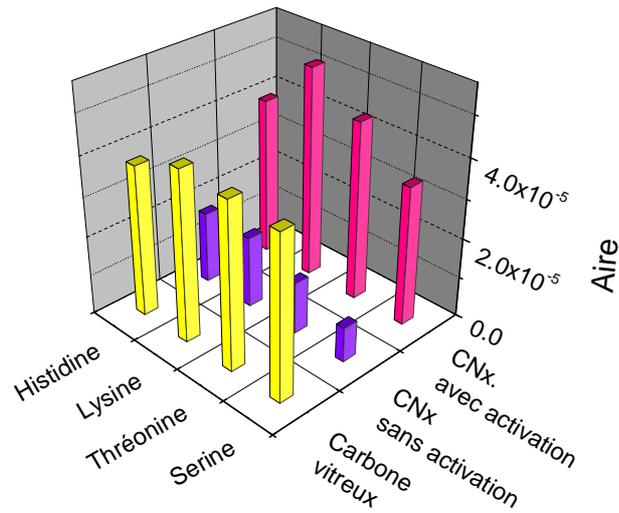


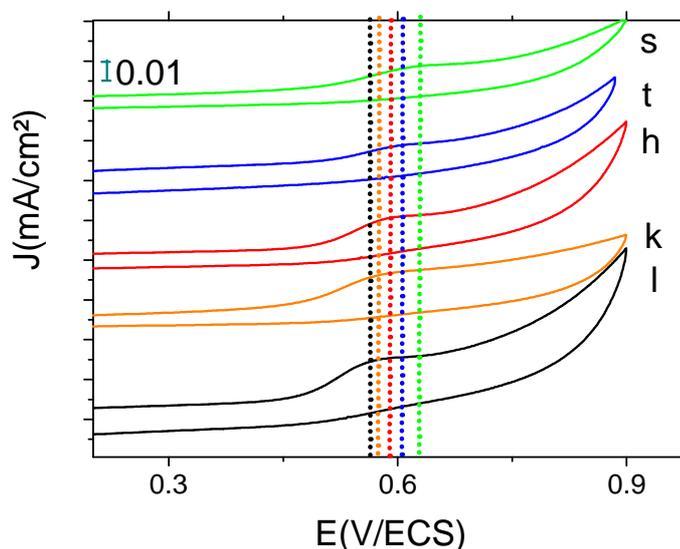
Figure IV-38 : Valeurs des aires en fonction de l'acide aminé dérivé (lysine, thréonine, histidine et sérine) et du type d'électrode c'est-à-dire carbone vitreux, a-CN<sub>x</sub> sur ITO P15 non activée et activée dans un mélange tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH 50/50 (v/v), NDA/KCN = 1, NDA/AA = 100 pour une concentration en AA de 25  $\mu$ M.

En résumé, la détection sur a-CN<sub>x</sub> sans activation est moins bonne que sur les deux autres types d'électrodes avec des aires et des densités de courant plus faibles et des largeurs à mi-hauteur plus importantes.

De plus, les densités de courants des pics sont supérieures et les valeurs de largeur de pic sont inférieures sur a-CN<sub>x</sub> avec activation par rapport à l'électrode en carbone vitreux, bien que les aires soient relativement proches. On peut supposer que lorsque les matériaux ont une réactivité suffisante, l'aire des pics va dépendre principalement de l'acide aminé dérivé indifféremment du matériau d'électrodes choisi, tandis que la largeur à mi-hauteur et la valeur de  $J$  vont dépendre des caractéristiques de l'électrode.

#### V.3.4.2 Comparaison entre différents acides aminés par Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) après activation du CN<sub>x</sub>

Les électrodes de CNx subissent le même protocole de prétraitement défini précédemment. Dans un premier temps, une voltammétrie de la solution de dérivation est réalisée sur chaque électrode à 100 mV/s (Figure IV-39). Les expériences sont effectuées pour les 4 acides aminés et le PN sur trois échantillons de CNx P15 différents.



**Figure IV-39 :** Voltammétrie cyclique à 100 mV/s sur CNx P15 activée ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ). (h) CBI-histidine NDA/histidine = 100. (l) CBI-lysine, NDA/lysine = 100. (t) CBI-thréonine, NDA/thréonine =100. (s) CBI-serine, NDA/serine = 100. (k) CBI-PN, NDA/PN.

Par la suite, les mesures par SIE sont réalisées sur la même électrode de CNx autour du potentiel de pic CBI(-RNH<sub>2</sub>). La voltammétrie cyclique nous permet de déterminer le potentiel de pic du CBI(-RNH<sub>2</sub>) pour l'analyse en SIE. De même que précédemment, le potentiel de pic dépend de l'AA ou du peptide dérivé. Les pointillés sur le graphique représentent la valeur pour laquelle la SIE est réalisée. Les diagrammes de Nyquist sont simulés avec le logiciel Simad en utilisant le circuit décrit dans la partie III.3.3. Ici la réaction faradique est l'oxydation du CBI. La Figure IV-40 montre respectivement les diagrammes de Nyquist expérimentaux et simulés.

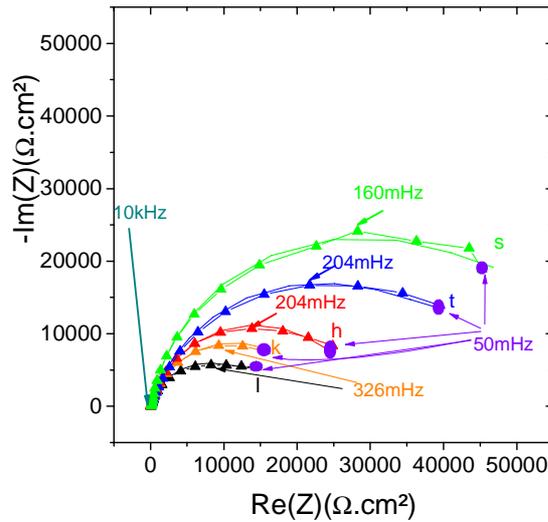


Figure IV-40 : Impédance au potentiel de pic sur CNx P15 activée ( $S = 0,282 \text{ cm}^2$ ). (h) CBI-histidine, NDA/histidine = 100. (l) CBI-lysine, NDA/lysine = 100. (t) CBI-thréonine, NDA/thréonine = 100. (s) CBI-serine, NDA/serine = 100. (k) CBI-PN, NDA/PN.

Les valeurs de  $R_e$  de la même façon que dans le chapitre III.3.2.1 sont mesurées à l'aide d'une électrode de platine. Le Tableau IV-16 répertorie les valeurs des  $R_e$  en fonction de la molécule dérivée. La valeur de  $R_e$  est indépendante de la concentration en acide aminé ou en peptide et ne dépend que de la concentration en électrolyte (tampon borate). En effet la concentration en tampon borate (100 mM) est largement supérieure à la concentration en AA ou PN (25  $\mu\text{M}$ ). C'est pour cette raison que la valeur de  $R_e$  est moyennée dans le tableau suivant.

	Lysine	Serine	Thréonine	Histidine	Peptide	moyenne
$R_e(\Omega.\text{cm}^2)$	14,1	29,6	19,7	16,9	28,2	22±7

Tableau IV-16 : Valeurs des résistances d'électrolyte pour nos différentes solutions dans le cas d'une dérivation avec  $\text{KCN}/\text{NDA} = 1$ ,  $\text{NDA}/(\text{RNH}_2) = 100$   $[\text{RNH}_2]_{\text{final}} = 25 \mu\text{M}$  dans un mélange tampon 100 mM pH 9 borate/MeOH (50/50 v/v) sur une électrode de a-CNx sur ITO P15.

Les résultats de la simulation sur le logiciel Simad pour chaque molécule dérivée sont reportés dans le Tableau IV-17. La capacité  $C_d$  équivalente est calculée à l'aide de la formule de Brug (équation III-9 et III-10). Dans ce tableau,  $\bar{X}$  représente la moyenne des valeurs.

		$R_{HF}$ ( $\Omega.cm^2$ )	$Q$ ( $F.s^{(\alpha-1)}.cm^{-2}$ ) ( $10^{-5}$ )	$\alpha$	$R_t$ ( $\Omega cm^2$ )	$Cd$ ( $\mu F/cm^2$ )	$\chi^2$
Lysine E =0,56 V/ECS	1	62	2,8	0,87	12900	10,8	1,9
	2	50	2,0	0,89	12995	8,3	1,3
	3	45	1,6	0,91	13300	7,6	1,6
	$\bar{X}$	52±8	2,1±0,6	0,89±0,02	(1,30±0,03) $10^4$	9±2	-
Serine E =0,63 V/ECS	1	121	1,6	0,91	49070	4,9	2,3
	2	107	1,8	0,87	47400	3,2	2,4
	3	112	1,8	0,89	50480	4,3	2,3
	$\bar{X}$	113±6	1,7±0,1	0,89±0,02	(4,9±0,2) $10^4$	4,1±0,9	-
Thréonine E =0,61 V/ECS	1	132	1,8	0,83	39480	1,6	2,9
	2	31	1,6	0,92	38350	5,7	1,2
	3	90	1,7	0,92	39200	6,0	1,1
	$\bar{X}$	80±50	1,7±0,1	0,89±0,05	(3,90±0,06) $10^4$	5±3	-
Histidine E =0,59 V/ECS	1	48	2,9	0,86	27100	10,0	1,3
	2	75	1,5	0,91	26175	7,6	1,3
	3	42	2,5	0,86	26620	8,1	3
	$\bar{X}$	60±20	2,3±7	0,88±0,03	(2,66±0,05) $10^4$	9±1	-
Peptide E =0,57 V/ECS	1	48	3,0	0,86	21030	10,4	1,7
	2	85	2,0	0,85	21715	6,4	2,0
	3	45	1,6	0,90	20300	7,3	2,1
	$\bar{X}$	60±20	2,2±0,7	0,87±0,03	(2,10±0,07) $10^4$	8±2	-

**Tableau IV-17 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent de la partie III.3.3 Figure III-27 obtenues à l'aide du logiciel Simad pour les différents groupements R-NH<sub>2</sub> dérivés (l'erreur imposé sur les fréquence est de  $\sigma = 0,01$ ) sur des électrodes P15 (S = 0,282 cm<sup>2</sup>).**

Pour tous les groupements R-NH<sub>2</sub> les valeurs de  $\alpha$  sont en moyenne identiques et ne dépendent pas de la molécule dérivée mais du matériau. Les valeurs de  $\alpha$  traduisent une homogénéité de la surface des électrodes. Les valeurs moyennes de  $Q$  sont également proches pour toutes les expériences, ce paramètre dépend de l'électrode plus que de la solution. Les valeurs des  $R_{HF}$  ne pourront pas nous permettre de discriminer les groupements dérivés car comme pour  $R_e$ , cette valeur est le reflet de la conductivité des solutions largement due à la concentration en tampon borate. De plus, les valeurs moyennes des capacités équivalentes,

selon les acides aminés, ont des écarts type importants et des valeurs de capacité qui se chevauchent, ce qui ne nous permettra pas de conclure sur la nature de la molécule dérivée. Les molécules ont sensiblement des valeurs de  $pK_a$  et de  $pI$  pour le PN voisines. Il ne peut pas avoir de différences notables sur les interactions entre la charge de surface du matériau et la charge de surface de l'espèce pour les différents acides aminés ou le peptide.

Par contre les valeurs de la résistance de transfert de charge sont modifiées en fonction de l'acide aminé dérivé :  $R_{t(CBI-lysine)} < R_{t(CBI-PN)} < R_{t(CBI-histidine)} < R_{t(CBI-thréonine)} < R_{t(CBI-sérine)}$ . Les molécules dérivées peuvent donc être discriminées grâce à leur résistance de transfert de charge. On remarque aussi que comme pour la DPV, le double marquage à une cinétique de transfert plus rapide.

### **V.3.5. Détection en système 2 électrodes**

Nous avons fait le choix pour la détection en puce microfluidiques d'une configuration à deux microélectrodes, une électrode de travail et une grande contre électrode. Des analyses préliminaires en système deux électrodes sont étudiées en macrosystème en préliminaire. Le montage classique à deux électrodes consiste à court-circuiter l'électrode de référence avec la contre électrode. Celle-ci joue le rôle de la cathode et l'électrode de travail de l'anode.

Deux types d'électrodes de travail sont utilisés : une électrode de platine ( $S = 0,196 \text{ cm}^2$ ) et une électrode de carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) en gardant une contre électrode en grille de platine. Ces deux types de matériaux pour l'électrode de travail seront utilisés en puce microfluidique. En effet, les premières puces microfluidiques auront deux microélectrodes en platine. A terme, les microsystèmes posséderont des dépôts microstructurés de CNx sur la microélectrode de travail en platine. Les analyses seront réalisées par voltammétrie cyclique, par voltammétrie différentielle pulsée et par impédance électrochimique.

#### **V.3.5.1 Avec traceur redox ferricyanure/ferrocyanure**

Le potentiel n'étant pas fixé avec une électrode de référence classique, nous avons fait le choix d'une pseudo référence d'où l'ajout de ferricyanure/ferrocyanure de potassium pour fixer un potentiel d'équilibre. Dans le cas où la concentration en ferricyanure et ferrocyanure est identique, le potentiel d'équilibre du couple est attendu à 0 V. Les pics du CBI et du NDA doivent donc être référencés par rapport au pic du ferricyanure/ferrocyanure. Cependant pour une facilité de lecture, les pics sont notés en V/Pt. Pour avoir une meilleure séparation des pics du ferricyanure/ferrocyanure et du CBI-PN, les concentrations en ferricyanure et ferrocyanure

sont mises en proportion non stoechiométrique. En modifiant le rapport des concentrations les pics du ferricyanure/ferrocyanure vont se décaler vers le potentiel positif si le ferricyanure est en excès et vers les potentiels négatifs si le ferricyanure est en défaut. Dans notre cas, nous utilisons du ferrocyanure en excès pour avoir une meilleure résolution entre les pics du ferricyanure/ferrocyanure et le pic du CBI.

$$E = E^0_{Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}} + 0,059 \log\left(\frac{Fe(CN)_6^{3-}}{Fe(CN)_6^{4-}}\right) \quad \text{Equation IV-32}$$

$$\begin{aligned} E &= E^0_{Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}} + 0,059 \log\left(\frac{1.10^{-4}}{1.10^{-3}}\right) && \text{Equation IV-33} \\ &= E^0_{Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}} - 0,059 \end{aligned}$$

Avec les concentrations  $1.10^{-4}/1.10^{-3}$  en ferricyanure/ferrocyanure de potassium, le pic devrait se décaler vers les potentiels négatifs. Dans notre système à deux électrodes, le  $E^0$  du couple ferricyanure/ferrocyanure centré à 0V et donc les potentiels de pic seront décalés de - 0,059 V.

Pour toutes les expériences, le rapport  $[NDA]/[CN^-] = 1$  et le rapport  $[NDA]/[PN] = 40$ . La concentration finale en peptide est de 25  $\mu$ M et celle en NDA et en ion cyanure est de 1mM dans un mélange tampon 100 mM pH 10 borate / MeOH (50/50 v/v)

### V.3.5.1.1 *Electrode de travail en carbone*

La dérivation dans un système à deux électrodes est étudiée par voltammétrie cyclique à 100 mV/s. Les voltammogrammes de la solution non stoechiométrique de ferricyanure/ferrocyanure de potassium et de la dérivation du peptide en présence de cette même solution sont représentés en Figure IV-41.

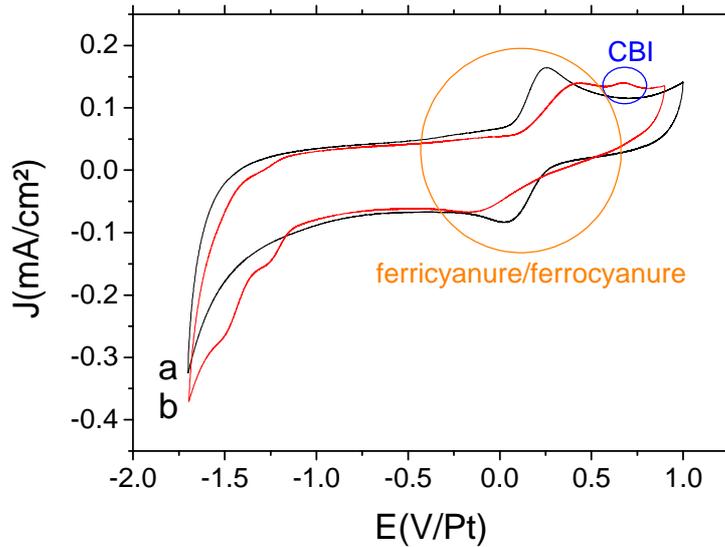


Figure IV-41 : Système à deux électrodes avec une électrode de travail en carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) et une contre électrode en platine. Voltammétrie cyclique à  $100 \text{ mV/s}$  dans une mélange tampon  $100 \text{ mM}$  pH  $10$  borate /MeOH ( $50/50 \text{ v/v}$ ). a) ferricyanure/ferrocyanure  $0,1 \text{ mM}/1 \text{ mM}$ . b).ferricyanure/ferrocyanure  $0,1 \text{ mM}/1 \text{ mM}$  et dériviation du peptide avec un ratio molaire NDA/PN de  $40$ .  $[\text{PN}]_f = 25 \text{ }\mu\text{M}$

Les valeurs des pics avant et après dériviation sont référencées dans le tableau ci-dessous (Tableau IV-18) :

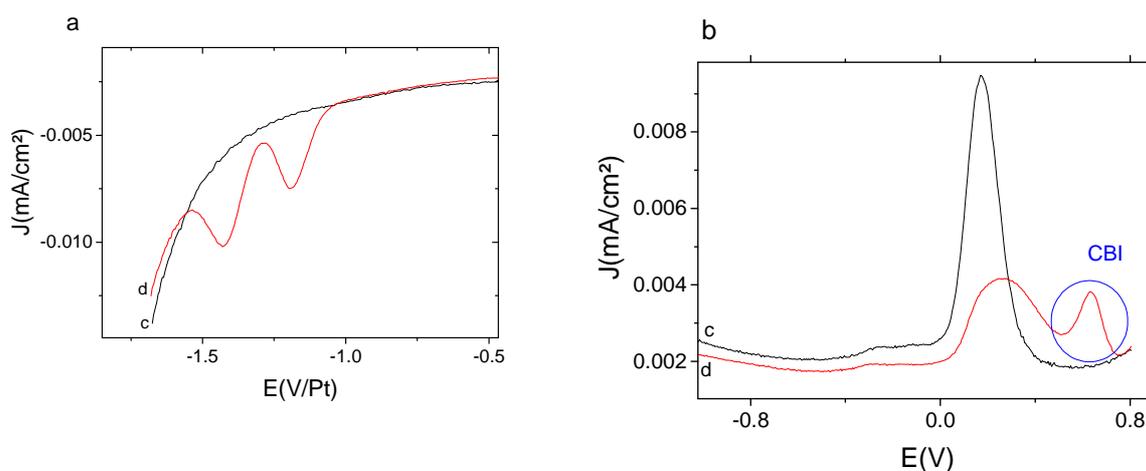
	$E_{ox}(\text{Fe}^{\text{III}})$ (V/Pt)	$E_{red}(\text{Fe}^{\text{II}})$ (V/Pt)	$E_{red,1}(\text{NDA})$ (V/Pt)	$E_{red,2}(\text{NDA})$ (V/Pt)	$E_{ox}(\text{CBI-PN})$ (V/Pt)
Avant dériviation	0,25	0,03	-	-	-
Après dériviation	0,41	-0,18	-1,21	-1,58	0,68

Tableau IV-18 : Valeur des potentiels de pic dans un système à deux électrodes avec une électrode de travail en carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) et une large contre électrode en platine. Avant la dériviation solution de ferricyanure/ferrocyanure  $0,1 \text{ mM}/1 \text{ mM}$  dans une mélange tampon  $100 \text{ mM}$  pH  $10$  borate /MeOH ( $50/50 \text{ v/v}$ ) après la dériviation solution de ferricyanure/ferrocyanure  $0,1 \text{ mM}/1 \text{ mM}$  et dériviation du peptide avec un ratio molaire NDA/PN de  $40$  dans une mélange tampon  $100 \text{ mM}$  pH  $10$  borate /MeOH ( $50/50 \text{ v/v}$ ).  $[\text{PN}]_f = 25 \text{ }\mu\text{M}$ .

Avant dériviation l'écart entre les pics du ferricyanure et ferrocyanure est de  $0,21 \text{ V}$ , tandis que après dériviation la différence de potentiel de pic est de  $0,59 \text{ V}$ . Le système ferricyanure/ferrocyanure de potassium est plus lent dans la solution avec la dériviation. Le potentiel d'équilibre du couple ferricyanure/ferrocyanure est à  $0,3 \text{ V/Pt}$ . Ceci est plus important que ce qui est attendu avec la formule IV-33. Les pics du ferricyanure et ferrocyanure avant et après dériviation ne sont pas égaux, les potentiels des autres pics ne

peuvent donc pas être référencés avec précision par rapport au potentiel de pic du couple ferricyanure/ferrocyanure, qui n'est pas inerte dans la solution de dérivation.

Le marquage est aussi étudié par DPV à 25mV/s (Figure III-42). Avant dérivation le pic d'oxydation du ferricyanure se situe à 0,17 V/Pt tandis qu'après dérivation le pic est à 0,26 V/Pt. Les pics du NDA se trouvent respectivement à -1,27 V/ Pt et -1,40 V/ Pt et celui du CBI-PN à 0,6 V/Pt. Là aussi, le pic d'oxydation du ferricyanure s'écroule en intensité et se décale. On retrouve la même conclusion sur la non stabilité du ferricyanure/ferrocyanure dans une solution de marquage.



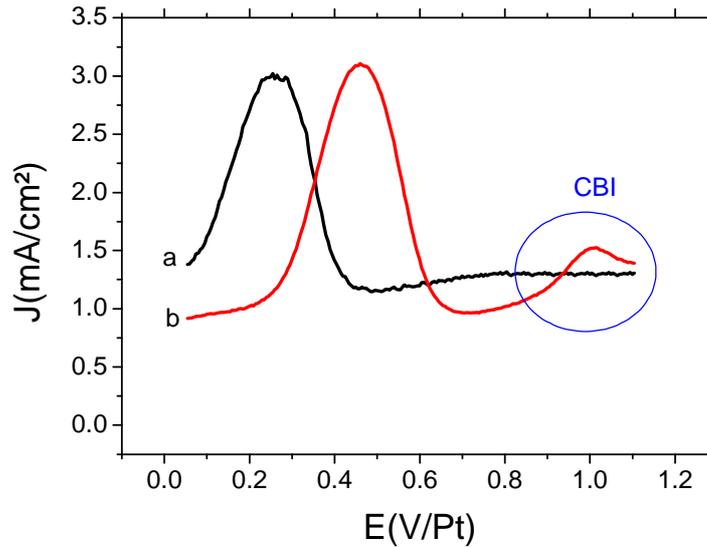
**Figure IV-42 : Système à deux électrodes avec une électrode de travail en carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) et une contre électrode en platine. DPV à 25 mV/s dans une mélange tampon 100 mM pH 10 borate /MeOH (50/50 v/v). a) fenêtre de réduction b) fenêtre d'oxydation. c) ferricyanure/ferrocyanure 0,1 mM/1 mM c) ferricyanure/ferrocyanure 0,1 mM/1 mM et dérivation du peptide avec une ratio molaire NDA/PN de 40.  $[\text{PN}]_f = 25 \text{ } \mu\text{M}$ .**

Les expériences menées dans un système à deux électrodes permettent la détection du CBI aussi bien par voltammétrie cyclique que par DPV. Les pics caractéristiques du CBI et du ferricyanure sont assez bien séparés. Cependant, une diminution des densités de courant des pics du ferricyanure et du ferrocyanure ainsi qu'un décalage des potentiels de pic sont observés dans la solution de dérivation. On peut donc conclure que la pseudo référence choisi n'est pas très stable car la cinétique du couple ferricyanure/ferrocyanure a été modifiée et que le transfert devient beaucoup plus lent.

### V.3.5.1.2 *Electrode de travail en platine*

Les premières puces microfluidiques seront réalisées dans un premier temps avec des microélectrodes en platine. Au préalable, des expériences à deux électrodes sont effectuées en macrosystème pour confirmer la faisabilité de la détection du PN à deux électrodes de platine.

La fenêtre de potentiel des électrodes de platine est trop réduite pour observer les vagues correspondant à la réduction du NDA. Dans ce cas, la dérivation est contrôlée exclusivement par l'apparition du pic du CBI (Figure IV-43).



**Figure IV-43** : Système à deux électrodes avec une électrode de travail en platine ( $S = 0,196\text{cm}^2$ ) et une contre électrode en platine. DPV à  $25\text{ mV/s}$  dans une mélange tampon  $100\text{ mM pH } 10$  borate /MeOH ( $50/50\text{ v/v}$ ) a) ferricyanure/ferrocyanure  $0,1\text{ mM}/1\text{ mM}$ . b) ferricyanure/ferrocyanure  $0,1\text{ mM}/1\text{ mM}$  et dérivation du peptide avec une ratio molaire NDA/PN de 40.  $[\text{PN}]_f = 25\text{ }\mu\text{M}$ .

Le pic d'oxydation du ferricyanure avant dérivation est situé à  $0,25\text{ V/Pt}$ . Cette observation est contraire à ce que nous attendions. En effet, le pic d'oxydation devrait se décaler vers les potentiels négatifs. Après dérivation le pic du ferricyanure s'est décalé à  $0,46\text{ V}$ . Le pic de dérivation est également visible sur platine, il est situé à  $1,01\text{ V/Pt}$ .

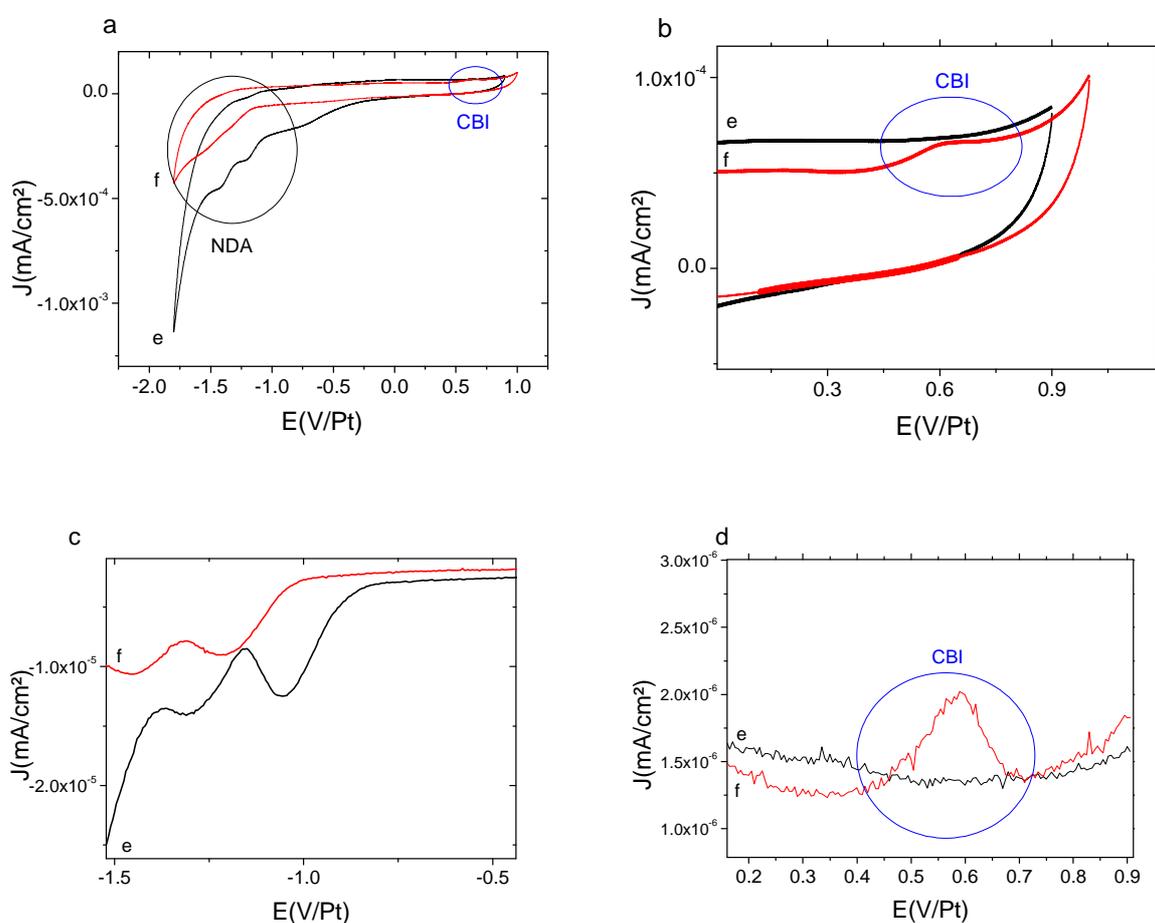
### V.3.5.2 Sans traceur redox

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que le couple ferricyanure/ferrocyanure n'était pas une pseudo référence très stable : décalage des pics du couple et réaction probable avec la solution de dérivation. Pour palier ce problème, nous avons décidé de nous affranchir de mettre le couple ferricyanure/ferrocyanure en solution.

Dans ce cas, il n'y a pas de couple jouant le rôle de pseudo référence, le potentiel sera donc fixé par la réduction du NDA et par l'oxydation de l'eau.

### V.3.5.2.1 Electrode de travail en carbone

De la même façon, la dérivation est étudiée par DPV et par voltammétrie cyclique (Figure IV-44). Les Figure IV-44 a et b représentent les voltammogrammes tandis que les Figure IV-44 c et d montrent les voltammogrammes obtenus en DPV. Dans les deux cas, les pics de réduction du NDA sont observés ainsi que le pic du CBI. Une diminution de densités de courants des pics du NDA est observée après dérivation.



**Figure IV-44 : Système à deux électrodes avec une électrode de travail en carbone vitreux ( $S = 0,071 \text{ cm}^2$ ) et une contre électrode en platine dans un mélange tampon 100 mM pH 10 borate /MeOH (50/50 v/v) a) Voltammétrie cyclique à 100 mV/s. b) Voltammétrie cyclique à 100mV/s Agrandissement de la fenêtre de 0 à +1,2 V/Pt. c) DPV à 25 mV/s fenêtre de réduction d) DPV à 25 mV/s fenêtre d'oxydation e) NDA 1 mM f) dérivation du peptide avec 1 mM NDA et un ratio molaire NDA/peptide de 40.  $[PN]_f = 25 \mu\text{M}$ .**

Les valeurs des potentiels sont indiquées dans le Tableau IV-19.

technique	Dérivation	$E_{red1}NDA$ (V)	$E_{red2}NDA$ (V)	$E$ (CBI-PN)(V)
DPV	Avant dérivation	-1,06	-1,31	-
	Après dérivation	-1,22	-1,45	0,60
CV	Avant dérivation	-1,22	-1,43	-
	Après dérivation	-1,35	-1,58	0,62

**Tableau IV-19 : Potentiels des pics du NDA et du CBI en DPV à 25 mV/s et en CV à 100 mV/s avant et après dérivation du peptide dans une solution tampon 100 mM pH 10 borate /MeOH (50/50 v/v).**

Dans le cas de la dérivation dans le système à deux électrodes sans pseudo référence ferricyanure/ferrocyanure, les pics du CBI-PN sont référencés par rapport au premier pic de réduction du NDA correspondant à la réduction de la forme dialdéhyde (DA). Dans ce cas,  $E_{red,1}(NDA)=0$  V/ $E_{DA}$  et donc le potentiel de pic en DPV est à +1,82 V/ $E_{DA}$ . Le potentiel de pic en CV est situé à 1,97 V/ $E_{DA}$ .

Cependant, les pics du NDA sont décalés d'environ -15 mV après dérivation. Ceci peut être dû à la cinétique des réactions impliquant le NDA lors de la réaction de dérivation.

#### V.3.5.2.2 *Electrode de travail en platine*

La dérivation sans traceur est également étudiée avec le système à deux électrodes en platine. Cette dérivation est étudiée aussi par DPV à 25 mV/s (Figure IV-45). Le pic du CBI-PN est situé à + 0,84 V. Cependant, la fenêtre de potentiel ne permet pas de la référencer par rapport au pic de réduction du NDA car celui-ci n'est pas visible sur l'électrode de platine, la réduction de l'eau est présente sur platine à un potentiel inférieur à celui de la réduction du NDA.

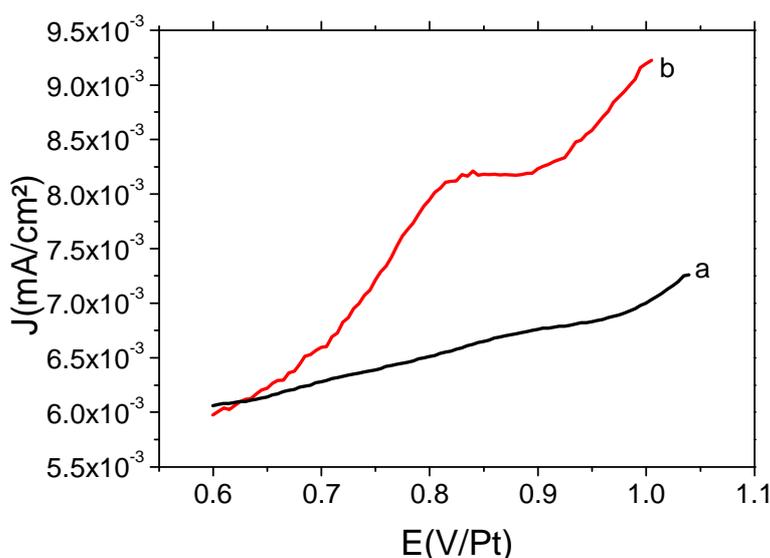


Figure IV-45 : Système à deux électrodes avec une électrode de travail en platine ( $S = 0,196 \text{ cm}^2$ ). DPV à  $25 \text{ mV/s}$  dans une mélange tampon  $100 \text{ mM pH } 10$  borate /MeOH (50/50 v/v) a)  $1 \text{ mM NDA}$ . b) Dérivation du peptide avec NDA  $1 \text{ mM}$  et un ratio molaire NDA/PN = 40.

Dans cette configuration, le potentiel est fixé par la réduction de l'eau à la cathode et l'oxydation de l'eau à l'anode. Dans le cas d'un système platine-platine, l'utilisation d'un traceur pour référencer le potentiel est préférable. Dans le cas où on n'a pas de pseudo référence le potentiel est moins stable car le potentiel se déplace sur une large gamme de potentiel.

#### V.4. Conclusion

La première partie du quatrième chapitre nous a permis de caractériser le marqueur de dérivation : le 2,3-naphthalènedicarboxaldéhyde. Il a été montré que ce marqueur est bien électroactif dans le milieu classique d'utilisation en séparation électrophorétique couplé à une détection fluorométrique. Les études de la variation des potentiels de pics et des densités de courant des pics en fonction de la vitesse de balayage ont souligné le rôle de l'hydratation des groupements aldéhyde du NDA en milieu aqueux dans une réduction suivant un mécanisme à deux électrons et deux protons. Les variations des potentiels de pics en fonction du pH ont permis de faire des hypothèses sur le saut de potentiels observé entre les pH acides et les pH basiques. La comparaison des densités de courant des pics du NDA avec la BQ n'a pas permis de déterminer la concentration des différentes formes du NDA à cause de l'instabilité de la BQ en solution tampon borate /MeOH. La détermination des coefficients de diffusion à partir des formules de Wilke-Chang, de Lysis-Ratcliff, de Scheibel et de Reddy-Doraiswamy, nous

a permis de remonter à la concentration de chacune des trois formes du NDA en solution (DA MA et HAC). La forme monohydratée acyclique (MA) est majoritaire lorsque la concentration en NDA totale est de 1mM. De plus, les études de la stabilité des pics en fonction du temps ont montré que les différentes formes en solution étaient relativement stables.

Dans la deuxième partie de ce chapitre nous avons abordé la détection d'acides aminés et d'un peptide synthétique marqué avec le NDA. La réactivité a été analysée sur deux types d'électrode : le carbone vitreux et le carbone azoté amorphe a-CN<sub>x</sub> P15. Les conditions optimales de dérivation obtenues sur carbone vitreux sont : un rapport NDA/CN= 1 et NDA/AA ou peptide = 100 dans un tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v) pour un temps optimal de 15 minutes. La comparaison des potentiels de pics du CBI-PN avec ceux pour les CBI-AA a mis en évidence le double marquage du peptide par la thréonine et par le deuxième groupement amine de la lysine. Cette double dérivation a été confirmée par spectrométrie de masse. D'autre part, nous avons montré que l'oxydation du CBI-PN est un mécanisme à 4 électrons. De plus, ce marquage permet d'avoir une bonne limite de détection pour le peptide de 0,25 µM en macrosystème inférieure d'un facteur 10 par rapport à la fluorescence (3 µM) en capillaire. Les études sur la stabilité ont confirmé la bonne tenue du marquage dans le temps avec un signal correct après 24h de dérivation ce qui permettra la détection post-colonne des échantillons dérivés. Dans une seconde partie, les conditions optimales de marquage ont été appliquées pour la détection sur a-CN<sub>x</sub> P15 activée. Les mêmes valeurs de potentiel de pics sont observées pour les deux matériaux d'électrodes (carbone vitreux et CN<sub>x</sub> P15). De plus, les dérivations analysées avec des électrodes de CN<sub>x</sub> P15 activées permettent d'avoir une meilleure résolution de pics pour l'histidine, la thréonine, la lysine, et le peptide. D'autre part, les mesures en spectroscopie d'impédance électrochimique effectuées au potentiel de pic sur les électrodes de CN<sub>x</sub> P15 activées permettent également de discriminer entre elles les espèces dérivées. En macrosystème, les acides aminés et le peptide peuvent donc être différenciés à l'aide de deux techniques de détection électrochimique : la spectroscopie d'impédance électrochimique (résistance de transfert de charge) et la DPV (potentiel de pic, largeur à mi-hauteur). La DPV nous permet, contrairement à la CV de minimiser le courant capacitif par rapport au courant faradique.

La troisième partie de ce chapitre a abordé la détection du peptide dans un système à deux électrodes qui est un préalable avant les mesures en puce microfluidique à deux

électrodes. Deux configurations ont été explorées : un système platine-platine et un système carbone-platine. Le pic caractéristique du CBI est alors visible dans les deux configurations. Cependant le traceur redox en l'occurrence le ferricyanure/ferrocyanure n'est pas inerte dans la solution tampon 100 mM pH 10 /MeOH avec la solution. Pour palier ce problème nous aurions pu rechercher un traceur redox inerte mais nous avons fait le choix de tester la détection du CBI sans traceur. Nous avons validé la détection du CBI dans une configuration simple. Cependant, des inconvénients majeurs tels que le bruit sur le signal et le seuil de détection restent à améliorer. De plus, le système platine-platine présente le désavantage d'avoir une fenêtre de potentiel ne permettant pas de voir les pics de réduction du CBI. La configuration à deux électrodes est tout de même possible pour l'analyse qualitative, voire semi quantitative, de la dérivation.

## V.5. Références

- [1] S. Cohen and D. Michaud, "Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino-acids via high-performance liquid-chromatography," *Analytical Biochemistry*, vol. 211, no. 2, pp. 279–287, 1993.
- [2] D. D. Nahas, J. S. Palladino, J. G. Joyce, R. W. Hepler, S. Pike, P. O. Box, W. Point, and P. Received, "Amino Acid Analysis of Peptide Loading Ratios in Conjugate Vaccines: A Comparison of Direct Electrochemical Detection and Derivatization Methods," *Bioconjugate Chem*, no. 19, pp. 322–326, 2008.
- [3] A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, P. Agrafiotou, and A. Papageorgiou, "Optimization of separation and detection of 6-aminoquinolyl derivatives of amino acids by using reversed-phase liquid chromatography with on line UV, fluorescence and electrochemical detection," *Analytica Chimica Acta*, vol. 593, no. 1, pp. 92–97, 2007.
- [4] G. D. Li, I. S. Krull, and S. a Cohen, "Electrochemical activity of 6-aminoquinolyl urea derivatives of amino acids and peptides. Application to high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.," *Journal of chromatography. A*, vol. 724, no. 1–2, pp. 147–57, 1996.
- [5] L. A. Allison, G. S. Mayer, and R. E. Shoup, "o-Phthalaldehyde derivatives of amines for high-speed liquid chromatography/electrochemistry.," *Anal Chem*, vol. 56, no. 7, pp. 1089–96, 1984.
- [6] M. H. Joseph and P. Davies, "Electrochemical activity of o-phthalaldehydemercaptoethanol derivatives of amino acids Application to high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in plasma and other biological materials," *Journal of Chromatography*, vol. 277, pp. 125–136, 1983.
- [7] J. Wang, S. Mannino, C. Camera, M. P. Chatrathi, M. Scampicchio, and J. Zima, "Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of seleno amino acids," *Journal of Chromatography A*, vol. 1091, no. 1–2, pp. 177–182, 2005.
- [8] D. R. Norton and N. H. Furman, "Polarographic Determination of Amino Acids," *Anal Chem*, vol. 26, no. 7, pp. 1116–1119, 1954.
- [9] P. Lindroth and K. Mopper, "High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde," *Anal Chem*, vol. 51, no. 11, pp. 1667–1674, 1979.
- [10] P. Zuman, "Reactions of orthophthalaldehyde with nucleophiles.," *Chemical reviews*, vol. 104, no. 7, pp. 3217–38, 2004.

- [11] B. K. Matuszewski, R. S. Givens, K. Srinivasachar, R. G. Carlson, and T. Higuchi, "N-Substituted I-Cyanobenz[f] isoindole: Evaluation of Fluorescence Efficiencies of a New Fluorogenic Label for Primary Amines and Amino Acids," *Anal chem*, no. 59, pp. 1102–1105, 1987.
- [12] J. . Stobaugh, A. . Repta, and L. . Sternson, "Autoxidation of 1-( tert -Butylthio)-2-(n -propyl)isoindole," *J.Org.Chem*, vol. 49, no. 22, pp. 4306–4309, 1984.
- [13] P. de Montigny, J. F. Stobaugh, R. S. Givens, R. G. Carlson, L. A. Sternson, and T. Higuchi, "Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/Cyanide Ion: A rationally designed fluorogenic reagent for primary amines," *Anal chem*, vol. 59, pp. 1096–1101, 1987.
- [14] R. G. Carlson, K. Srinivasachar, R. S. Givens, and B. K. Matuszewski, "New derivatizing agents for amino acids and peptides. 1. Facile synthesis of N-substituted 1-cyanobenz[f]isoindoles and their spectroscopic properties," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 51, no. 21, pp. 3978–3983, 1986.
- [15] M. D. Oates and J. W. Jorgenson, "Quantitative amino acid analysis of subnanogram levels of protein by open tubular liquid chromatography.," *Anal Chem*, vol. 62, no. 15, pp. 1577–80, 1990.
- [16] O. W. SM.Lunte, T.Mohabbat, "Analytical Biochemistry, 178, 1989, 23-29," *Analytical Biochemistry*, vol. 178, no. 1989, pp. 23–29.
- [17] S. D. Gilman and E. A. G, "Post column derivatization for Capillary Electrophoresis using Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and 2-Mercaptoethanol," *Analytical methods and Instrumentation*, vol. 2, no. 3, pp. 133–141, 1995.
- [18] D. P. Manica, J. A. Lapos, A. Daniel Jones, and A. G. Ewing, "Analysis of the stability of amino acids derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry," *Analytical Biochemistry*, vol. 322, no. 1, pp. 68–78, 2003.
- [19] S. D. Gilman and A. G. Ewing, "Analysis of single cells by capillary electrophoresis with on-column derivatization and laser-induced fluorescence detection.," *Anal Chem*, vol. 67, no. 1, pp. 58–64, 1995.
- [20] M. D. Oates and J. W. Jorgenson, "Determination of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-labeled amino acids by open tubular liquid chromatography with electrochemical detection.," *Anal Chem*, vol. 61, no. 5, pp. 432–5, 1989.
- [21] T. J. O'Shea, R. D. Greenhagen, S. M. Lunte, and G. E. Lunte, "Capillary electrophoresis with electrochemical detection employing on column nafion joint," *Journal of Chromatography*, vol. 593, no. 1–2, pp. 305–312, 1992.
- [22] Q. Weng and W. Jin, "Determination of free intracellular amino acids in single mouse peritoneal macrophages after naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection.," *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 2797–2803, 2001.

- [23] Q. Dong, X. Wang, L. Zhu, and W. Jin, "Method of intracellular naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization for analysis of amino acids in a single erythrocyte by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection.," *Journal of chromatography. A*, vol. 959, no. 1–2, pp. 269–79, 2002.
- [24] F. D. Swanek, B. B. Anderson, and A. G. Ewing, "Capillary Electrophoresis with NDA Derivatization and Electrochemical Detection for the Analysis of Cellular Amino Acids," *J. Microcolumn Separations*, vol. 10, no. 2, pp. 185–192, 1998.
- [25] J. Wang, G. Chen, and M. Pumera, "Microchip Separation and Electrochemical Detection of Amino Acids and Peptides Following Precolumn Derivatization with naphthalène-2,3-dicarboxyaldehyde," *Electroanalysis*, vol. 15, no. 10, pp. 862–865, 2003.
- [26] F. Boneon Verduden, TP de chimie - réduction polarographique du benzaldéhyde, pp69-76
- [27] N. Salem, S. Andreescu, E. Kulla, and P. Zuman, "Existence and reactivity of three forms of orthophthalaldehyde in aqueous solutions. Polarographic, voltammetric, and spectrophotometric study," *The journal of physical chemistry. A*, vol. 111, no. 21, pp. 4658–70, 2007.
- [28] N. Salem and P. Zuman, "Comparison of solution chemistries of orthophthalaldehyde and 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde," *Anal. Chem.* vol. 78, no. 22, pp. 7802–8, 2006.
- [29] J.-M. Savéant, *Elements of molecular and biomolecular electrochemistry*. John Wiley & Sons Inc, 2006, pp. 5–105.
- [30] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, and M. Rosés, "Retention of ionizable compounds on HPLC. pH scale in methanol-water and the pK and pH values of buffers," *Anal Chem*, vol. 68, no. 20, pp. 3651–3657, 1996.
- [31] E. Laborda and F. Martínez-ortiz, "Study of Electrochemical Processes with Coupled Homogeneous Chemical Reaction in Differential Pulse Voltammetry at Spherical Electrodes and Microhemispheres," *Electroanalysis*, vol. 22, no. 16, pp. 1857–1866, 2010.
- [32] M. Rafiee and D. Nematollahi, "Voltammetry of electroinactive species Using Quinone/hydroquinone Redox: A known redox system viewed in a new perspective.," *Electroanalysis*, vol. 19, no. 13, pp. 1382–1386, 2007.
- [33] C. R. Wilke and P. Chang, "Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions," *AIChE Journal*, vol. 1, no. 2, pp. 264–270, 1955.
- [34] E. . Scheibel, "Liquid Diffusivities," *Industrial & Engineering Chemistry*, vol. 46, no. September 1954, pp. 2007–2008, 1954.
- [35] L. Reddy, Doraiswamy Y, "Estimating liquid Diffusivity," *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, vol. 6, no. 1, pp. 77–79, 1967.

- [36] M. . Lysis and G. . Ratcliff, “Diffusion in binary liquid mixtures at infinite dilution,” *Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 46, no. 5, 1968.
- [37] J. Li and P. W. Carr, “Accuracy of empirical correlations for estimating diffusion coefficients in aqueous organic mixtures.,” *Anal. chem.*, vol. 69, no. 13, pp. 2530–6, Jul. 1997.
- [38] P. D. E. Montigny, C. M. Riley, L. A. Sternson, and J. F. Stobaugh, “Fluorogenic derivatization of peptides with optimization of yield and application in the determination of leucine-enkephalin spiked human plasma samples,” vol. 8, no. 5, pp. 419–429, 2000.
- [39] L.-Y. Zhang, Y.-M. Liu, Z.-L. Wang, and J.-K. Cheng, “Capillary zone electrophoresis with pre-column NDA derivatization and amperometric detection for the analysis of four aliphatic diamines,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 508, no. 2, pp. 141–145, Apr. 2004.
- [40] M. A. Nussbaum, D. U. Staerks, S. M. Lunte, and C. M. Riley, “Electrochemical Characteristics of Amino Acids and Peptides Derivatized with Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde: pH effects and Differences in Oxidation Potentials,” *Anal Chem*, no. 7, pp. 1259–1263, 1992.
- [41] M. Faure, S. Korchane, I. Le Potier, A. Pallandre, C. Deslouis, A. Haghiri-gosnet, and J. Gamby, “Talanta Investigating of labelling and detection of transthyretin synthetic peptide derivatized with naphthalene-2 , 3-dicarboxaldehyde,” *Talanta*, vol. 116, pp. 8–13, 2013.
- [42] A. Lagrini, C. Deslouis, H. Cachet, M. Benlahsen, and S. Charvet, “Elaboration and electrochemical characterization of nitrogenated amorphous carbon films,” *Electrochemistry Communications*, vol. 6, no. 3, pp. 245–248, 2004.



# Chapitre V

## Détection du peptide TTR en puce microfluidique

---

<b>V.1.</b>	<b>Interet de la miniaturisation .....</b>	<b>227</b>
<b>V.2.</b>	<b>Hydrodynamique en microfluidique .....</b>	<b>228</b>
<b>V.3.</b>	<b>Elaboration de la puce microfluidique.....</b>	<b>231</b>
V.3.3.	Techniques de microfabrication .....	231
V.3.3.1	Techniques de microfabrication « dure» .....	231
V.3.3.1.1	La photolithographie .....	231
V.3.3.1.2	Gravure ionique réactive (RIE pour Reactive-Ion Etching) .....	232
V.3.3.2	Techniques de microfabrication « douces » .....	232
V.3.4.	Fabrication de la puce microfluidique .....	234
V.3.4.1	Etapes préparatrices.....	236
V.3.4.2	Réalisation des microélectrodes .....	236
V.3.4.3	Réalisation du circuit fluide.....	238
V.3.5.	Mesure des dimensions de la puce microfluidique.....	241
<b>V.4.</b>	<b>Optimisation des paramètres et conditions d'analyse .....</b>	<b>242</b>
V.4.3.	Analyse d'un système redox dans la puce microfluidique en mode statique .....	242
V.4.4.	Analyse d'un système redox dans la puce microfluidique en conditions hydrodynamique .....	246
V.4.4.1	Optimisation de la vitesse du flux .....	247
V.4.4.2	Optimisation de la vitesse de balayage.....	248
V.4.4.3	Optimisation de la vitesse du flux et comparaison des intensités de pics aux intensités théoriques de Levich.....	250
V.4.4.4	Modélisation à l'aide du logiciel Comsol multi physique .....	253
<b>V.5.</b>	<b>Détection de la dérivation dans la puce microfluidique.....</b>	<b>256</b>
V.5.3.	Détection en mode statique .....	256
V.5.4.	Détection en mode dynamique .....	258
V.5.4.1	Dérivation du PN avec différents ratios ferricyanure/ ferrocyanure.....	258
V.5.4.2	Limite de détection du CBI-PN et caractéristiques de la méthode .....	261
<b>V.6.</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>263</b>



### ***VII.1. Interet de la miniaturisation***

Un microsysteme est un systeme de petite taille allant du millimetre au micrometre. Différentes techniques de fabrication peuvent être utilisées comme la photolithographie et la photoablation. Les microsystemes peuvent être réalisés avec différents matériaux ; le verre, des résines (polydiméthylsiloxane PDMS) ou des polymères (polyméthacrylate de méthyle, polyéthylène téréphthalate PET...). Les microsystemes en verre ou en quartz sont transparents aux UV mais ont un coût élevé. Les microsystemes en polymères sont plus faciles à fabriquer et sont de faible coût. Cependant, ils sont moins compatibles avec certains solvants organiques.

Les systemes miniaturisés présentent divers avantages. En effet, grâce à cette miniaturisation le temps d'analyse est diminué ainsi que le volume d'échantillons biologiques qui peut être coûteux; ces deux paramètres permettent de diminuer le coût des analyses [1].

Lorsque qu'une puce microfluidique est utilisée pour la séparation des analytes, une meilleure résolution est obtenue [2]. En électrophorèse capillaire, la réduction de la section du canal permet d'obtenir des champs électriques plus grands sans avoir des tensions électriques élevées [3], [4]. En chromatographie liquide le flux est réduit sans modifier la vitesse et donc la résolution [3], [4]. De plus, dans les microcanaux les distances de diffusion moléculaire et thermique sont diminuées. Le temps de diffusion varie comme l'inverse de la distance au carré ( $1/d^2$ ). Par exemple, si une espèce met 17 minutes pour diffuser sur 1 mm, il ne lui faudra que 100 ms pour diffuser sur 10  $\mu\text{m}$ . Le libre parcours moyen est également diminué ce qui favorise les réactions [2], [5]. Hatch *et al.* ont développé une puce microfluidique qui permet de diminuer drastiquement le temps d'un immunoessai passant de 10 min en système classique à 25 seconde pour une puce [6]. La puce microfluidique réalisée par Teste *et al.* montre bien l'amélioration des performances d'un immunoessai réalisé en puce par rapport à celui effectué sur plaque. En effet, la limite de détection passe de 30 mg/nL à 1 ng/nL, le volume d'échantillon de 200  $\mu\text{L}$  à 5  $\mu\text{L}$  et le temps d'analyse de 6 h à 20 min. De plus la constante cinétique apparente du premier ordre de l'interaction AbI/AbII\* est 1000 fois plus importante en puce qu'en système classique [7].

D'autre part, la miniaturisation peut permettre de réaliser des systemes portatifs, automatisables et vise à regrouper plusieurs fonctionnalités sur le même support. Ceci permet de simplifier les connectiques et de limiter les contaminations entre les différentes étapes [1]. Legendre *et al.* ont réalisé une puce microfluidique qui combine l'extraction sur phase solide

(SPE) d'ADN et PCR [8]. Ferrigno *et al.* ont développé une puce microfluidique qui permet le titrage potentiométrique. Cette puce microfluidique est réalisée en incorporant des microélectrodes, un système de dilution et des mélangeurs. Ce dispositif est facile à fabriquer et à utiliser, de plus il permet de diminuer la quantité d'échantillon utilisée en passant de 1 mL pour un système classique à 10 µL en puce microfluidique avec une limite de détection comparable dans les deux cas [9]. Stephan *et al.* ont fabriqué une puce microfluidique permettant la quantification ampérométrique avec une méthode de calibration intégrée. La courbe de calibration est générée simultanément à la quantification ce qui diminue le temps d'analyse. Pour cela, la puce microfluidique est composée de microélectrodes et d'un système de dilution [10]. Saliba *et al.* ont développé une méthode « Ephasia » pour la détection des cellules tumorales. Ce microsysteme est constitué de colonnes de billes superparamagnétiques fonctionnalisées et autoassemblées. Cette puce microfluidique permet d'obtenir deux informations en même temps : une analyse morphologique et immunophénotique en utilisant 10 fois moins de volume et en diminuant le nombre de cellules requis [11]. De plus, les laboratoires sur puce portable, automatisables, peu chers, peu consommateurs de produit et qui ne ont pas besoin d'infrastructures de santé coûteuses pour leurs utilisations, peuvent servir dans les pays en voie de développement pour le diagnostic de maladie [12].

## VII.2. Hydrodynamique en microfluidique

Les écoulements des fluides peuvent être classés en deux régimes : laminaire ou turbulent. La frontière entre ces deux régimes est définie par le nombre de Reynolds  $Re$ , qui relie les forces d'inertie à la force de viscosité.

$$Re = \frac{\rho V_l L}{\eta}$$

**Equation V-1**

Avec  $V_l$ , la vitesse moyenne du liquide en mouvement (en  $m.s^{-1}$ ),  $L$ , la longueur typique de l'écoulement (en m),  $\rho$  et  $\eta$  sont respectivement la masse volumique (en  $kg.m^{-3}$ ) et la viscosité du fluide (en Pa.s). Ce nombre de Reynolds est donc un nombre sans dimension. Les forces de viscosité peuvent être définies comme la friction du fluide sur les parois du canal. Expérimentalement, si le nombre de Reynolds est supérieur à 2000, les forces d'inertie sont dominantes et le flux est dit turbulent et inversement pour des nombres de Reynolds inférieurs à 2000, le flux est dit laminaire [13].

Le mouvement des fluides newtoniens est décrit par les équations de Navier –Stokes. En considérant, les forces externes les plus courantes, l'équation de Navier –Stokes correspondant au bilan de la quantité de mouvement dans le cas particulier d'un écoulement d'un fluide incompressible s'écrit [14] :

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v} \right) = -\vec{\nabla} P + \eta \nabla^2 \vec{v} + \rho \vec{f}$$

**Equation V-2**

Dans cette équation  $v$  est la vitesse d'une particule du fluide.

Le premier terme  $-\vec{\nabla} P$  correspond aux forces de pression dans le fluide ( $P$  étant la pression), le deuxième terme étant la terme de convection  $\eta \nabla^2 \vec{v}$ , le troisième terme représente les forces de volumes appliquées au fluide  $\rho \vec{f}$ .

Lorsque le nombre de Reynolds est faible, c'est-à-dire que l'écoulement est laminaire, les termes non linéaires sont négligeables devant les termes de viscosité. Dans ce cas, l'équation de Navier –Stokes devient :

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} \right) = -\vec{\nabla} P + \eta \nabla^2 \vec{v}$$

**Equation V-3**

En considérant un écoulement laminaire, l'équation se résume à:

$$0 = -\vec{\nabla} P + \eta \nabla^2 \vec{v}$$

**Equation V-4**

Pour résoudre cette équation, on considère que le flux ne se déplace que suivant l'axe  $x$ , que la vitesse du flux sur les bords du canal est nulle et que la vitesse ne peut pas être infinie au centre du canal. La résolution de cette équation donne donc la vitesse suivant l'axe  $x$ ,  $v_x$ , en fonction de la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal,  $\Delta P$  et la longueur du canal  $L$ . Dans le cas d'une section circulaire, on se place en coordonnées cylindriques. La vitesse  $v_x$  est donc donné en fonction du rayon de la section circulaire,  $R$ , et de la coordonnée radiale,  $r$  [14].

$$v_x(r) = \frac{\Delta P}{4\eta L} (R^2 - r^2)$$

**Equation V-5**

En intégrant la vitesse sur la section du canal, le débit est obtenu

$$Débit = \int_0^{2\pi} \int_0^R v.r.dr.d\theta = \frac{\Pi.R^4}{8.\eta.L} \Delta P \quad \text{Equation V-6}$$

Dans cette équation, le coefficient  $8.\eta.L/\Pi.R^4$  est la résistance fluidique. La résistance est inversement proportionnelle à  $R^4$ , donc celle-ci augmente radicalement lorsque le rayon diminue.

De la même façon pour une section rectangulaire, dans le cas où la largeur du canal est largement supérieure à la hauteur, le profil de vitesse est défini par :

$$v_x(y) = \frac{\Delta P}{2\eta L} (h - y)y \quad \text{Equation V-7}$$

Dans cette expression  $h$ , est la hauteur du canal et  $y$  la coordonnée de l'axe suivant la hauteur du canal.

En intégrant la vitesse sur la section du canal, le débit obtenu est :

$$Débit = \int_0^d \int_0^h v.dy.dz = \frac{dh^3}{12\eta L} \Delta p \quad \text{Equation V-8}$$

avec  $d$ , la largeur du canal

La résistance fluidique vaut :

$$R_f = \frac{12\eta L}{dh^3} \quad \text{Equation V-9}$$

Compton *et al.* ont exprimé le flux dans un canal pour une électrode microbande [15] pour une réaction électrochimique (équation V-10).



Dans le cas, où la longueur du canal,  $L$ , est largement supérieure à la largeur de la microélectrode,  $x_e$ , la résolution des équations peut être réalisée en deux dimensions. Dans ces conditions, la diffusion et la convection sont gouvernées par l'équation de transport, dite de diffusion convective suivante. Cette équation est résolue dans le cas particulier d'un état stationnaire.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right) - v_x(y) \frac{\partial c}{\partial x} \quad \text{Equation V-11}$$

Dans cette équation,  $D$  et  $c$  sont respectivement le coefficient de diffusion et la concentration en espèces redox. La diffusion a lieu suivant les axes  $x$  et  $y$  tandis que la convection à lieu uniquement selon l'axe  $x$ . Le profil de vitesse du flux dans le microcanal est parabolique à travers le microcannal suivant l'axe  $x$  (Figure V-1):

$$v_x(y) = 6u_{av} \frac{y}{h} \left(1 - \frac{y}{h}\right) \quad \text{Equation V-12}$$

avec  $u_{av}$ , la vitesse moyenne ( $\text{m.s}^{-1}$ ).

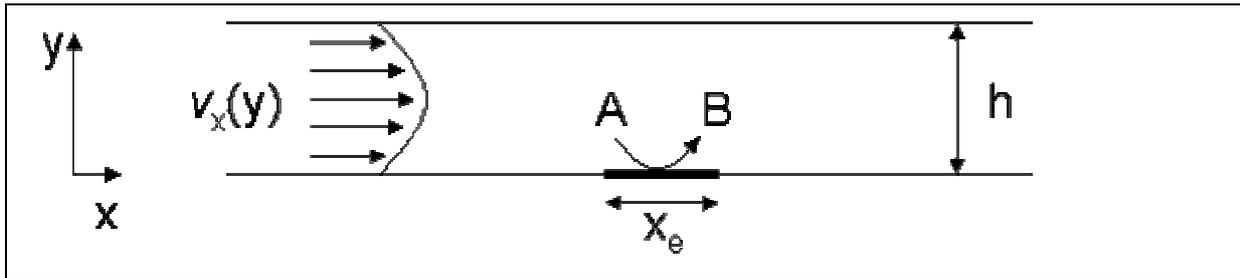


Figure V-1 : Schéma 2D du profil de vitesse dans un système fluide de section rectangulaire.

### VII.3. *Elaboration de la puce microfluidique*

Cette première partie est une description non exhaustive des différentes techniques de microfabrication utilisées pour la fabrication de la puce microfluidique [16]. Dans un deuxième temps, les conditions de fabrication seront données dans la partie V.2.2.

#### VII.3.3. **Techniques de microfabrication**

##### VII.3.3.1 **Techniques de microfabrication « dure »**

###### VII.3.3.1.1 *La photolithographie*

La photolithographie permet de créer des structures d'épaisseur uniforme dans une résine sur un substrat. La photolithographie se compose de trois étapes : l'induction de la résine, l'insolation et le développement. Lors de l'étape d'induction, un dépôt de résine est effectué au centre du substrat, puis l'utilisation d'un « spin-coater » permet l'étalement uniforme de la résine. L'épaisseur de la couche de résine dépend de la vitesse de rotation du substrat dans le spin-coater et de la viscosité de la résine utilisée. La résine est par la suite chauffée pour éliminer toute trace de solvant résiduel. Lors de la seconde étape, l'insolation, un masque opaque est mis en contact avec le substrat. Le masque est alors éclairé par un rayonnement UV. Deux types de résine existent : les résines négatives, et les résines positives

[17]. Dans le cas des résines négatives, les parties insolées restent après l'étape de développement et inversement pour les résines positives. Dans la dernière étape, le développement, la résine est mise en contact avec un solvant spécifique. Dans les cas des résines positives, le développeur dissout les parties insolées et inversement pour les résines positives. Les dimensions des microstructures sont donc définies par l'étape d'induction pour la hauteur des microstructures et par le masque pour les dimensions latérales (Figure V-2).

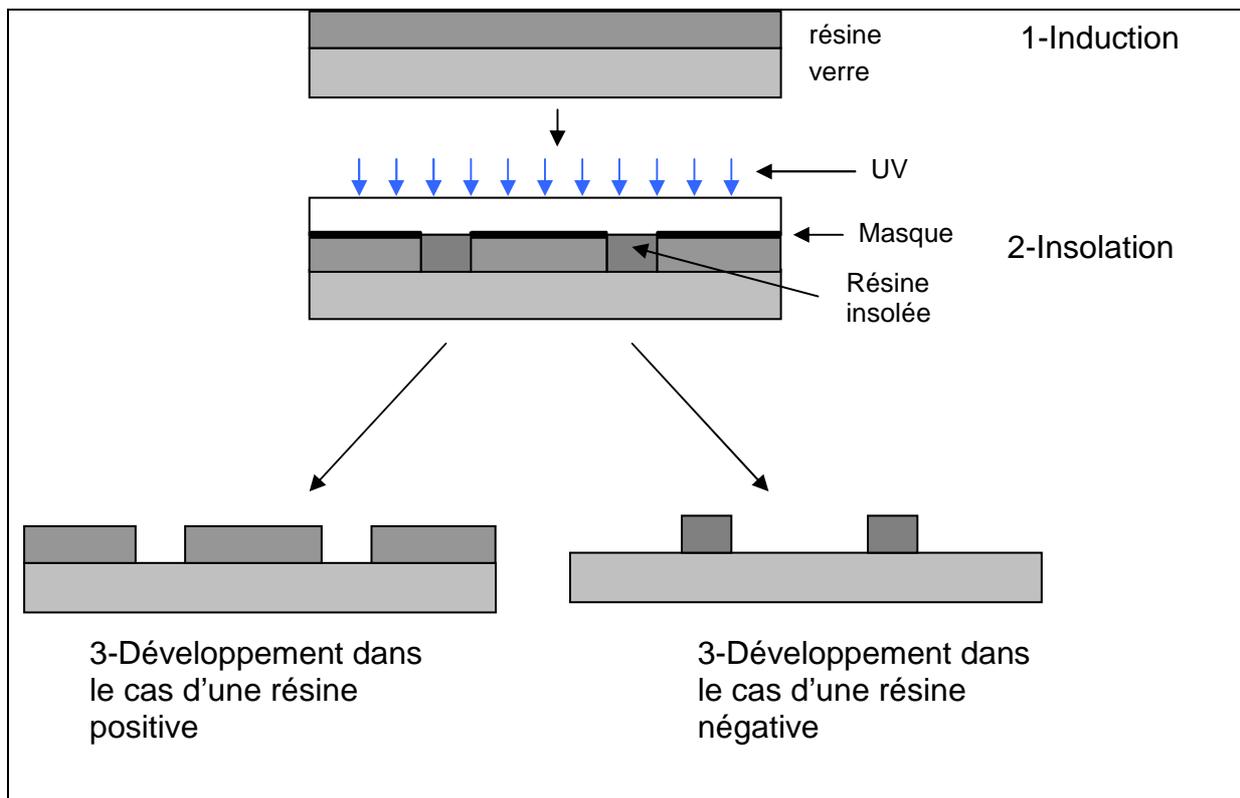


Figure V-2 : Principe des étapes de photolithographie selon le type de résine positive ou négative.

### VII.3.3.1.2 Gravure ionique réactive (RIE pour Reactive-Ion Etching)

La RIE est un procédé de gravure sèche, c'est-à-dire que les produits chimiques sont en phase gazeuse et non en phase aqueuse. Le substrat est placé dans une enceinte contenant des gaz et deux électrodes. Un plasma est alors créé et les ions accélérés par le champ électrique réagissent avec le substrat de façon chimique et physique. La gravure physique est anisotrope et la gravure chimique est isotrope. Dans le cas d'une gravure isotrope favorisée, les parois ont une forme plus arrondie [18-19].

### VII.3.3.2 Techniques de microfabrication « douces »

Les techniques de microfabrication « douces » permettent de réaliser des puces microfluidiques dans des élastomères ou des plastiques. L'utilisation du polydiméthylsiloxane (PDMS) a été introduite pour la première fois pour la fabrication de microsystème par le groupe de Whitesides [20]. Le PDMS est un polymère couramment utilisé pour la fabrication de systèmes microfluidiques [21–30]. Il s'agit d'un polymère dont le motif de base est représenté sur la Figure V-3. Ce polymère a un aspect visqueux et transparent. Du fait de sa souplesse, le PDMS est utilisé pour réaliser des membranes déformables ou des vannes [31].

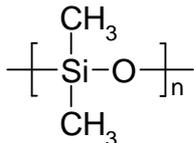


Figure V-3 : Motif de base du PDMS.

Pour préparer l'élastomère, le PDMS et son réticulant sont mélangés, puis placés sous vide pour éliminer toutes les bulles. Le PDMS va alors durcir. La réaction de réticulation peut se faire à température ambiante en une journée, celle-ci peut-être accélérée à plus haute température (1 heure à 75 °C). Les propriétés mécaniques du PDMS peuvent être modifier en jouant sur la proportion de réticulant. Une fois durci, le PDMS possède une surface hydrophobe, ce qui permet d'assurer l'étanchéité fluidique des puces. Le PDMS présente divers avantages par rapport aux autres polymères :

- il est très facile à manipuler et à couper (module de Young très faible ce qui lui permet de se déformer),
- il présente un démoulage rapide sans risque d'abîmer le moule,
- il est optiquement transparent jusqu'à 280 nm. Une détection UV ou par fluorescence est donc possible,
- il est biologiquement inerte, le PDMS peut donc être utilisé pour des applications biologiques et médicales.

Pour fabriquer le canal microfluidique, le PDMS est coulé dans un moule ou « wafer » comportant le circuit fluidique en relief. Le PDMS est alors démoulé, et les connexions sont percées. Le microcanal est scellé sur un substrat en verre ou en PDMS. Pour rendre le collage irréversible, un plasma est utilisé. Lorsque les deux faces exposées au plasma sont mises en contact, des liaisons covalentes sont créées [32]. Cependant, les surfaces ne sont activées que temporairement, il donc nécessaire de réaliser le collage immédiatement après l'application du plasma (Figure V-4).

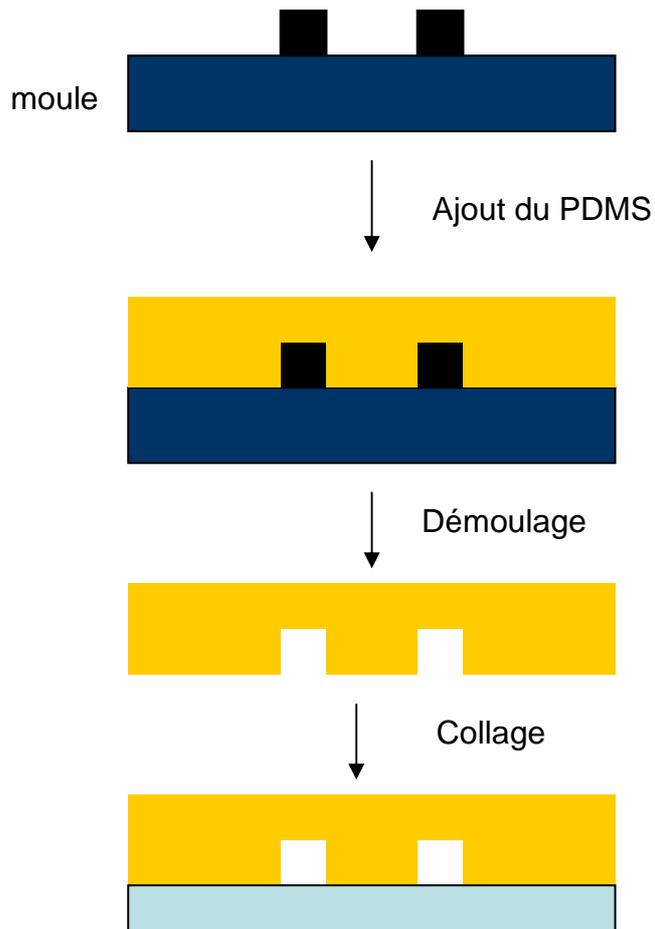
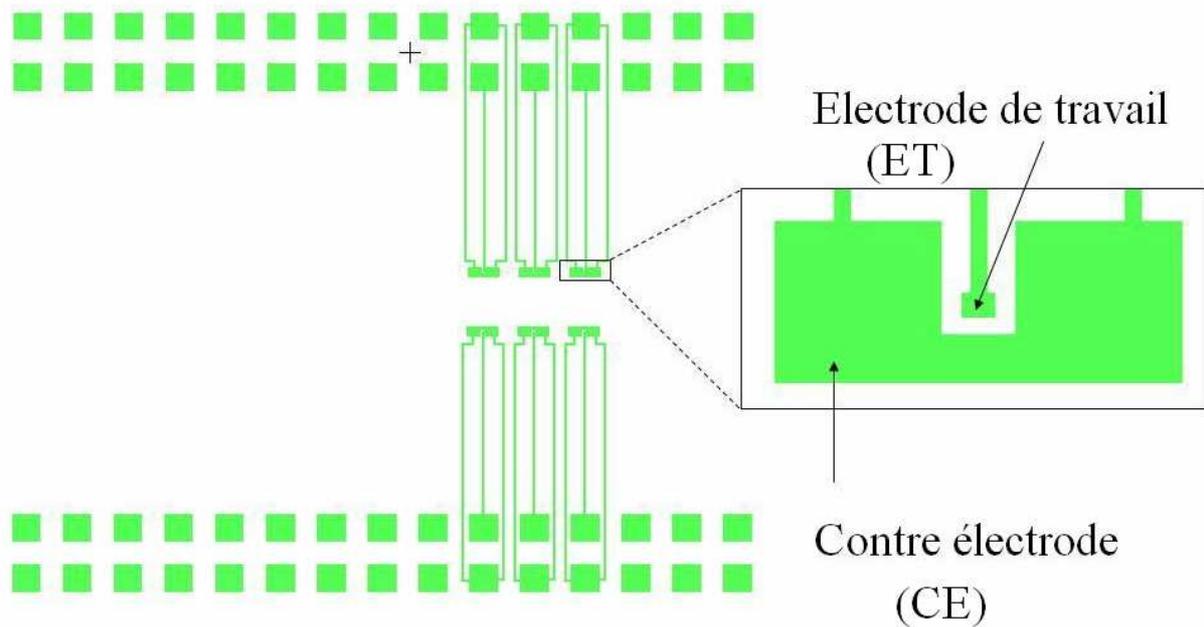


Figure V-4 : Etapes de fabrication du canal fluide en PDMS.

### VII.3.4. Fabrication de la puce microfluidique

Le masque a été dessiné sur le logiciel L-edit. Il comporte deux dessins : le circuit fluide et les microélectrodes (Figure V-5). Le circuit fluide sera réalisé en PDMS pour être ensuite scellé sur une lame de microscope en verre comportant des microélectrodes en Ti/Pt ou Ti/Pt/CNx. Le système de détection électrochimique est composé de 6 jeux de 2 microélectrodes, trois jeux pour chaque microcanal. Un jeu de 2 microélectrodes est composé d'une microélectrode de travail et d'une contre électrode avec une surface 24 fois plus importante. Cette configuration avec une grande contre électrode permettra de s'affranchir d'une électrode de référence en puce. De plus, les six jeux de microélectrodes peuvent permettre d'utiliser plusieurs fois la même puce microfluidique dans le cas où un jeu de microélectrodes serait abîmé.

### Niveau 1 : microélectrodes et connecteurs



### Niveau 2 : canal fluide

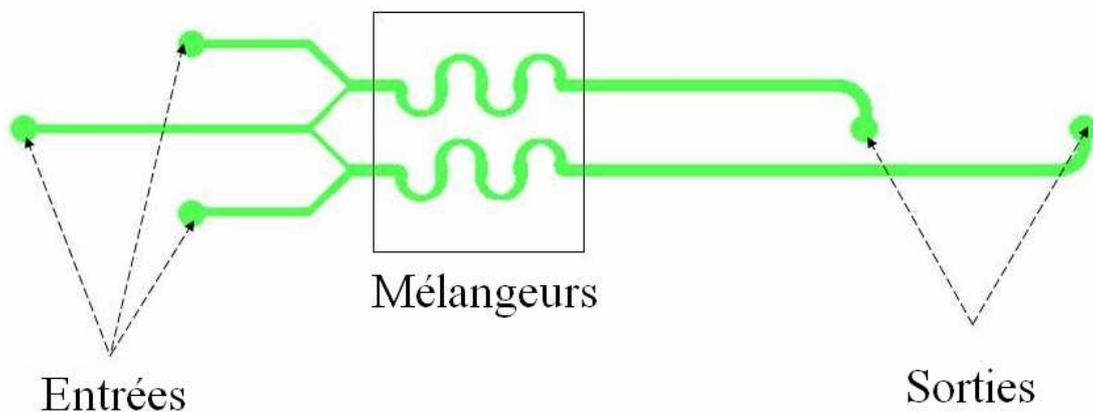


Figure V-5 : Masque du système microélectrode/connecteur et du circuit fluide.

Le circuit fluide propose trois entrées et deux sorties, les largeurs des microcanaux ont été choisies pour limiter les augmentations de pressions et dépressions. Des arrondis sont utilisés pour limiter l'introduction de bulles.

Les masques sont fabriqués sur transparents par la société Selba (Suisse).

### VII.3.4.1 Etapes préparatrices

Les lithographies sont réalisées sur un isolateur MJB3 sans filtre. Les masques sur transparents sont transférés sur plaques de verre pour avoir des masques chromés. Ces masques chromés permettent une photolithographie reproductible en mode contact et se dégradent plus difficilement que les transparents.

Les plaques de verre et de Si sont toujours nettoyées avec une solution de piranha ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  50/50 v/v) pendant 20 min puis rincées abondamment à l'eau. Les plaques sont séchées avec de l'isopropanol et par un flux d'azote. Les lames de verre utilisées pour la puce microfluidique font de 300 à 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

### VII.3.4.2 Réalisation des microélectrodes

Un masque chromé est réalisé à l'aide d'une lithographie AZ5214-e positive (20 s sur IMJB3) sur une plaque chromée (200 nm de Cr) pour fabriquer les microélectrodes et les connecteurs (Figure V-6).

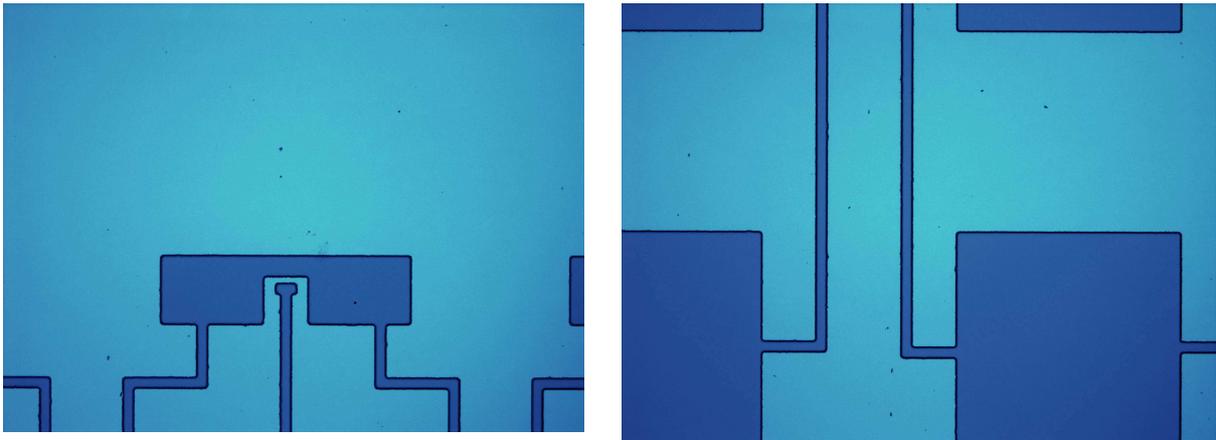
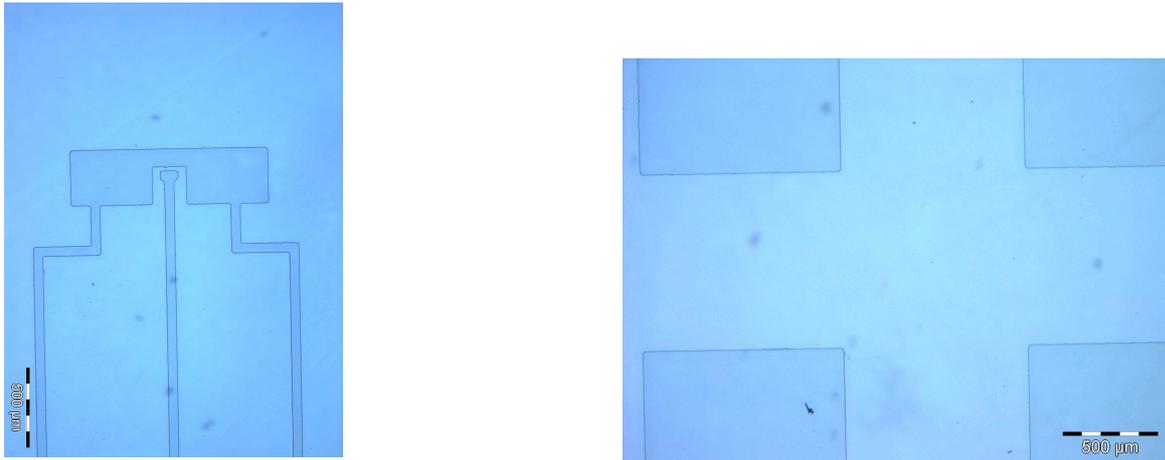


Figure V-6 : Photolithographie AZ5214-e positive sur les plaques chromées. A gauche : les microélectrodes. A droite : les connectiques.

Ensuite, le masque chromé est placé dans le « chrome etch » jusqu'à disparition totale du chrome non protégé. A partir du masque chromé, une lithographie sur plaque de verre, préalablement nettoyée, est réalisée en AZ5214e inversé. Une RIE est effectuée pour nettoyer la surface pendant 1 minute 30 secondes (Figure V-7).



**Figure V-7 : Plaque de verre après lithographie inversée et RIE. A gauche : les microélectrodes. A droite : les connectiques.**

Les échantillons sont métallisés avec du Ti/Pt (5/25 nm) ou Ti/Pt/CNx (5/25/200nm) après la gravure ionique réactive. Pour n'avoir que les microélectrodes présentes sur le verre, un lift-off est mis en oeuvre. Pour cela, la lame de verre est retournée dans le bain à ultrasons. Le substrat est rincé très abondamment avec de l'acétone. La Figure V-88 récapitule les étapes de fabrication des microélectrodes.

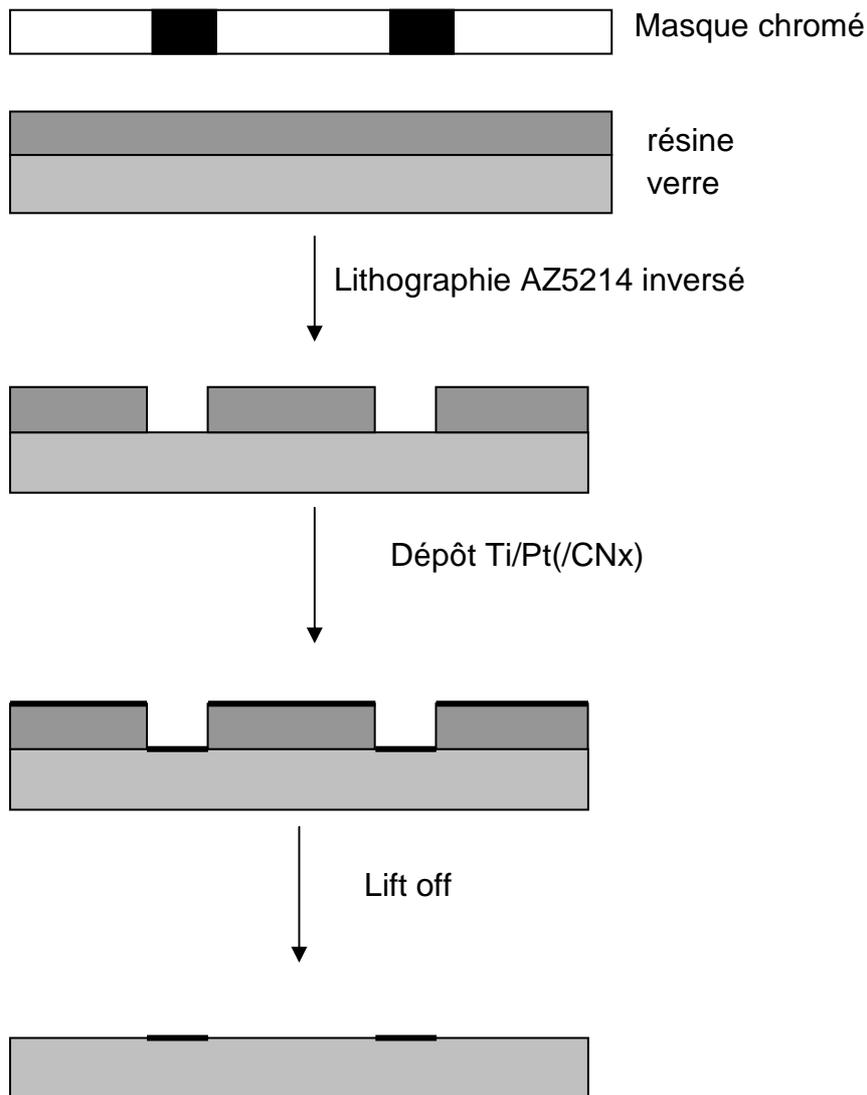
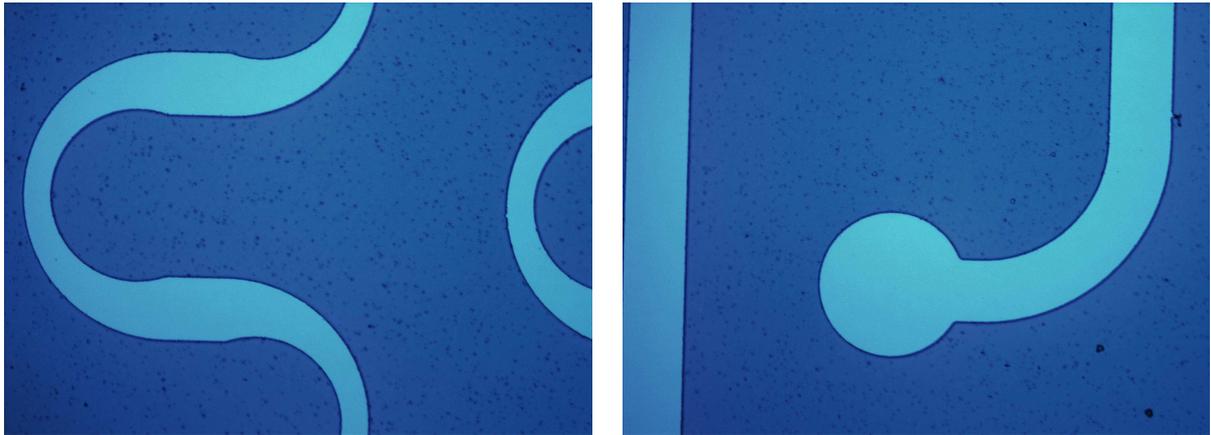


Figure V-8 : Etape de la microfabrication des microélectrodes sur une plaque de verre.

Par la suite une soudure ultradélicate de microfils sur les connectiques est réalisée au laboratoire pour pouvoir relier la puce microfluidique au potentiostat voie bas courant.

### VII.3.4.3 Réalisation du circuit fluide

Une lithographie inversée est réalisée sur une plaque chromée (200 nm de Cr) (Figure V-9) pour la réalisation du système fluide. Une RIE est effectuée pendant 1 minute et 30 secondes pour nettoyer la surface. L'étape de « chrom etch » est identique à celle réalisée pour la préparation des microélectrodes.



**Figure V-9 : Photolithographie AZ514-e inversée sur les plaques chromées. A gauche : mélangeur du canal micro fluidique. A droite : canal et sortie.**

Ensuite, une photolithographie de la résine SU8 2010 déposée sur une plaque de Si (100) est réalisée (Figure V-10). Celle-ci se décompose en plusieurs étapes :

1-Etalement de la résine SU8 2010 à 500 rpm pendant 10 secondes puis à 1000 rpm pendant 30 secondes.

2- La plaque de Si avec la résine est chauffée à 95°C pendant 3 minutes et 30 secondes pour éliminer le solvant résiduel et homogénéiser le dépôt.

3- Insolation pendant 40 s (le substrat est mis en contact avec un masque opaque qui est éclairé par lumière UV).

4- La plaque de Si avec la résine est chauffée à 95°C pendant 4 minutes et 30 secondes.

5- Développement dans le « SU 8 developer » pendant 2 minutes 10 secondes. Le premier développement n'est pas toujours efficace. Dans le cas où il y a apparition de traces blanches lors du rinçage avec l'isopropanol, il faut reprendre le développement avec le « SU 8 développer ».

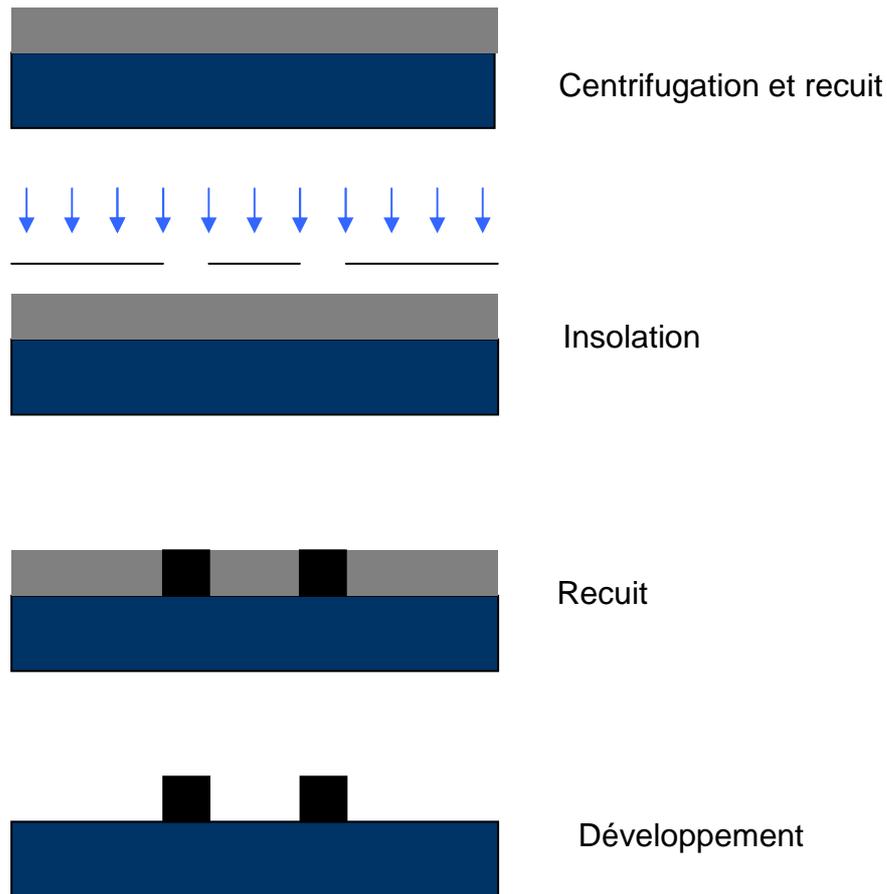


Figure V-10 : Etape de fabrication du masque du circuit fluidique en SU 8.

Pour réaliser le canal en PDMS, une première étape consiste à mélanger le PDMS et son réticulant dans les proportions 9/1 (m/m). Cette préparation est placée dans un dessiccateur sous vide pendant 15 min, pour éliminer les bulles d'air. Dans une deuxième étape le PDMS est coulé sur la plaque de Si avec le motif SU8 développé, la plaque de Si recouverte de PDMS est placée dans le dessiccateur sous vide pour dégazer le PDMS pendant 10 minutes. L'ensemble PDMS/Si avec SU8 est placé à température ambiante pendant au moins 24 h, le temps que le PDMS se soit réticulé.

Lorsque le PDMS a durci, il est découpé au cutter puis démoulé. Des connexions au niveau des 3 entrées et des deux sorties sont réalisées grâce à un poinçon de diamètre 0,75  $\mu\text{m}$ .

Le PDMS et la lamelle de verre avec les microélectrodes sont nettoyés à l'isopropanol. L'assemblage final est réalisé grâce à un traitement plasma, le PDMS et la lamelle de verre avec les microélectrodes sont placés sous plasma d'azote pendant 80 s. L'exposition au plasma permet d'activer temporairement les surfaces. Après un alignement correct du circuit fluidique et des microélectrodes, le PDMS est alors mis en contact de la lamelle de verre. L'activation de la surface permet un collage rapide des deux couches. L'ensemble est alors

chauffé à 100°C pendant 5 minutes (Figure V-11).

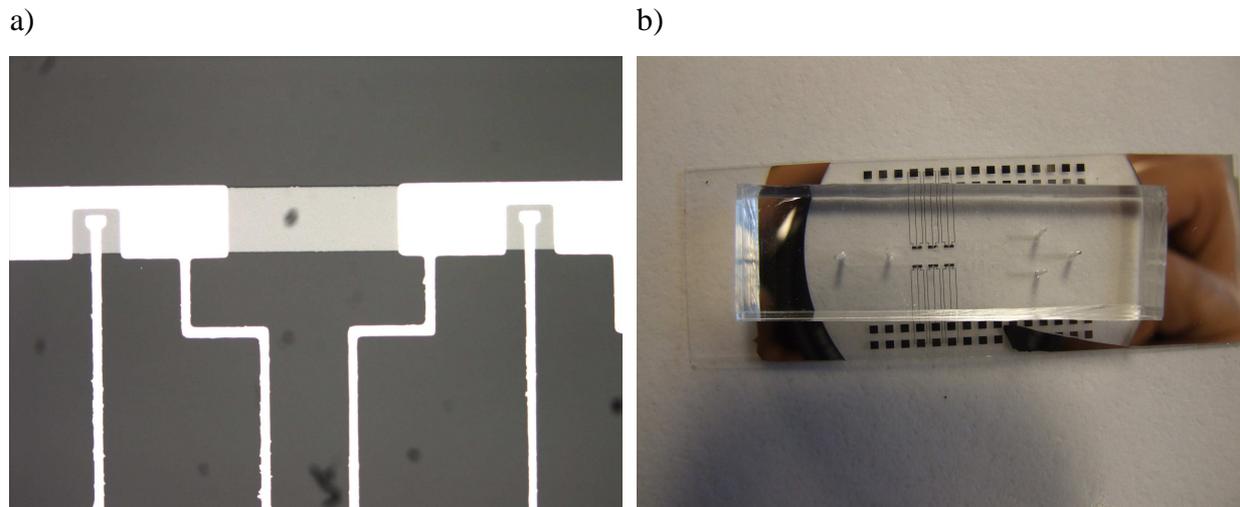


Figure V-11 : a) Puce finale montrant les microélectrodes alignées sur le canal microfluidique en PDMS. b) Photo de la puce microfluidique finale.

### VII.3.5. Mesure des dimensions de la puce microfluidique

Les mesures des dimensions sont réalisées sous un microscope Zeiss à objectif inversé avec le logiciel AxioVision (Figure V-12). La hauteur du canal microfluidique est de 58  $\mu\text{m}$ . Cette distance correspond à la hauteur des motifs obtenus à l'aide de la photolithographie en utilisant la résine SU8. La largeur de la microélectrode de travail est de 56  $\mu\text{m}$  à la base du T et 106  $\mu\text{m}$  en haut du T. La microélectrode de travail est longue de 200  $\mu\text{m}$  (150  $\mu\text{m}$  pour la partie fine du T et 50  $\mu\text{m}$  pour la partie large du T). L'aire de cette microélectrode est de 13800  $\mu\text{m}^2$  ( $1,38 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ ). La microélectrode de travail est séparée de la contre électrode de 28  $\mu\text{m}$  à 79  $\mu\text{m}$  (27  $\mu\text{m} + 52 \mu\text{m}$ ) au maximum. La partie de la contre électrode présente dans le microcanal a une forme de U. La longueur maximale est de 1224  $\mu\text{m}$  tandis que les bases du U ont une longueur de 506  $\mu\text{m}$ . La contre électrode a donc une aire de 305700  $\mu\text{m}^2$  ( $30,57 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ ).

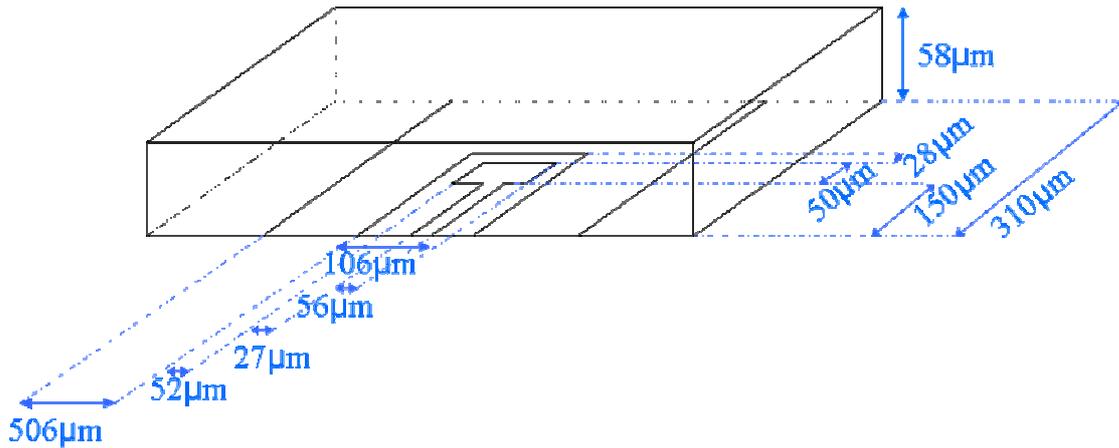


Figure V-12 : Valeurs des distances et dimensions mesurées par microscopie optique.

## VII.4. Optimisation des paramètres et conditions d'analyse

### VII.4.3. Analyse d'un système redox dans la puce microfluidique en mode statique

Dans un premier temps, la réponse des microélectrodes de la puce microfluidique vis-à-vis d'un couple redox, le ferricyanure/ferrocyanure de potassium est étudiée.

La variation d'intensité des pics en fonction de la vitesse de balayage nous permet de déterminer le régime de diffusion observé dans notre puce microfluidique sans flux. En puce microfluidique un comportement couche mince ou une diffusion semi-infinie peut être observé [33], [34], [35]. En effet des études de Clark *et al.* et de Kashyap *et al.* ont montré qu'un comportement quasi-couche mince pouvait être observé sur des microélectrodes placées dans de petits volumes [34], [35]. Dans les études de Rossier *et al.* un comportement couche mince est obtenu avec des électrodes microbande placées au début du microcanal et seulement si la dimension latérale du microsystème est réduite [33]. Cette étude a également montré que pour différentes profondeurs de microcanal, la diffusion est linéaire pour des faibles vitesses de balayage. Cette diffusion peut être comparée à un système où les microélectrodes occupent toute la section du canal. De plus, ils ont démontré à l'aide de la modélisation numérique la transition du régime de diffusion. En effet, le régime de diffusion passe d'une diffusion normale à la longueur du microcanal (aux vitesses de balayage importantes) à une diffusion latérale à la longueur du microcanal (aux faibles vitesses de balayage). Dans le cas où la dimension latérale est importante, une diffusion semi-infinie dans la direction du canal a toujours été observée [33]. Le régime de diffusion peut être vérifié en

traçant le logarithme de l'intensité en fonction du logarithme de la vitesse de balayage. En effet, dans le cas d'une cellule couche mince avec une hauteur faible de microcanal, la relation entre le courant de pic et la vitesse de balayage est donnée par [33]:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 \nu V c_r^0}{4RT} \quad \text{Equation V-13}$$

avec  $\nu$ , la vitesse de balayage (V/s)

$V$ , le volume de la cellule ( $\text{m}^3$ )

$F$ , la constante de Faraday (96500 C)

$R$ , la constante des gaz parfaits ( $\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ )

$n$ , le nombre d'électrons échangés

$T$ , la température (K)

$c_r^0$ , la concentration de l'espèce électroactive ( $\text{mol.m}^{-3}$ )

Dans le cas, d'un microcanal avec une hauteur importante, la relation entre l'intensité et la vitesse de balayage est caractéristique d'une diffusion semi-infinie [36]:

$$I_p = 0,446nFS c_r^0 \left( \frac{nF}{RT} \right)^{1/2} \nu^{1/2} D_r^{1/2} \quad \text{Equation V-14}$$

avec  $S$ , l'aire de la micr'électrode, ( $\text{m}^2$ )

$D_r$ , le coefficient de diffusion ( $\text{m.s}^{-1}$ )

Aoki *et al.* ont établi une équation entre l'intensité et la vitesse de balayage [37], pour prendre en compte la transition entre le comportement couche mince et la diffusion semi-infinie.

$$I_p = 0,446nF \frac{c_r^0 D}{h} \lambda_d^{1/2} \tanh(0,56\lambda_d^{1/2} + 0,005\lambda) \quad \text{Equation V-15}$$

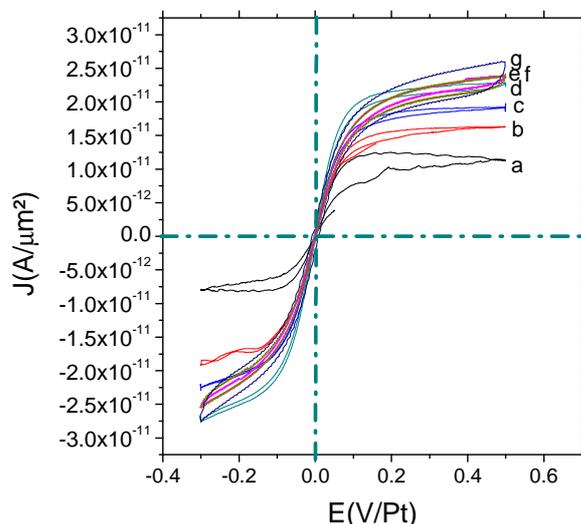
Avec

$$\lambda_d = \frac{nF}{RT} \frac{\nu h^2}{D_r} \quad \text{Equation V-16}$$

$\lambda_d$  représente le ratio d'épaisseur de l'espace de diffusion  $h$  par rapport à l'épaisseur de la couche de diffusion.

En représentation logarithmique de l'intensité en fonction de la vitesse de balayage, le comportement couche mince est caractérisé par une pente de 1 tandis qu'une diffusion semi-infinie est caractérisée par une pente de 0,5.

Le type de comportement ayant lieu dans notre puce microfluidique est caractérisé en réalisant une voltammétrie cyclique d'une solution de ferricyanure/ferrocyanure de potassium  $10^{-2}$  M dans KCl 0,1 M. La Figure V-13 montre les voltammogrammes pour des vitesses de balayage de 5 à 500 mV/s.



**Figure V-13 :** Voltammogrammes du système ferricyanure/ferrocyanure 2 mM dans KCl 100 mM en statique à différentes vitesses de balayage ( $S = 13800 \mu\text{m}^2 = 1,38 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2$ ) a)  $1 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  b)  $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . c)  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . d)  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . e)  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . f)  $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . g)  $500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Tous les voltammogrammes présentent une forme sigmoïdale caractéristique de la réponse d'une microélectrode. De plus, les courbes sont centrées à  $E_{\text{eq}} = 0 \text{ V/Pt}$ . Ceci est obtenu car nous sommes en système équimolaire en ferricyanure/ferrocyanure (voir Chapitre IV.3.3.1). Les valeurs des intensités de plateaux sont relevées en fonction de la vitesse de balayage (Tableau V-1).

V (mV/s)	$J_{\text{red}} (\text{A}/\mu\text{m}^2) 10^{-12}$	$J_{\text{ox}} (\text{A}/\mu\text{m}^2) 10^{-11}$
1	-0,83	1,11
5	-1,99	1,63
10	-2,25	1,91
50	-2,74	2,28
100	-2,54	2,38
200	-2,54	2,38
500	-2,67	2,59

**Tableau V-1 :** Valeurs des densités de courant en fonction de la vitesse de balayage pour le couple ferricyanure/ferrocyanure 2 mM dans KCl 100 mM.

Les valeurs des densités de courant de réduction sont toujours légèrement supérieures à celle d'oxydation. Cette différence est due à la différence de coefficient de diffusion du  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  et du  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  respectivement de  $6,0 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et de  $5,7 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [38]. En effet, le coefficient de diffusion du ferricyanure est légèrement supérieur à celui du ferrocyanure. L'intensité du plateau de réduction du ferricyanure est donc légèrement supérieure à l'intensité du plateau d'oxydation du ferrocyanure.

Cependant, les voltammogrammes ne présentent pas de palier en réduction, une seconde réaction doit entrer en jeu. Cette réaction est sûrement le début de la réduction de l'oxygène présent dans la solution malgré le barbotage de celle-ci avec un flux d'azote. Ceci peut aussi expliquer la difficulté qu'il y a à estimer la valeur de  $J_{red}$ .

Dans notre cas, une légère variation de densité de courant est observée lorsque les vitesses de balayage passent de 1 mV/s à 50 mV/s, puis aucune variation importante d'intensité en fonction de la vitesse de balayage n'est observée. Si on trace la variation du logarithme de l'intensité du plateau en fonction du logarithme de la vitesse de balayage pour les trois premières vitesses une pente de 0,15 est trouvée. Cette valeur ne correspond pas à une valeur pour une couche mince ni pour une diffusion semi-infinie. Dans le cas des microélectrodes sous forme de microbandes les couches de diffusion sont hémicylindriques comparativement aux microhémisphères ou microdisques où les couches de diffusion sont hémisphériques. La diffusion hémicylindrique transporte moins bien les réactifs vers la microélectrode que la diffusion sphérique ce qui ne permet pas de mesurer un courant limite de diffusion dans des solutions statiques. Les microélectrodes sous forme de microbandes ne permettent pas d'obtenir des courants stationnaires mais des courants quasi-stationnaires. En effet, pour des électrodes microbandes, le courant quasi-stationnaire,  $i_{qs}$ , s'exprime en fonction de la largeur de l'électrode de travail, du coefficient de diffusion et du temps,  $t$  [39] (Equation V-17).

$$i_{qs} = n.F.S.C_0 \cdot \frac{2.\pi.D}{x_e \cdot \ln\left(\frac{64.D.t}{x_e^2}\right)} \quad \text{Equation V-17}$$

Dans cette équation le temps intervient au dénominateur. Or, dans le cas des expériences avec de faibles vitesses de balayage, le temps de mesure est plus long, ce qui explique la diminution de l'intensité des paliers de diffusion.

Pour les expériences suivantes, une vitesse de balayage de 10 mV/s est fixée car les voltammogrammes obtenus à cette vitesse de balayage présentent une forme sigmoïdale bien reproductible et moins bruitées.

#### VII.4.4. Analyse d'un système redox dans la puce microfluidique en conditions hydrodynamique

Après avoir optimiser les paramètres pour l'analyse du système redox sans écoulement, ceux-ci doivent être déterminés en présence d'un écoulement. En effet, dans le cas des électrodes microbandes des courants limites de diffusion ne peuvent être mesurer dans des solutions statiques, mais peuvent être mesurer dans le cas où les microélectrodes se situent dans une puce microfluidique en présence d'un écoulement laminaire. Les paramètres à optimiser sont alors : la vitesse de balayage et la vitesse du flux dans la puce microfluidique. Dans ce cas, le flux imposé par le pousse seringue de précision entraîne une convection forcée dans le microcanal.

Les travaux de Levich ont montré que dans le cas d'une microélectrode type microbande, l'intensité du courant limite de diffusion s'exprime comme suit dans le cas où la convection prédomine [40] :

$$I_{\text{lim}} = 0.925nFC x_e^{2/3} wD^{2/3} \left( 4 \frac{F_v}{h^2 d} \right)^{1/3} \quad \text{Equation V-18}$$

avec :  $n$ , le nombre d'électrons échangés,  $F_v$ , le débit volumique (en  $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $C$ , la concentration en espèce électroactive (en  $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), et  $D$ , le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive (en  $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $x_e, w, d$  et  $h$ , les valeurs des distances (en cm), sont indiquées dans la Figure V-13.

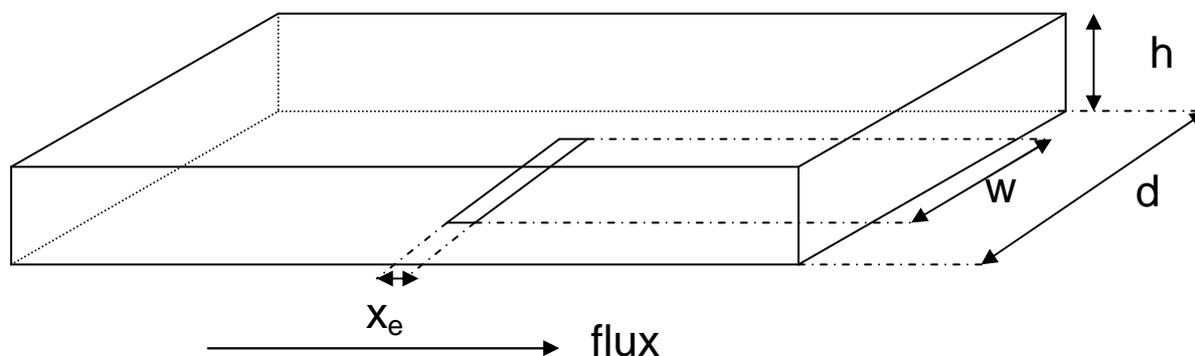


Figure V-13 : Schéma d'une électrode microbande dans un microcanal.

Les études d'Amatore *et al.* ont montré une influence de la géométrie et des paramètres hydrodynamiques sur le courant stationnaire. En effet, les microélectrodes microbandes peuvent aussi présenter un comportement type couche mince lorsque la diffusion est le principal régime de transport. La largeur de la couche de diffusion est alors limitée par la hauteur du canal et le courant stationnaire suit un comportement type couche mince [41] [40].

$$I_{\text{couche mince}} = nFC_{\text{bulk}} u_{\text{av}} dh \quad \text{Equation V-19}$$

avec  $u_{\text{av}}$ , la vitesse moyenne du flux. ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )

Pour déterminer l'influence des paramètres géométrique de la puce microfluidique, le nombre de Peclet,  $P_e$ , a été introduit. Le nombre de Peclet est le rapport entre les constantes de temps du transport convectif et du transport diffusif [41].

$$P_e = \frac{u_{\text{av}} \cdot h}{D} \quad \text{Equation V-20}$$

Par la suite, la largeur de la microélectrode,  $x_e$ , sera adimensionné et donnant [44] :

$$X_e = \frac{x_e}{h} \quad \text{Equation V-21}$$

Amatore *et al.* ont alors montré que le courant de Levich adimensionnel est une fonction de  $X_e$  tant que la largeur de la couche de diffusion convection est partiellement contrôlée par la dimension de la microélectrode, et reste inférieure à la hauteur du microcanal. Le régime de Levich est présent pour toutes valeurs de  $P_e$  pour tout autant que la valeur de  $X_e$  soit faible. Les conditions favorisant une diffusion type couche mince sont valable pour des faibles valeurs de  $P_e$  pourvu que les valeurs de  $X_e$  ne soient pas trop faibles. Une zone intermédiaire existe où les deux contributions sont présentes.

#### VII.4.4.1 Optimisation de la vitesse du flux

Le même type d'expériences est réalisé pour une solution de ferricyanure/ferrocyanure de potassium 2 mM dans KCl 0,1 M en présence d'un flux laminaire Ces expériences sont réalisées sur un deuxième jeu d'électrode.

Dans un premier temps, la vitesse du flux est optimisée pour avoir des réponses en courant quasi-stationnaire. Pour cela, la vitesse de balayage optimale de 10 mV/s obtenue en mode statique est conservée et l'écoulement varie de 0 à 0,5  $\mu\text{L/s}$  (Figure V-14).

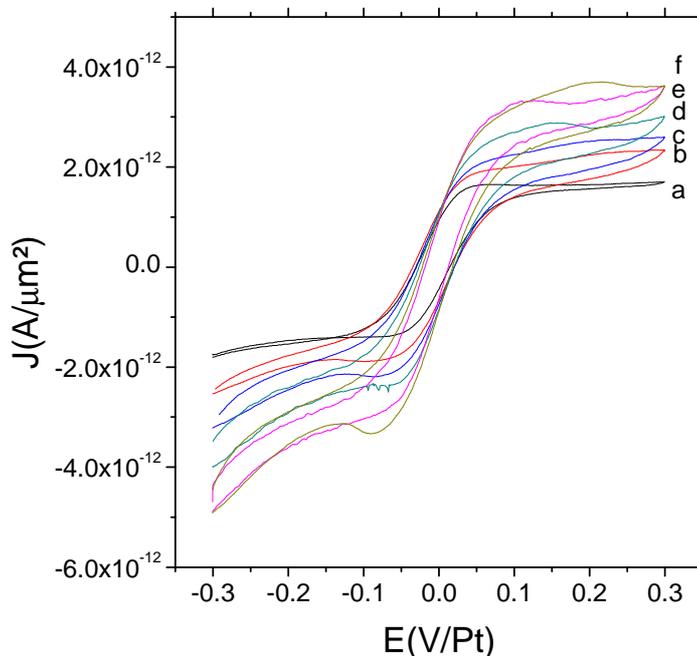


Figure V-14 : Voltammogrammes à  $10 \text{ mV.s}^{-1}$  d'une solution de ferricyanure/ferrocyanure de potassium 2 mM dans 100 mM KCl à différentes vitesses de flux. a) mode statique. b)  $0,05 \mu\text{L.s}^{-1}$ . c)  $0,1 \mu\text{L.s}^{-1}$ . d)  $0,2 \mu\text{L.s}^{-1}$ . e)  $0,3 \mu\text{L.s}^{-1}$ . f)  $0,5 \mu\text{L.s}^{-1}$ .

La densité de courant des pics est dépendante de la vitesse du flux car la convection forcée contrôle la couche de diffusion au voisinage des microélectrodes [42]. Cependant les pics aller et retour ne sont pas confondus, nous ne sommes pas dans un mode purement stationnaire. L'augmentation de densité de courant du plateau de diffusion observée avec l'augmentation du flux est en bon accord avec l'équation V-18.

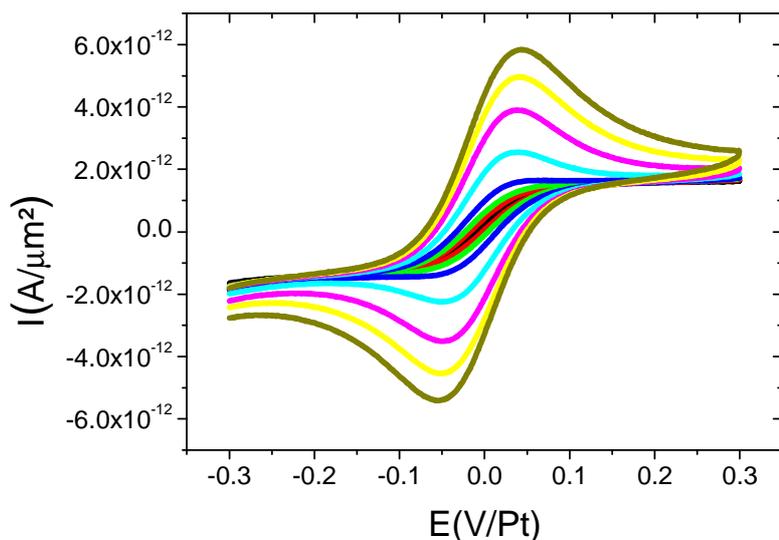
Lorsque le flux est trop important, les voltammogrammes sont relativement bruités. Pour la détection électrochimique dans la puce microfluidique, la vitesse du flux doit être relativement faible pour éviter d'avoir trop de bruit sur les voltammogrammes. Pour les expériences suivantes une vitesse de flux de  $0,05 \mu\text{L/s}$  est choisie.

#### VII.4.4.2 Optimisation de la vitesse de balayage

Une fois le flux optimisé et choisi, la vitesse de balayage doit être optimisée de nouveau pour obtenir des réponses sigmoïdales avec des vagues aller et retour superposables. Pour

cela, une variation de la vitesse de balayage est effectuée en conservant une vitesse de flux de  $0,05 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Les voltammogrammes obtenus possèdent un courant de plateau jusqu'à  $25 \text{ mV/s}$ . Cette forme est observée car le mode de diffusion à la microélectrode est à l'état quasi-stationnaire [43]. Au delà cette vitesse des formes plus typiques de voltammogrammes cycliques sont observées avec présence d'un pic d'oxydation et d'un pic de réduction (Figure V-15).



**Figure V-15 : Voltammogrammes d'une solution de 2 mM de ferricyanure/ferrocyanure dans 0,1 M KCl à différentes vitesses de balayage : 1 mV/s.; 2,5 mV/s.; 5 mV/s ; 10 mV/s ; 25 mV/s ; 50 mV/s ; 75 mV/s ; 100 mV/s.  $F_v = 0,05 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ .**

La densité de courant du plateau ou du pic est également tracée en fonction de la vitesse de balayage (Figure V-16). Les valeurs des densités de courant avant  $25 \text{ mV/s}$ , correspondant aux réponses quasi-stationnaires qui varient peu en fonction de la vitesse de balayage. Cependant, l'écart entre les vagues aller et retour augmente avec la vitesse de balayage jusqu'à  $25 \text{ mV/s}$ . Au delà de cette vitesse, les voltammogrammes montrent la présence de pics. Cette transition est due au passage d'un régime quasi-stationnaire à une diffusion plane. Après cette valeur de  $25 \text{ mV/s}$ , les densités du courant de pic sont modifiées en fonction de la vitesse de balayage. Cette variation de densité de pic est non linéaire en fonction de la vitesse de balayage.

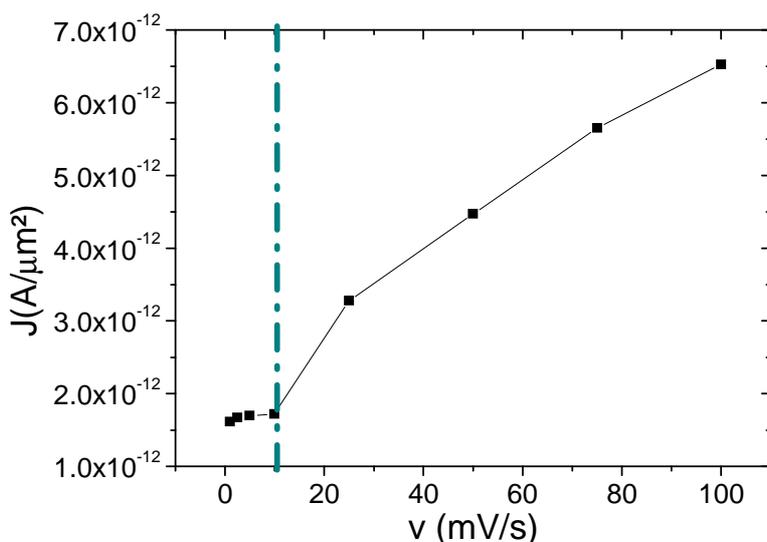
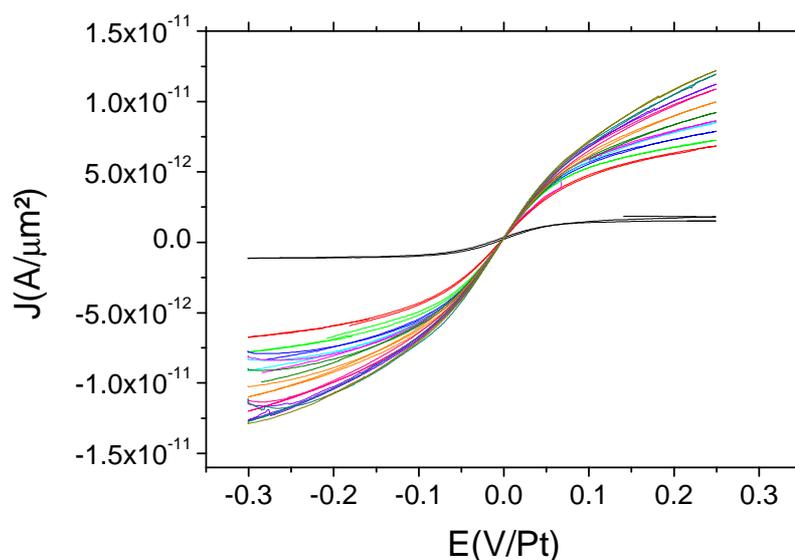


Figure V-16 : Variation de l'intensité du plateau ou du pic en fonction de la vitesse de balayage.

La vitesse de balayage choisie est  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , celle-ci nous permet d'avoir des voltammogrammes quasi-stationnaires avec un écart entre les vagues aller et retour le plus petit possible (6 mV).

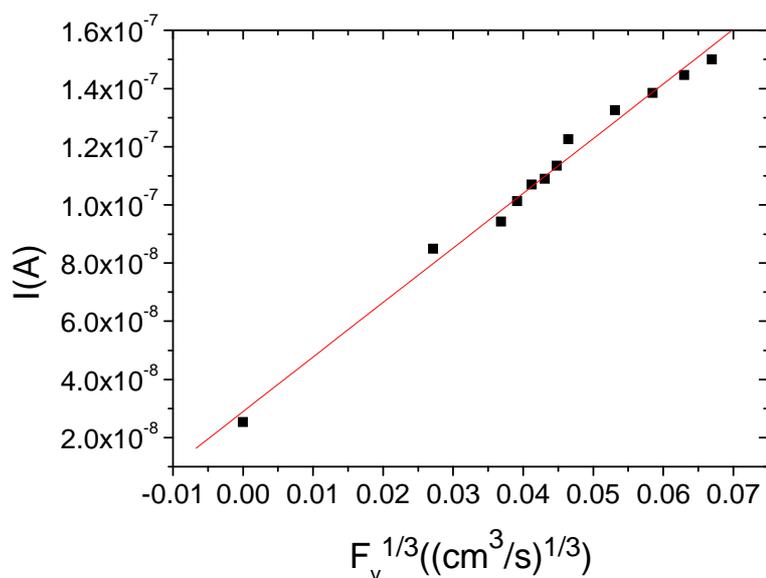
#### VII.4.4.3 Optimisation de la vitesse du flux et comparaison des intensités de pics aux intensités théoriques de Levich

Après avoir déterminé les conditions optimales pour la vitesse de balayage, la variation d'intensité des pics est étudiée en fonction de la vitesse du flux. Dans cette étude la vitesse de balayage choisie est de  $1 \text{ mV/s}$ . Les vitesses de flux varient de  $0,02 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  à  $0,3 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les valeurs de vitesse de flux inférieures à  $0,3 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  permettent de ne pas avoir des voltammogrammes bruités (Figure V-17).



**Figure V-17 : Voltammogrammes quasi-stationnaire du couple ferricyanure/ferrocyanure 2 mM dans KCl 100 mM à 1 mV/s. De bas en haut pour la partie oxydation : statique ; 0,02  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,05  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,06  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,07  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,08  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,09  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,10  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,15  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,20  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,25  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  ; 0,30  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ .**

Les voltammogrammes sont bien quasi-stationnaires dans ces conditions (avec une vitesse de balayage de  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  et pour une gamme de flux comprise entre  $0,02 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $0,3 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La variation d'intensité du plateau en fonction du flux à la puissance 1/3 est tracée sur la Figure V-18

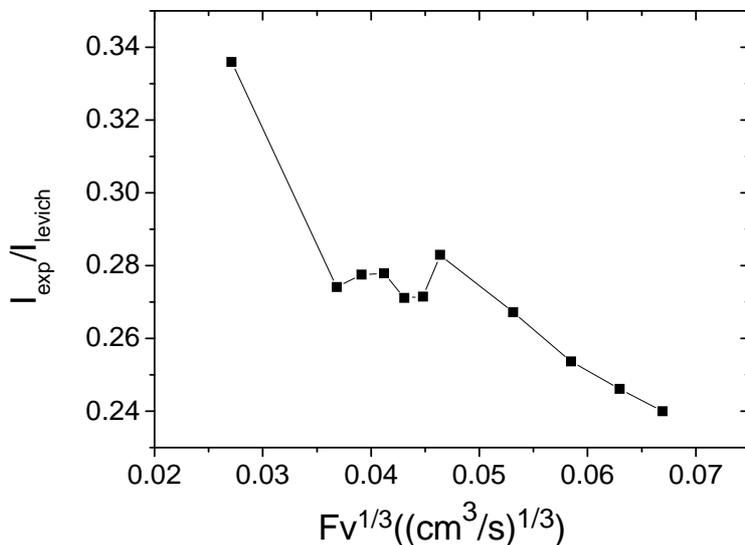


**Figure V-18 : Variation du palier de diffusion en fonction de l'écoulement dans le microcanal en présence du couple ferricyanure/ferrocyanure 2 mM dans KCl 100 mM à 1 mV/s.**

L'intensité varie bien en fonction du flux à la puissance 1/3 avec une équation de droite de  $I = 2,89 \cdot 10^{-8} + 1,88 \cdot 10^{-6} F_v^{1/3}$  pour un coefficient  $R = 0,994$ . L'intensité suit donc bien l'équation V-18.

Ordeig *et al.* ont montré que l'équation V-18 correspond à leur simulation lorsque le flux est élevé mais diffère lorsque le flux est faible ( $< 0,005 \mu\text{L/s}$ ). En effet, l'équation de Levich ne prend pas en compte les effets de bord du microcanal, ni la diffusion sur les bords des microélectrodes. La diffusion radiale sur les bords des microélectrodes doit être prise en compte pour des vitesses de flux faible. Lorsque la vitesse du flux augmente, l'épaisseur de la couche de diffusion diminue et donc la contribution radiale sur les bords des microélectrodes devient négligeable [44][15]. On se retrouve bien dans les conditions décrites par Levich. avec une intensité du courant de plateau qui dépend du flux à la puissance 1/3.

Cependant, la valeur de l'intensité expérimentale est inférieure à celle estimée avec l'équation de Levich. Le courant de Levich est calculé en prenant un coefficient de diffusion de  $6,00 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Le rapport entre les courants expérimentaux et les courants de Levich est présenté dans la Figure V-19. Les courants expérimentaux limites sont pris à 0,3 V/Pt.



**Figure V-19 : Rapport du courant expérimental sur le courant de Levich en fonction du flux pour le couple ferricyanure/ferrocyanure 2 mM dans KCl 100 mM.**

Ce rapport est très loin de ceux trouvés par les études de Compton *et al.* et de Ordeig *et al.* ici celui-ci est supérieur ou proche de 1 [15], [44]. Cependant, notre électrode n'est pas une pure microbande, mais a une forme de T. L'approximation de la considérer comme une simple

microbande n'est pas totalement correcte. On pourrait également supposer que nous ne sommes pas dans un pur comportement de Levich mais que nous sommes à la frontière entre un comportement de Levich et un comportement type couche mince. Pour cela, les paramètres des équations V-20 et V-21 sont calculés.

Dans notre cas,  $X_e$  vaut 0,97 si on considère la base de la microbande ( $x_e = 56 \mu\text{m}$ ) et 1,83 en considérant la partie large de la microbande ( $x_e = 106 \mu\text{m}$ ). La valeur de  $P_e$  est comprise entre 108 et  $1,61.10^3$  selon la vitesse du flux (de  $0,02 \mu\text{L.s}^{-1}$  à  $0,3 \mu\text{L.s}^{-1}$ ). Les valeurs de  $X_e/P_e$  et  $X_e.P_e$  sont calculées et listées dans le Tableau V-2, en considérant les deux valeurs de  $X_e$  et les valeurs de  $P_e$  maximum et minimum.

		$X_e = 0,97$	$X_e = 1,83$	$X_{emoyen} = 1,4$
$F_v = 0,02 \mu\text{L.s}^{-1}$	$X_e/P_e$	$9,0.10^{-3}$	$1,7.10^{-2}$	$1,3.10^{-2}$
	$X_e.P_e$	$1,7.10^2$	$1,7.10^2$	$1,6.10^2$
$F_v = 0,3 \mu\text{L.s}^{-1}$	$X_e/P_e$	$6,0.10^{-4}$	$1,1.10^{-3}$	$8,7.10^{-4}$
	$X_e.P_e$	$1,5.10^3$	$3,0.10^5$	$2,3.10^3$

**Tableau V-2 : Valeurs des coefficients de  $X_e/P_e$  et  $X_e.P_e$  selon les dimensions du microcanal.**

Amatore *et al.* ont montré que quand  $X_e/P_e < 0,04$  et  $X_e.P_e > 15$  le courant suit une loi de Levich [41]. Dans nos conditions d'analyses (vitesse du flux comprise entre  $0,02 \mu\text{L.s}^{-1}$  et  $0,3 \mu\text{L.s}^{-1}$ ), nous sommes dans une zone où le courant est théoriquement de type Levich pur. Cependant, la différence entre le courant de Levich et le courant expérimentale reste encore à expliquer.

#### VII.4.4.4 Modélisation à l'aide du logiciel Comsol multi physique

Une étude de la modélisation des voltammogrammes est réalisée à l'aide du logiciel COMSOL multiphysics [45]. Pour cela, le module transport d'espèces diluées est choisi. Une densité de flux de la masse,  $M$ , exprimée comme le nombre de moles traversant l'unité de surface par une unité de temps, est calculée sur la microélectrode de travail.

$$M = C_{ox} K_f - C_{red} K_b \quad \text{Equation V-22}$$

avec  $C_{ox}$  et  $C_{red}$  étant respectivement les concentrations en espèce ox et red,

avec  $K_f$  et  $K_b$ , étant respectivement les constantes de vitesse caractéristiques d'oxydation et de réduction.

Les expressions de ces constantes peuvent s'écrire sous la forme :

$$K_f = K_{het} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_a n F \eta}{RT}\right) \quad \text{Equation V-23}$$

$$K_b = K_{het} \cdot \exp\left(\frac{-\alpha_c n F \eta}{RT}\right) \quad \text{Equation V-24}$$

avec,  $\eta$  la surtension

$K_{het}$ , la constante de vitesse standard du transfert d'électron,

$\alpha_a$  et  $\alpha_c$  les coefficients de transfert de charge anodique et cathodique.

Les flux sur la microélectrode de travail sont respectivement  $-M$  pour  $C_{red}$  et  $+M$  pour  $C_{ox}$ .

Un courant, appelé current1, est calculé à partir de ce flux par intégration sur la surface.

Le flux sur la contre électrode est alors le courant divisé par la surface de la contre électrode et par la constante de Faraday pour  $C_{red}$ . Pour  $C_{ox}$ , le courant est le courant pour  $C_{red}$  multiplié par -1 (Figure V-20).

Les conditions dans le microcanal sont :

- une convection avec une vitesse selon l'axe  $x$  correspondant à la vitesse du flux divisée par la section de l'entrée et une diffusion sur tout le domaine,
- un flux nul sur tout les autres domaines hormis les microélectrodes,
- une valeur initiale des concentrations pour  $C_{red}$  et  $C_{ox}$  dans tous les domaines,
- un flux de  $0,05 \mu\text{L/s}$  sur les autres zones,
- une vitesse de balayage de  $1 \text{ mV/s}$ .

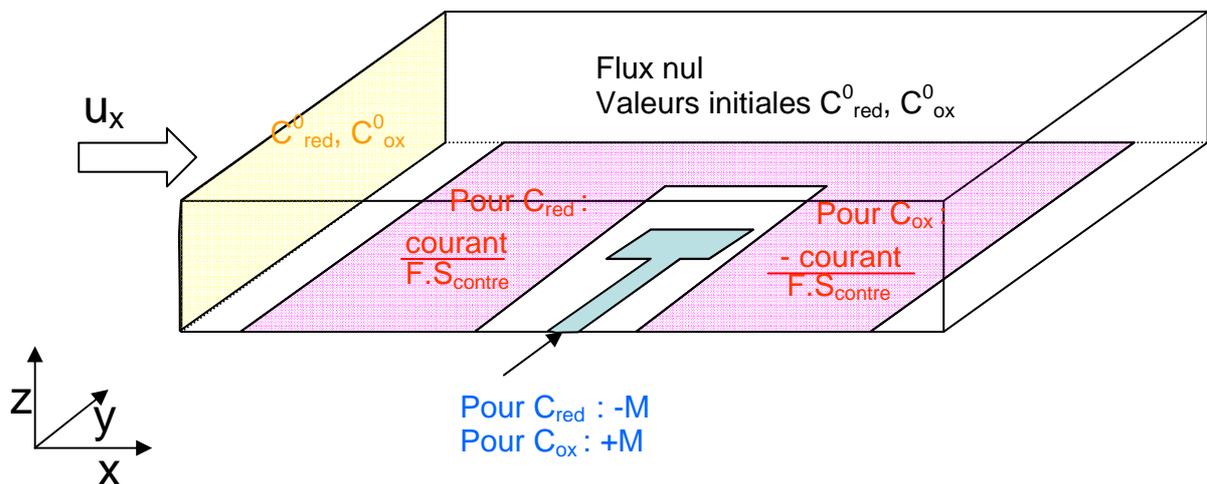


Figure V-20 : Récapitulatif des conditions dans le microcanal.

Pour effectuer le calcul, un maillage est réalisé, celui-ci est plus fin sur la surface de la microélectrode de travail (Figure V-21).

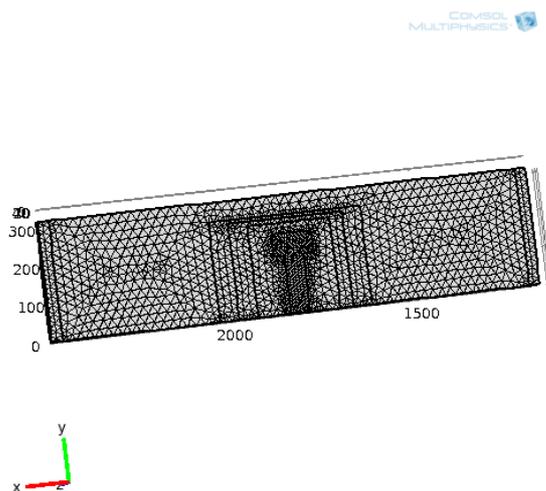


Figure V-21 : Maillage réalisé sur la géométrie de la puce microfluidique sur COMSOL.

Lors de la simulation, le coefficient de diffusion du ferricyanure est pris à  $6,00 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  et celui du ferrocyanure à  $5,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  [38]. La valeur de  $K_{het}$  est de  $0,007 \text{ cm/s}$ . Pour résoudre les équations de diffusion-convection, le logiciel COMSOL utilise la méthode des éléments finis. La Figure V-22 compare le voltammogramme obtenu avec le logiciel COMSOL et celui obtenu expérimentalement. Le voltammogramme se superpose relativement bien au voltammogramme obtenu par le logiciel au niveau de l'inclinaison de la pente. La valeur de  $K_{het}$  choisi est donc la bonne.

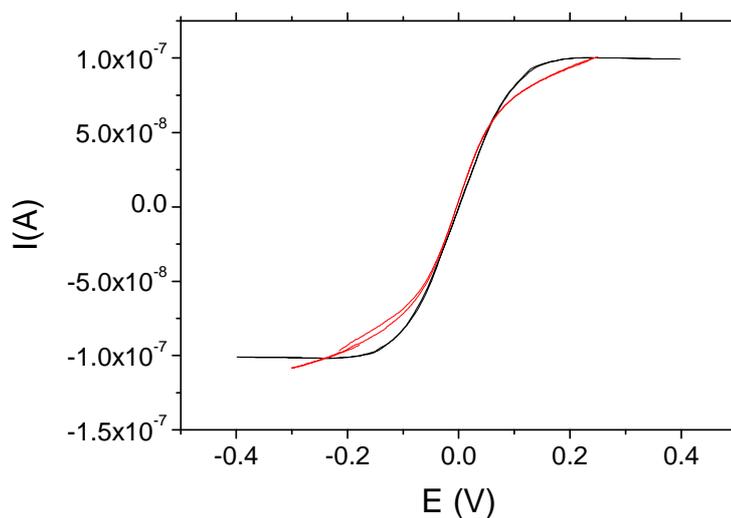


Figure V-22 : Voltammogramme pour le couple ferricyanure/ferrocyanure 2 mM à une vitesse de balayage de  $1 \text{ mV/s}$  avec un flux de  $0,05 \text{ }\mu\text{L/s}$ . Voltammogramme expérimental (rouge). Modélisation Comsol Multiphysics (noir).

La Figure V-23 montre la concentration dans le microcanal durant le calcul. A l'entrée du microcanal, la concentration est maximale puis lorsqu'on s'approche de la microélectrode de travail celle-ci diminue pour ré-augmenter lorsque l'on s'éloigne. A l'approche de la microélectrode de travail, l'espèce Ox est consommée et donc la concentration en Ox diminue (zone bleu). L'espèce Ox est produite au niveau de la contre électrode et donc la concentration augmente zones verte, jaune et orange). La traînée est due au flux qui entraîne les espèces. D'autre part, la Figure V-23b nous montre l'épaisseur de la couche de diffusion (zones bleu à orange). Au-delà de cette couche, les espèces électrochimiques ne subissent pas de réaction.

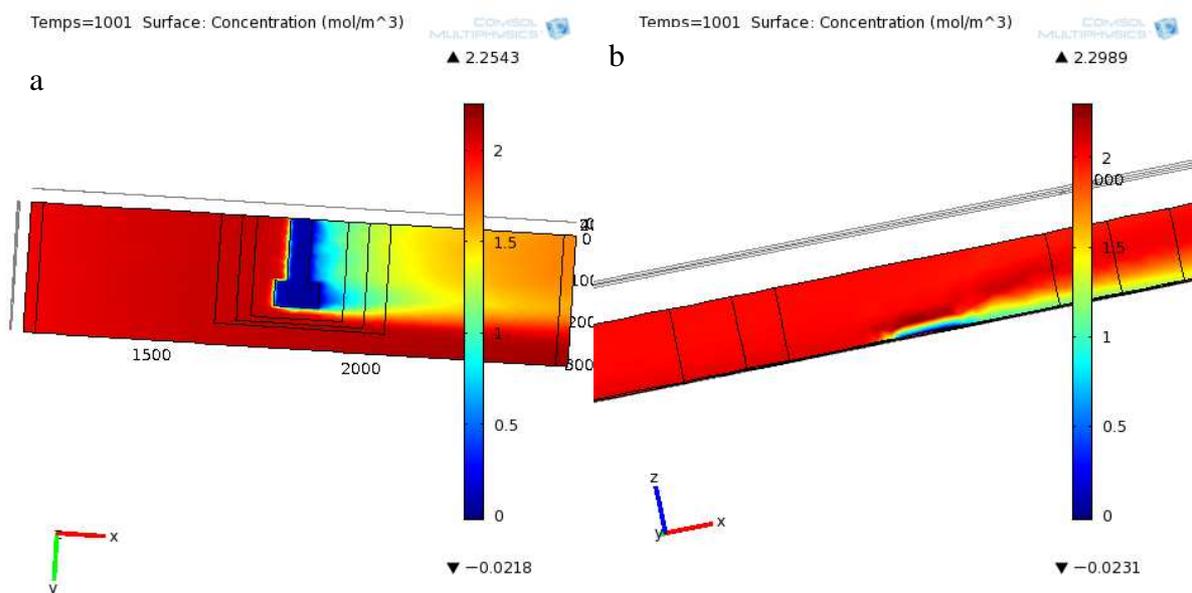


Figure V-23 : Concentration dans le microcanal. a) vu de dessous. b) vu de coupe.

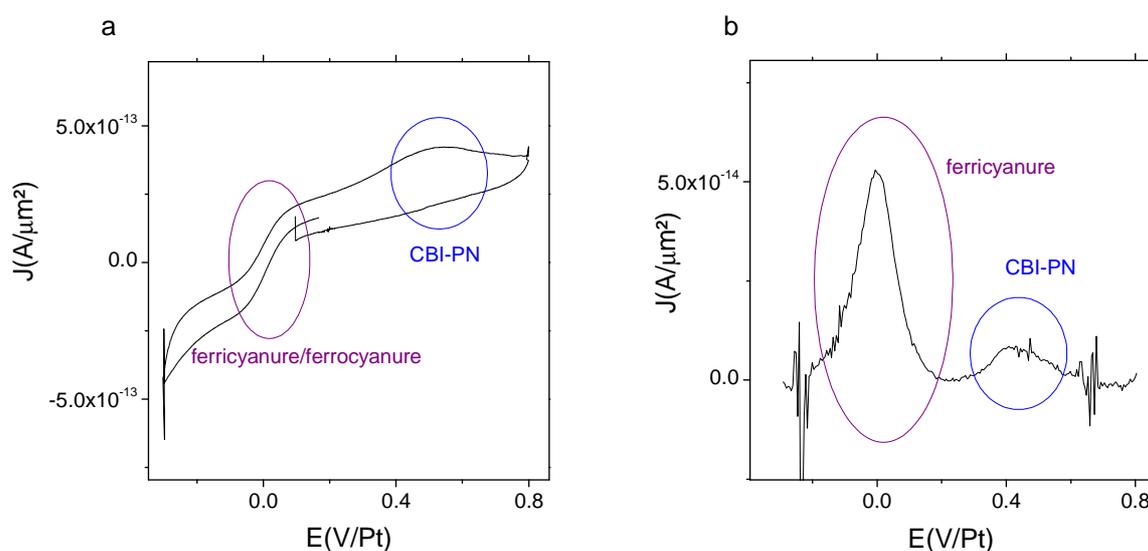
## VII.5. Détection de la dérivation dans la puce microfluidique

Dans cette partie les dérivations seront réalisées avec une méthode où  $NDA/CN = 1$  et  $NDA/peptide = 100$ , dans un tampon borate 100 mM à pH 9. Sauf mention contraire, la concentration finale en PN est de 25  $\mu$ M.

### VII.5.3. Détection en mode statique

Dans un premier temps, la dérivation est réalisée avec une concentration égale en ferricyanure et en ferrocyanure de 0,125 mM. Les potentiels de pics doivent donc être référencés par rapport au potentiel du couple ferricyanure/ferrocyanure. Cependant pour une facilité de lecture des graphes, les potentiels de pics seront écrits par rapport au platine. La

détection du peptide marqué est d'abord réalisée dans la puce microfluidique sans écoulement. Les voltammogrammes sont réalisés avec la vitesse de balayage optimale obtenue en puce sans écoulement c'est-à-dire 10 mV/s. La Figure V-24a montre le voltammogramme de la dérivation. La réponse quasi-stationnaire du ferricyanure et du ferrocyanure est visible ainsi que le pic du CBI-PN à 0,56 V/Pt. La dérivation est aussi analysée par DPV à 25 mV/s (Figure V-24 b). Le pic du ferricyanure est situé à 0,004 V tandis que le pic correspondant au CBI-PN est situé à 0,409 V/Pt. D'autre part ce pic présente une intensité de  $1,7 \cdot 10^{-10}$  A.

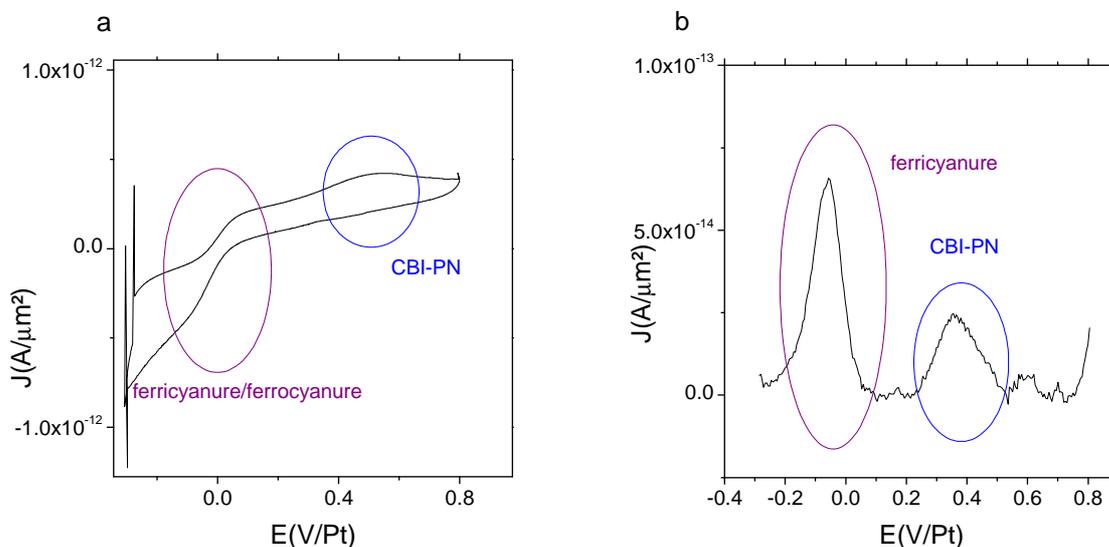


**Figure V-24 : Dérivation du peptide avec le NDA (NDA/PN = 100, NDA/KCN = 1) en présence de 0,125 mM ferricyanure/ferrocyanure de potassium en quantité équimolaire dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v). a) Voltammétrie cyclique à 10 mV/s. b) DPV à 25 mV/s.**

Dans un second temps, pour avoir une meilleure séparation des pics du ferricyanure et du CBI-PN, le ferricyanure et le ferrocyanure ne sont pas mis en quantité équimolaire. La Figure V-25a montre le voltammogramme à 10 mV/s de la dérivation. De même, les pics du ferricyanure et du ferrocyanure ainsi que celui du CBI sont visibles. La dérivation est également analysée par DPV à 25 mV/s. Le pic aller est représenté sur la Figure V-25 : Dérivation du peptide avec le NDA (NDA/PN=100, NDA/KCN =1) en présence de 0,125 mM ferricyanure/0,5 mM ferrocyanure de potassium dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v) a) Voltammétrie cyclique à 10 mV/s. b) DPV à 25 mV/s.

25b. La réponse du ferricyanure est située à -0,06 V tandis que le pic correspondant au CBI-TTR est situé à 0,37 V/Pt. L'écart entre les pics est donc de 0,43 V et est de 0,4 V dans le cas du ferricyanure/ferrocyanure équimolaire. D'autre part, ce pic présente une densité de courant de  $3,3 \cdot 10^{-10}$  A. La variation du ratio ferricyanure/ferrocyanure ne nous permet pas de mieux séparer les pics, cependant il y a un gain en résolution. En effet, le pic du CBI-PN est beaucoup mieux résolu avec un ratio ferricyanure/ferrocyanure non équimolaire. En effet un troisième pic situé à 0,59 V/Pt peut être le CBI-PN simplement dérivé. Ce pic est séparé du

CBI-PN doublement dérivé de 0,22 V (le CBI-PN simplement dérivé est séparé du CBI-PN doublement dérivé de 0,14 V en macrosystème).



**Figure V-25 : Dérivation du peptide avec le NDA (NDA/PN=100, NDA/KCN =1) en présence de 0,125 mM ferricyanure/0,5 mM ferrocyanure de potassium dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate /MeOH (50/50 v/v) a) Voltammétrie cyclique à 10 mV/s. b) DPV à 25 mV/s.**

La dérivation est aussi réalisée sans traceur ferricyanure/ferrocyanure. Dans ce cas aucun pic n'est visible pour la dérivation contrairement aux résultats en macrosystème. Dans la puce microfluidique la présence d'un traceur redox est indispensable pour pouvoir détecter le peptide marqué.

## VII.5.4. Détection en mode dynamique

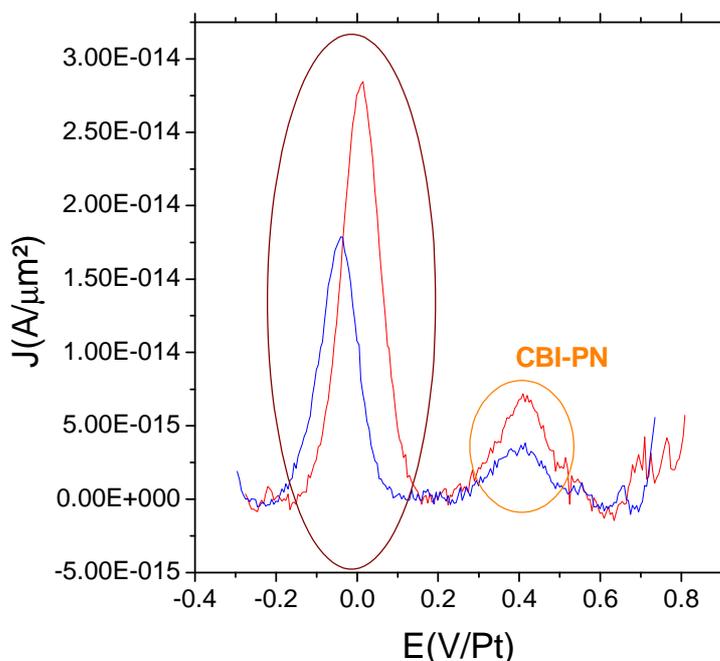
### VII.5.4.1 Dérivation du PN avec différents ratios ferricyanure/ferrocyanure

La dérivation est effectuée avec le flux optimisé à  $0,05 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  en présence d'un traceur redox. Deux différents ratios ferricyanure/ferrocyanure sont utilisés : un ratio de 1 (ferricyanure et ferrocyanure en quantité équimolaire) et un de 0,25. On peut utiliser la relation de Nernst pour prévoir le potentiel d'équilibre  $E_{eq}$  (en utilisant la même formule que dans la partie IV.2.3 avec une concentration en ferricyanure de 0,125 mM et une concentration en excès de ferrocyanure de 0,5 mM).

$$E_{eq} = E^0_{Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}} + 0,059 \log\left(\frac{[Fe(CN)_6^{3-}]}{[Fe(CN)_6^{4-}]}\right) \quad \text{Equation V-25}$$

$$E_{eq} = E^0_{Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}} + 0,059 \log\left(\frac{0,125}{0,5}\right) = E^0_{Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}} - 0,036 \quad \text{Equation V-26}$$

Dans le cas d'un ratio 1, le potentiel du couple de ferri/ferrocyanure est situé à 0 V, tandis qu'il doit être situé à -0,036V lorsque le ratio vaut 0,25. La Figure V-26 montre le voltamogramme obtenu en DPV pour la détection de la dérivation du peptide en présence de ferricyanure/ferrocyanure de potassium pour les deux ratios. Le pic caractéristique du CBI est observé autour de 0,4 V dans les deux cas. Le pic d'oxydation du ferrocyanure est quant à lui décalé vers les potentiels négatifs de 0,041 V lorsque le ratio ferricyanure/ferrocyanure diminue. Cette valeur de potentiel de pic est proche de la valeur prévue en utilisant la formule de Nernst.



**Figure V-26 : DPV à 25 mV/s de la dérivation du peptide avec le NDA (NDA/PN = 100, NDA/KCN = 1) avec un flux de  $0,05 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  en présence de ferricyanure/ferrocyanure dans une solution tampon 100 mM pH 9 borate / MeOH (50/50 v/v). En bleu pour un mélange non équimolaire en ferricyanure et ferrocyanure et en rouge une solution équimolaire.**

La détection du peptide a été réalisée trois fois pour chaque méthode. L'intensité du pic du CBI-PN avec ferricyanure/ferrocyanure en quantité équimolaire est de  $1,03 \cdot 10^{-10}$  A et de  $4,55 \cdot 10^{-11}$  A quand le ratio ferricyanure/ferrocyanure est égal à 0,25. Le Tableau V-3 répertorie les valeurs des potentiels des deux pics d'oxydation avec la moyenne et l'écart type pour trois expériences.

Méthode		$E_p(\text{CBI-PN})$ (V/Pt)	$E_p(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}})$ (V/Pt)	$E_p(\text{CBI-PN}) - E_p(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}})$ (V)
équimolaire	1	0,414	0,009	0,405
	2	0,408	0,008	0,4
	3	0,413	0,012	0,401
	moyenne	0,412±0,003	0,009±0,004	0,402±0,003
Ox/red = 0,25	1	0,414	-0,039	0,456
	2	0,396	-0,021	0,417
	3	0,419	-0,043	0,462
	moyenne	0,415±0,02	-0,034±0,01	0,44±0,03

**Tableau V-3 : Valeurs des potentiels de pic et de la différence de potentiels entre  $E_p(\text{CBI-PN})$  et  $E_p(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}})$  en fonction du ratio ferricyanure/ferrocyanure.**

Les potentiels de pics, avec un rapport de ferricyanure/ferrocyanure de 0,25, sont décalés de 40 mV en moyenne par rapport à la méthode équimolaire. De plus, les deux méthodes donnent des valeurs de potentiel de pics référencées par rapport au pic d'oxydation du ferrocyanure relativement identiques pour les trois expériences. Ceci confirme que cette méthode de détection à deux microélectrodes en présence du couple ferricyanure/ferrocyanure de potassium est mieux adaptée qu'en macrosystème. Par la suite la méthodologie avec un rapport non équimolaire sera conservée. Le Tableau V-4 liste les valeurs des intensités des pics.

Méthode		$I_p(\text{CBI-PN})$ (A)	$I_p(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}})$ (A)
équimolaire	1	$9,1 \cdot 10^{-11}$	$3,9 \cdot 10^{-10}$
	2	$8,0 \cdot 10^{-11}$	$3,0 \cdot 10^{-10}$
	3	$9,0 \cdot 10^{-11}$	$2,8 \cdot 10^{-10}$
	moyenne	$(8,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-11}$	$(3,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-11}$
Ox/red = 0,25	1	$4,5 \cdot 10^{-11}$	$1,4 \cdot 10^{-10}$
	2	$4,0 \cdot 10^{-11}$	$1,9 \cdot 10^{-10}$
	3	$4,2 \cdot 10^{-11}$	$2,5 \cdot 10^{-10}$
	moyenne	$(4,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$	$(1,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-10}$

**Tableau V-4 : Valeurs des intensités de pic en fonction du ratio ferricyanure/ferrocyanure.**

### VII.5.4.2 Limite de détection du CBI-PN et caractéristiques de la méthode

La limite de détection est recherchée dans la puce microfluidique en gardant les rapports NDA/peptide et NDA/KCN constants. L'expérience est répétée trois fois pour chaque concentration en peptide. Entre chaque détection, un rinçage à l'eau bi-distillée et un blanc avec uniquement du ferricyanure/ferrocyanure sont réalisés pour vérifier la reproductibilité de la mesure entre chaque expérience.

Les valeurs des concentrations en peptide testées sont indiquées dans le Tableau V-5 ci-dessous :

[PN] <sub>f</sub> (μM)	[NDA] <sub>f</sub> (mM)	[ferricyanure] <sub>f</sub> /[ferrocyanure] <sub>f</sub> (mM)
1	0,1	0,125/0,25
0,5	0,05	0,125/0,25
0,25	0,025	0,125/0,25
0,1	0,01	0,025/0,05
0,05	0,005	0,025/0,05
0,025	0,0025	0,025/0,05

**Tableau V-5 : Valeurs des concentrations des différentes solutions préparées.**

Pour de faibles concentrations en PN, la concentration en ferricyanure/ferrocyanure est diminuée pour mieux observer le pic du CBI-PN. Ceci permet de ne pas avoir une différence d'intensité trop importante entre le peptide marqué et le ferrocyanure. La variation d'intensité de pic en fonction de la concentration finale en PN est représentée dans la Figure V-27a. Deux domaines de linéarité sont observés, l'un correspondant aux plus fortes concentrations et un correspondant aux plus faibles concentrations. Les points correspondants aux faibles concentrations sont suréstimés. En effet, les pics sont plus larges, on peut donc supposer que le pic du CBI-PN aux faibles concentrations est dû à la fois au doublement dérivé et au simplement dérivé, ce qui a pour effet d'augmenter l'intensité du pic global. Les pics obtenus aux faibles concentrations sont alors déconvolués en deux courbes de Gauss centrées à 0,4 V/Pt et 0,5 V/Pt correspondant respectivement au peptide CBI-PN simplement et doublement marqué en puce (Figure V-28)

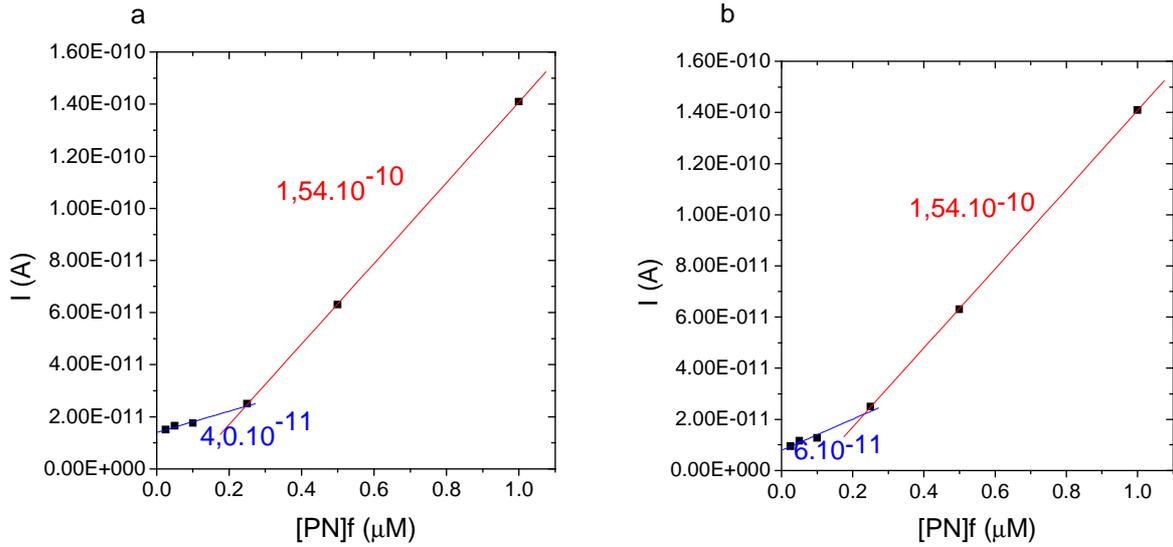


Figure V-27 : Variation de l'intensité du pic en fonction de la concentration finale en PN-TTR pour une dérivation avec un ratio NDA/PN = 100 et NDA/CN = 1, dans une solution tampon borate 100 mM pH 9 /MeOH 50/50 v/v. a) sans déconvolution des pics. b) Avec déconvolution des pics.

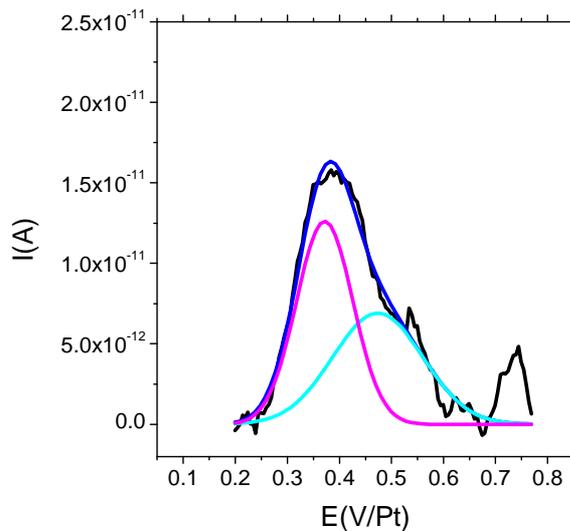


Figure V-28 : Voltammogramme du pic du CBI-PN avec  $[PN]_f = 0,1 \mu\text{M}$ . Déconvolution des pics en deux courbes de Gauss centrées à  $0,4$  V/Pt (rose) et à  $0,5$  V/Pt (cyan).

Une limite de détection de  $25 \text{ nM}$  en puce microfluidique est obtenue pour un courant de  $10 \text{ pA}$ . Cette limite de détection est  $10$  fois inférieure à celle obtenue en macrosystème et plus de  $100$  fois inférieure à celle obtenue en puce microfluidique mais avec une détection par fluorescence en capillaire [46].

La sensibilité et la spécificité de la présente détection du CBI-PN ont été réalisées en macrosystème (IV.3.1). En puce microfluidique,, deux domaines de linéarités sont obtenues ; de  $25 \text{ nM}$  à  $0,1 \mu\text{M}$  en peptide avec une sensibilité est de  $6,0 \cdot 10^{-11} \text{ A}/\mu\text{M}$  et de  $0,1 \mu\text{M}$  et  $1$

$\mu\text{M}$  avec une sensibilité de  $1,54 \cdot 10^{-10} \text{ A}/\mu\text{M}$ . La limite de détection est de 25 nM en peptide TTR tandis que la reproductibilité est égale à 5%

A titre de comparaison, la limite de détection de la glycine dérivée avec le NDA a été déterminée par Yassine *et al* en puce microfluidique en PDMS/verre en détection LIF est de 40 nM. De plus, une bonne reproductibilité est observée, un écart type de 1 à 2% est obtenue pour les intensités des pics [21]. Wang *et al* ont déterminé une limite de détection de 3,2  $\mu\text{M}$  pour l'arginine de 7,4  $\mu\text{M}$  pour la phenylalanine et 3,5  $\mu\text{M}$  pour la glycine avec une détection par ampérométrie en puce microfluidique. La détection présente une bonne reproductibilité avec un écart type compris entre 3,1 et 3,5% [47]. Hyunh *et al.* ont obtenu une limite de détection des acides aminés dérivés par le NDA en présence de 2-mercatoéthanol de 0,12fM avec un écart type sur les mesures de 4,3 à 4,5%. Cette dérivation est réalisée dans une puce microfluidique en PDMS/verre avec une détection LIF [26]. A titre de comparaison, Jacobson *et al.* ont une limite de détection de 0,55 fM et 0,83 fM respectivement pour l'arginine et la glycine dans un microsystème avec une dérivation précolonne utilisant l'OPA/2ME [48] . Jacobson *et al.* ont également réalisé la dérivation post-colonne de l'arginine, la glycine et la thréonine et ont des limites de détection de 200, 130 et 120 fmol respectivement avec un écart type de 1,8% sur les aires de pics [49]. Dans leur cas, la limite de détection de la dérivation en-colonne est supérieure à celle de la dérivation postcolonne.

## VII.6. Conclusions

La puce microfluidique pour la détection du peptide a été réalisée en verre/PDMS. Les dimensions de la puce microfluidique ont été choisies pour avoir un flux laminaire. Une technique de fabrication « douce » a permis de réaliser les microcanaux fluidiques dans le PDMS, tandis que des techniques de fabrication dures ont été utilisées pour la fabrication des microélectrodes et des connectiques. La contre électrode présente une aire 24 fois supérieure à la microélectrode de travail. Une contre électrode avec une aire beaucoup plus importante que la microélectrode de travail a été choisie pour s'affranchir de l'utilisation d'une électrode de référence dans la puce microfluidique.

Cette puce microfluidique a été caractérisée en utilisant un couple redox ferricyanure/ferrocyanure de potassium. Les expériences sans flux ont permis d'obtenir des voltamogrammes quasi stationnaire centrés sur 0 V/Pt. Dans ces conditions, une vitesse de balayage de 10 mV/s a été choisie pour avoir un courant quasi stationnaire sans courant

capacitif trop important et non bruité. En écoulement, la forme des courbes varie en fonction de la vitesse de balayage : passant d'une réponse quasi-stationnaire à faible vitesse de balayage, à des formes plus typiques d'une diffusion plane de voltammogrammes cycliques, présentant des pics à des vitesses supérieures à 25 mV/s. La vitesse de balayage de 1 mV/s est optimale pour obtenir une courbe quasi-stationnaire avec un plateau aller superposable au plateau retour. De plus, les études en fonction de la vitesse de balayage ont montré un comportement type microbande bien que les intensités expérimentales soient inférieures aux intensités théoriques obtenues avec l'équation de Levich.

Dans un deuxième temps, la puce microfluidique a été utilisée pour la détection du peptide PN marqué avec le NDA. La détection a été réalisée en mode statique et hydrodynamique. Dans les deux cas, un pic caractéristique du CBI est observé, ce qui valide la méthodologie établie pour la puce microfluidique à deux microélectrodes. Cependant, un traceur redox, le ferricyanure/ferrocyanure de potassium est nécessaire en solution pour pouvoir fixer au mieux le potentiel. Sans écoulement, une quantité non équimolaire de ferricyanure/ferrocyanure n'entraîne pas un décalage important des pics du traceur, cependant le pic de dérivation du PN est mieux résolu. Un troisième pic apparaît qui est le CBI-PN simplement dérivé. Avec écoulement, une concentration en ferricyanure et en ferrocyanure non équimolaire permet de mieux séparer le pic d'oxydation du ferricyanure et du CBI. En effet le potentiel de pic  $E_p(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}})$  est décalé en moyenne de -34 mV tandis que celui du CBI-PN restent à 0,41V/Pt. La détection en présence d'un flux a permis de montrer une dépendance linéaire de l'intensité en fonction de la concentration en PN final. De plus, le peptide PN peut être détecté jusqu'à une concentration en solution de 25 nM. Cette valeur est dans le même ordre de grandeur que les microsystemes utilisant le NDA comme marqueur [21],[47]. La valeur de la limite de détection est bien inférieure à celle obtenue en macrosystème ou en puce microfluidique qu'avec une détection par fluorescence [46]. De plus, la présente détection est linéaire pour des concentrations en peptide de 0,1  $\mu\text{M}$  à 25 nM avec une sensibilité de  $6,0 \cdot 10^{-11}$  A/  $\mu\text{M}$ . Pour les concentrations plus élevées en peptide, la sensibilité est de  $1,54 \cdot 10^{-10}$  A/  $\mu\text{M}$ . Cependant, aux faibles concentrations en PN, nous avons confirmé que le pic supplémentaire observé correspond au bien simplement dérivé qui vient parasiter le pic doublement dérivé, une déconvolution des pics est donc nécessaire. Le transfert de la méthodologie sur carbone devrait permettre une meilleure séparation des deux espèces. Nous y reviendrons dans la section conclusion générale et perspectives.

## VII.7. Références

- [1] N. Lion, F. Reymond, H. H. Girault, and J. Rossier, “Why the move to microfluidics for protein analysis?,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 15, pp. 31–37, 2004.
- [2] D. Janasek, J. Franzke, and A. Manz, “Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems,” *Nature*, vol. 442, pp. 374–380, 2006.
- [3] P. Abgrall and A. Gu, “Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem — a review,” *J.Micromech.Microeng*, vol. 17, pp. 15–49, 2007.
- [4] H. Andersson and A. Van Den Berg, “Microfluidic devices for cellomics : a review,” *Sensors and Actuators*, vol. 92, pp. 315–325, 2003.
- [5] M. U. Kopp, H. J. Crabtree, and A. Manz, “Developments in technology and applications of microsystems,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 1, pp. 410–419, 1997.
- [6] A. Hatch, A. E. Kamholz, K. R. Hawkins, M. S. Munson, E. A. Schilling, B. H. Weigl, and P. Yager, “A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor,” *Nature*, vol. 19, pp. 461–465, 2001.
- [7] B. Teste, F. Malloggi, J.-M. Siaugue, A. Varenne, F. Kanoufi, and S. Descrois, “Lab on a Chip Microchip integrating magnetic nanoparticles for allergy diagnosis,” *Lab on chip*, vol. 11, pp. 4207–4213, 2011.
- [8] L. A. Legendre, J. M. Bienvenue, M. G. Roper, J. P. Ferrance, and J. P. Landers, “A Simple , Valveless Microfluidic Sample Preparation Device for Extraction and Amplification of DNA from Nanoliter-Volume Samples,” *Anal Chem*, vol. 78, no. 5, pp. 1444–1451, 2006.
- [9] R. Ferrigno, J. N. Lee, X. Jiang, and G. M. Whitesides, “Potentiometric Titrations in a Poly ( dimethylsiloxane ) -Based Microfluidic Device,” *Anal Chem*, vol. 76, no. 8, pp. 2273–2280, 2004.
- [10] K. Stephan, P. Pittet, M. Sigaud, L. Renaud, O. Vittori, P. Morin, and R. Ferrigno, “Amperometric quantification based on serial dilution microfluidic systems,” *Analyst*, vol. 134, pp. 472–477, 2009.
- [11] A. Saliba, L. Saias, E. Psychari, N. Minc, D. Simon, and F. Bidard, “Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays,” *PNAS*, vol. 107, no. 33, pp. 3–8, 2010.
- [12] C. D. Chin and S. K. Sia, “Lab-on-a-chip devices for global health : Past studies and future opportunities,” *Lab on Chip*, vol. 7, pp. 41–57, 2007.
- [13] J. P. Kutter and H. Klank, *Microfluidics-Theoretical Aspect, in Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, O. Geschke. 2004.

- [14] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*. Technical University of Denmark.
- [15] R. G. Compton, A. . Fisher, R. . Wellington, P. . Dobson, and P. . Leigh, “Hydrodynamic Voltammetry with Microelectrodes. Channel Microband Electrodes: Theory and Experiment,” *Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, no. 40, pp. 10410–10415, 1993.
- [16] S. D. Senturia., *Microsystem Design*. Kluwer Academic Publishers, 2001.
- [17] B. Bushan, *Handbook of nanotechnology*. 2004.
- [18] L. Seidel, H., L. Csepregi, and H. Heuberger, A Baumgartel, “Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline-Solutions .1. Orientation Dependence and Behavior Passivation Layers,” *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 11, pp. 3612–3626., 1990.
- [19] N. G. Amado, “Design and fabrication of miniaturised electroanalytical systems,” 2010.
- [20] Y. Xia and G. M. Whitesides, “Soft Lithography,” *Angew. Chem. Int. Ed*, vol. 37, pp. 550–575, 1998.
- [21] O. Yassine, P. Morin, O. Dispagne, L. Renaud, L. Denoroy, P. Kleimann, K. Faure, N. Ouaini, and R. Ferrigno, “Electrophoresis PDMS / glass chips with continuous on-chip derivatization and analysis of amino acids using naphthalene-2 , 3-dicarboxaldehyde as fluorogenic agent,” *Analytica chimica acta*, vol. 9, pp. 215–222, 2008.
- [22] P. Nandi, D. E. Scott, D. Desai, and S. M. Lunte, “Development and optimization of an integrated PDMS based-microdialysis microchip electrophoresis device with on-chip derivatization for continuous monitoring of primary amines,” *Electrophoresis*, vol. 34, pp. 895–902, 2013.
- [23] H. Qiu, J. Yan, X. Sun, J. Liu, W. Cao, X. Yang, and E. Wang, “Microchip Capillary Electrophoresis with an Integrated Indium Tin Oxide Electrode-Based Electrochemiluminescence Detector,” *Analytical Biochemistry*, vol. 75, no. 20, pp. 5435–5440, 2003.
- [24] M. Poitevin, Y. Shakalisava, S. Miserere, G. Peltre, J.-L. Viovy, and S. Descroix, “Evaluation of microchip material and surface treatment options for IEF of allergenic milk proteins on microchips,” *Electrophoresis*, vol. 30, no. 24, pp. 4256–63, 2009.
- [25] W. Sung, S. Huang, and P. Liao, “Poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device with electrospray ionization-mass spectrometry interface for protein identification,” *Electrophoresis*, vol. 24, no. 21, pp. 3648–54., 2003.
- [26] B. H. Huynh, B. A. Fogarty, P. Nandi, and S. M. Lunte, “A microchip electrophoresis device with on-line microdialysis sampling and on-chip sample derivatization by naphthalene 2,3-dicarboxaldehyde/2-mercaptoethanol for amino acid and peptide analysis,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 42, no. 5, pp. 529–34, 2006.

- [27] J.-J. Xu, Y. Peng, N. Bao, X.-H. Xia, and H.-Y. Chen, "Simple method for the separation and detection of native amino acids and the identification of electroactive and non-electroactive analytes," *Journal of chromatography. A*, vol. 1095, no. 1–2, pp. 193–6, 2005.
- [28] B. E. Slentz, N. a Penner, E. Lugowska, and F. Regnier, "Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane)," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 17, pp. 3736–43, 2001.
- [29] J. Gao, J. Xu, L. E. Locascio, and C. S. Lee, "Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification," *Anal Chem*, vol. 73, no. 11, pp. 2648–55, 2001.
- [30] F. Shang, E. Guihen, and J. D. Glennon, "Recent advances in miniaturisation--the role of microchip electrophoresis in clinical analysis," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 1, pp. 105–16, 2012.
- [31] Marc A. Unger, Hou-Pu Chou, Todd Thorsen, Axel Scherer, and Stephen R. Quake. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, pp 288-113, 2000.
- [32] D. Duffy, J. McDonald, and O. Schueller, "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Anal Chem*, vol. 70, no. 23, p. 4974, 1998.
- [33] J. Rossier, M. Roberts, R. Ferrigno, and H. Girault, "Electrochemical Detection in Polymer Microchannels," *Anal Chem*, vol. 71, no. 19, pp. 4294–4299, 1999.
- [34] R. A. Clark and A. G. Ewing, "Characterization of Electrochemical Responses in Picoliter Volumes," *Anal chem*, vol. 70, no. 6, pp. 1119–1125, 1998.
- [35] R. Kashyap, "Electrochemistry in Microscopic Domains . 1 . The Electrochemical Cell and Its Voltammetric and Amperometric Response," *Anal chem*, vol. 70, no. 8, pp. 1468–1476, 1998.
- [36] J.-M. Savéant, *Elements of molecular and biomolecular electrochemistry*. John Wiley & Sons, Inc, 2006, pp. 5–105.
- [37] K. Aoki, K. Tokuda, and J. Matsuda, "Theory of linear sweep voltammetry with finite diffusion space," *J.Electroanal Chem*, vol. 146, pp. 417–424, 1983.
- [38] C. Amatore, C;Pebay, L. Thouin, A. Wang, "Cyclic voltammétry at microelectrodes. Influence of natural convection on diffusion layers as characterized by in situ mapping of concentration profiles," *Electrochemistry Communications*, vol. 11, pp. 1269–1272, 2009.
- [39] A.J. Bard, L.R.Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, second edition, p176, 2001
- [40] V. Levich, *Physicochemical Hydrodynamics*. 1962, pp. 112–116.

- [51] C. Amatore, K. Knobloch, and L. Thouin, “First direct experimental evidence of migration contributions through monitoring of concentration profiles at low supporting electrolyte concentration,” *Electrochemistry Communications*, vol. 6, pp. 887–891, 2004.
- [42] J. Rossier, C. Vollet, A. Carnal, G. Lagger, V. Gobry, H. H. Girault, P. Michel, and F. Reymond, “Plasma etched polymer microelectrochemical systems,” *Lab on chip*, vol. 2, pp. 145–150, 2002.
- [43] J. Howell and R. M. Wightman, “Ultrafast Voltammetry and Voltammetry in Highly Resistive Solutions with Microvoltammetric Electrodes,” *Anal Chem*, vol. 56, no. 3, pp. 524–529, 1984.
- [44] O. Ordeig, N. Godino, J. del Campo, F. Nikolajeff, and L. Nyholm, “On-Chip Electric Field Driven Electrochemical Detection Using a Poly(dimethylsiloxane) Microchannel with Gold Microband Electrodes,” *AnalChem*, vol. 80, pp. 3622–3632, 2008.
- [45] A. Lavacchi, U. Bardi, C. Borri, S. Caporali, A. Fossati, and I. Perissi, “Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL Multiphysics,” *J.Appl Electrochem*, vol. 39, no. 2159, p. 2163, 2009.
- [46] M. Faure, S. Korchane, I. Le Potier, A. Pallandre, C. Deslouis, A. Haghiri-gosnet, and J. Gamby, “Investigating of labelling and detection of transthyretin synthetic peptide derivatized with naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde,” *Talanta*, vol. 116, pp. 8–13, 2013.
- [47] J. Wang, G. Chen, and M. Pumera, “Microchip Separation and Electrochemical Detection of Amino Acids and Peptides Following Precolumn Derivatization with naphthalène-2,3-dicarboxyaldehyde,” *Electroanalysis*, vol. 15, no. 10, pp. 862–865, 2003.
- [48] S. C. Jacobson, R. Hergenruder, A. W. Moore, and J. M. Ramsey, “Precolumn Reactions with Electrophoretic Analysis Integrated on a Microchip,” *Anal chem*, vol. 1, no. 23, pp. 4127–4132, 2008.
- [49] S. C. Jacobson, L. B. Koutny, R. Hergenroder, A. W. Moore, and J. M. Ramsey, “Microchip Capillary Electrophoresis with an Integrated Postcolumn Reactor,” *Anal chem*, vol. 66, no. 20, pp. 3472–3476, 2008.





# Conclusion générale et perspectives

Ce travail a porté sur la synthèse et la caractérisation de dépôts de carbone azoté amorphe (a-CN<sub>x</sub>) sur supports de verre transparent et conducteur en vue de leurs utilisations soit comme interfaces polarisables pour les puces de séparation en électrophorèse ou comme microélectrode pour la détection électrochimique en puce. En effet, la possibilité d'agir sur les propriétés des films minces de a-CN<sub>x</sub> en jouant sur le pourcentage d'azote dans le plasma offre une large palette de conductivités qui permet ces deux applications différentes et complémentaires dans une stratégie plus large pour les « laboratoires sur puce ». Les caractérisations des supports verre/ITO/a-CN<sub>x</sub> à l'air et en solution ont permis de dégager des conditions optimisées en fonction des deux applications visées.

Dans le chapitre trois, les films minces de a-CN<sub>x</sub> ont été synthétisés et caractérisés. En effet, différents protocoles de dépôts par pulvérisation cathodique magnétron en courant continu sur verre/ITO avec différents pourcentages d'azote dans le plasma (3, 7, 15 et 30%) ont été entrepris. Tous ces protocoles ont été réalisés pour une puissance de dépôts de 200W et un temps de 20 minutes. Un léger décapage ionique est préalablement effectué sur la surface pour avoir une meilleure adhérence. Dans un premier temps, la caractérisation en spectroscopie XPS a permis de déterminer les stoechiométries suivantes a-CN<sub>0,12</sub>, a-CN<sub>0,18</sub>, a-CN<sub>0,26</sub>, a-CN<sub>0,30</sub>. De plus, la caractérisation en microscopie AFM (CS-AFM) a montré que la conductivité électrique locale dépend du pourcentage d'azote dans le film. En effet, suite à l'utilisation d'un protocole de mesures de conductivités relatives par CS-AFM, nous avons obtenus des valeurs inversement proportionnelles à l'augmentation de la stoechiométrie en azote. Ces sont comprises entre  $2.10^5 \text{ S.cm}^{-1}$  à  $15 \text{ S.cm}^{-1}$  pour le CN<sub>x</sub> déposés sur verre/ ITO et comprises entre  $2300 \text{ S.cm}^{-1}$  à  $2,2.10^4 \text{ S.cm}^{-1}$  pour le CN<sub>x</sub> déposés sur verre. En utilisant la méthode de mesures entre 4 pointes, les valeurs sont comprises entre  $944 \text{ S.cm}^{-1}$  à  $1557 \text{ S.cm}^{-1}$  pour le CN<sub>x</sub> déposés sur verre/ ITO et sont comprises entre  $0,3 \text{ S.cm}^{-1}$  à  $5,9 \text{ S.cm}^{-1}$  pour le CN<sub>x</sub> déposés sur verre. Ces résultats sur verre et verre/ITO ont souligné l'importance la nature du substrat avant le dépôt du a-CN<sub>x</sub>, notamment l'influence de la conductivité du matériau sous-jacent qui peut être avantageuse ou pas en fonction de l'application visée. La caractérisation en électrochimie suivant la stoechiométrie en azote a été faite essentiellement par voltammétrie et par spectroscopie d'impédance en milieu KCl. Il est apparu que les contraintes mécaniques pour certaines stoechiométries, a-CN<sub>0,12</sub>, a-CN<sub>0,18</sub>, ne

permettent pas leurs analyses en solution. Nous avons pu caractériser en solution que deux stoechiométries a-CN<sub>0,26</sub> et a-CN<sub>0,30</sub>. La fenêtre de polarisation pour les électrodes avec ces deux stoechiométries est supérieure à 2,5 V. Les caractérisations électrochimiques ont mis en évidence une surface non homogène des dépôts modélisée à par une capacité non idéale (CPE) dans le circuit électrique équivalent représentant l'interface ITO/a-CN<sub>x</sub>/électrolyte KCl. En effet, les valeurs de  $\alpha$  trouvées sont comprises entre 0,84 et 0,9 pour les films a-CN<sub>0,26</sub> et entre 0,79 et 0,89 pour les films a-CN<sub>0,30</sub>. L'utilisation de la formule de Brug a permis de calculer les valeurs des capacités de double couche des électrodes de a-CN<sub>x</sub> dans des solutions de KCl. Ces valeurs de capacités de double couche sont comprises entre 9 et 10  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  pour les électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> et entre 5 et 7,5  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  pour les électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,30</sub>. D'autre part, les valeurs moyennes de capacité de double couche pour les électrodes P30 sont toutes inférieures à celles déterminées pour les électrodes P15, résultats qui peuvent être corrélés aux conductivités électriques locales qui elles aussi sont inférieures (15  $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour les électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,30</sub> et 1250  $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour les électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub>). De plus, la capacité de double couche mesurée varie bien en fonction du potentiel appliqué en spectroscopie d'impédance. Cette variation est non linéaire et les valeurs moyennes augmentent avec la concentration en KCl, résultat qui est en accord avec le modèle de la double couche. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mieux maîtriser la réactivité des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>x</sub> par un pré-traitement électrochimique. Pour ce, nous avons mis au point un protocole d'activation dans KCl beaucoup moins agressif que le protocole utilisant H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour a-CN<sub>x</sub> sur silicium qui avait pour effet de fragiliser les électrodes a-CN<sub>x</sub> sur verre. Le prétraitement dans KCl a permis d'augmenter d'un facteur 5 la valeur de la constante de vitesse standard de transfert de charge dans le cas des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,30</sub>, et d'un facteur 3 dans le cas des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub>. Les valeurs des constantes de vitesse standard de réaction après prétraitement pour les électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> et verre/ITO/a-CN<sub>0,30</sub> sont respectivement de  $16,8 \times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  et de  $2 \times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . La réactivité des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,30</sub> reste largement inférieure à celle des électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub>. Ce chapitre a mis en évidence la possibilité d'utiliser les électrodes verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> suivant le protocole P15 comme matériau d'électrode (conductivité plus élevée, large fenêtre de polarisabilité, bonne réactivité électrochimique) tandis que les films verre/ITO/a-CN<sub>0,30</sub> suivant le protocole P30 comme interface idéalement polarisable pour le contrôle du flux électroosmotique (conductivité plus faible, large fenêtre de polarisabilité, réactivité électrochimique dégradée).

Dans le quatrième chapitre, l'optimisation des conditions de dérivation du peptide synthétique de la TTR a été menée. Dans un premier temps, la caractérisation du marqueur Naphtalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) dans un mélange binaire eau/méthanol a été nécessaire avant d'aborder l'optimisation du protocole de marquage du peptide de la TTR ou d'acides aminés contenus dans la séquence de la TTR. En effet, la voltammétrie cyclique (VC) et la voltammétrie différentielle pulsée (DPV) nous ont permis de collecter de nombreux résultats qui viennent compléter certaines observations déjà décrites dans la littérature. Les études en milieu aqueux en fonction de la vitesse de balayage, du pH, de la concentration en NDA et les études en milieu organique ont confirmé le rôle majeur de l'hydratation des fonctions aldéhydiques du marqueur. En effet, celui-ci est présent sous trois formes en solutions : le dialdéhyde non hydraté (DA), le monohydraté acyclique (MA) et le hémiacétale cyclique (HAC). La réduction des deux premières formes du NDA suit un mécanisme à deux électrons et deux protons. Une des parties importantes de ce chapitre a été de trouver une stratégie pour déterminer les concentrations en chaque forme. Dans un premier temps, les intensités des pics du NDA ont été comparées à ceux de la benzoquinone (BQ), cependant l'instabilité de cette dernière dans le tampon utilisé, ne nous a pas permis de conclure sur la proportion de chaque forme en solution. Le calcul des concentrations en chaque forme a donc été effectué après détermination des coefficients de diffusion des espèces (relation de Wilke-Chang, de Lysis-Ratcliff, de Reddy-Doraiswamy et de Scheibel) et en utilisant l'équation reliant l'intensité du pic à la vitesse de balayage dans le cas d'un mécanisme électrochimique suivie d'une réaction chimique (EC). Les valeurs moyennes estimées pour les coefficients de diffusion des formes DA et MA sont respectivement de  $4,17 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s et de  $4,00 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s. Les valeurs des concentrations déduites pour les formes DA, MA et HAC sont respectivement de 0,57 ; 0,28 et 0,17 pour une concentration en NDA totale de 1mM. D'autre part, les études en fonction du pH permettent de conclure qu'à pH = 9, la forme HAC subit une déshydratation catalytique par les ions OH<sup>-</sup> pour régénérer la forme DA. A ce pH, les formes DA et MA sont majoritaires, espèces susceptibles de réagir avec les groupements NH<sub>2</sub> lors du marquage. Ces résultats viennent confirmer les études empiriques menées notamment au LPNSS pour optimiser le pH de marquage des biomolécules avec le NDA.

Dans un deuxième temps, la dérivation a été optimisée sur le carbone vitreux. Les conditions optimales de dérivation obtenues sont un rapport NDA/CN= 1 et NDA/ (AA ou PN) = 100 dans un tampon pH 9 de 100 mM borate/MeOH (50/50 v/v) pour un temps optimal de 15 minutes. La comparaison des voltammogrammes du peptide synthétique de la TTR (CBI-PN) avec ceux des acides aminés (CBI-AA) a mis en évidence le double marquage du peptide

( $E_{\text{pic}}(\text{CBI, PN simplement marqué}) = 0,69 \text{ V/ECS}$  et  $E_{\text{pic}}(\text{CBI, PN doublement marqué}) = 0,55 \text{ V/ECS}$ . La spectrométrie de masse a permis de confirmer la présence de peptide simplement et doublement marqués. En effet, un pic situé à  $m/z = 2806 \text{ g.mol}^{-1}$  correspondant au doublement marqué protonné et autre pic situé à  $m/z = 2630 \text{ g.mol}^{-1}$  correspondant au peptide simplement marqué ayant perdu le groupement HCN. Cette double dérivation constitue un inconvénient pour les méthodes de détection optique à cause du photo-blanchiment. En effet, le signal du CBI-PN décroît rapidement obligeant la mise en œuvre d'une détection très rapide après l'étape de dérivation d'une dizaine de minutes. Cependant, le CBI-PN est encore détectable en électrochimie 24 heures après l'étape de dérivation. Après 24h, l'intensité de pic diminue de 60% mais l'aire de pic ne diminue que de 20 % permettant encore une détection correcte du CBI-PN. D'autre part, nous avons déterminé un mécanisme d'oxydation du CBI-PN suivant un transfert à 4 électrons et sans transfert de protons. Ce résultat est cohérent avec nos conclusions précédentes sur le double marquage et aussi avec les hypothèses formulées dans la littérature pour un acide aminé simplement marqué avec OPA. Enfin, la limite de détection du CBI-PN en macrosystème est de  $0,25 \mu\text{M}$ .

Le protocole de dérivation décrit précédemment est analysé en DPV sur les électrodes sans activation et avec activation pour le verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> puis comparé avec le carbone vitreux. Les réponses électrochimiques des CBI-AA et CBI-PN sur les trois électrodes sont comparées. Les pics sur verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> non activée possèdent une largeur à mi-hauteur très importante et une amplitude de pic relativement faible par rapport aux deux autres types d'électrodes. De plus, les incertitudes sur les potentiels de pics avec ces électrodes ne permettent pas de discriminer les biomolécules dérivées entre elles. Les pics ont des largeurs à mi-hauteur moins importantes, des hauteurs de pics et des aires plus importantes sur verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> activée par rapport au carbone vitreux pour le PN et 3 AA sur 4 (lysine, histidine et thréonine). Dans le cas de la sérine, la largeur à mi-hauteur et l'aire sont légèrement supérieures sur carbone vitreux tandis que l'intensité du pic est identique. De plus, les potentiels de pics varient de la même façon sur carbone vitreux et sur verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> activée. En effet, les potentiels de pic d'oxydation pour les CBI-AA et le CBI-PN sont dans l'ordre  $E_{\text{p}}(\text{CBI-lysine}) = 0,54 \text{ V/ECS} < E_{\text{p}}(\text{CBI-PN}) = 0,55 \text{ V/ECS} < E_{\text{p}}(\text{CBI-histidine}) = 0,57 \text{ V/ECS} < E_{\text{p}}(\text{CBI-thréonine}) = 0,58 \text{ V/ECS} < E_{\text{p}}(\text{CBI-sérine}) = 0,59 \text{ V/ECS}$ . De plus, les analyses par spectroscopie d'impédance électrochimique sur verre/ITO/a-CN<sub>0,26</sub> ont permis de montrer une dépendance de la résistance du transfert de charge en fonction de la biomolécule dérivée. En effet, les valeurs de  $R_t$  pour les CBI-AA et le CBI-PN sont dans l'ordre  $R_{t(\text{CBI-lysine})} = 1,3 \times 10^4$

$$\Omega.\text{cm}^2 < R_t (\text{CBI-PN}) = 2,1 \times 10^4 \Omega.\text{cm}^2 < R_t (\text{CBI-histidine}) = 2,7 \times 10^4 \Omega.\text{cm}^2 < R_t (\text{CBI-thréonine}) = 3,9 \times 10^4 \Omega.\text{cm}^2 < R_t (\text{CBI-sérine}) = 4,9 \times 10^4 \Omega.\text{cm}^2$$

Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre, le pic du CBI-PN est détecté dans un système à deux électrodes Pt-Pt ou C-Pt. Dans un premier temps, cette étude est réalisée en présence d'un traceur redox ferricyanure/ferrocyanure pour fixer le potentiel. Dans le cas du système 2 électrodes carbone-platine, le pic du CBI et les pics du NDA sont clairement observés. Dans le cas du système platine-platine, la fenêtre de polarisabilité ne permet pas d'observer les pics du NDA, mais seulement celui du CBI. Cependant, bien que dans les deux cas, le pic du CBI soit présent, le traceur redox choisi n'est pas une pseudoréférence très stable, nous avons donc choisi dans un deuxième temps de travailler sans traceur. Sans traceur le pic du CBI est également visible, mais le signal est relativement bruité.

Le cinquième chapitre a porté sur la microfabrication d'une géométrie de puce microfluidique verre/PDMS pour le marquage et la détection du peptide de la TTR. En effet, une configuration à 2 microélectrodes a été préférée dans le but de simplifier les étapes de microfabrication. Le ratio de surface entre la contre électrode et l'électrode de travail est de 24 de façon à situer en condition de pseudoréférence.

Dans un premier temps, l'optimisation des conditions d'analyses que sont la vitesse de balayage et le débit volumique a été poursuivie sans et avec écoulement. Le couple redox ferricyanure/ferrocyanure de potassium en quantité équimolaire a été choisi en vue de cette optimisation. Les résultats présentés dans le manuscrit sont ceux réalisés en voltammétrie cyclique et voltammétrie différentielle pulsée avec des microélectrodes de platine. Comme escompté, les voltammogrammes d'oxydation/réduction du couple Fe(III)/Fe(II) en absence d'écoulement sont centrés au potentiel d'équilibre à 0 V/Pt, et présentent surtout une forme sigmoïdale typique de la réponse stationnaire d'une électrode de dimension micrométrique. La vitesse de balayage optimisée sans écoulement a été optimisée à 10 mV/s.

En mode hydrodynamique, les débits volumiques appliqués sont compris entre  $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^3/\text{s}$  et  $2 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{s}$  avec une vitesse de balayage n'excédant pas 1 mV/s. Pour débit volumique fixé à  $5 \times 10^{-5} \text{ cm}^3/\text{s}$ , une variation de la vitesse de balayage comprise entre 1 mV/s et 100 mV/s montre une transition dans le régime de diffusion. En effet, pour des vitesses de balayage inférieures à 25 mV/s, la réponse de la microélectrode est stationnaire, tandis que pour des vitesses de balayage supérieures à 25 mV/s, la réponse correspond à une diffusion plane qui se traduit par l'apparition de pics sur les voltammogrammes bien définis à mesure que la vitesse de balayage augmente. Enfin, l'intensité limite du courant mesuré varie bien en fonction du

débit volumique reporté à la puissance  $1/3$ , pour une vitesse de balayage fixée à  $1\text{mV/s}$ . Ces conditions optimisées correspondent bien à la réponse type microbande de l'électrode dans un microcanal pour un écoulement laminaire. Cependant, les intensités limites obtenues sont inférieures aux intensités calculées et normalisées par les intensités théoriques déduites de la formule de Levich, ceci pourrait être dû à la géométrie de la puce.

Dans un second temps, la dérivation du peptide de la TTR est effectuée dans la puce microfluidique sans écoulement puis en mode hydrodynamique. Les analyses sont faites en VC à  $1\text{ mV/s}$  et en DPV à  $25\text{ mV/s}$ . La dérivation avec une concentration équimolaire en traceur Fe(III)/Fe(II) permet d'avoir une séparation de pic de l'ordre de  $40\text{ mV}$  entre le pic d'oxydation du traceur et le pic du CBI-PN. Avec une concentration non équimolaire pour le traceur redox, une légère amélioration de la séparation des pics est observée, écart passant à  $44\text{ mV}$ . Concernant la limite de détection, on gagne un facteur  $10^2$  en passant d'une détection en macrosystème ( $0,25\text{ }\mu\text{M}$ ) à une détection en microsystème ( $25\text{ nM}$ ). De plus, la méthode de dérivation est sélective et spécifique. La détection à une bonne reproductibilité ( $5\%$ ). Cependant deux domaines de linéarité sont obtenus : un premier domaine allant de  $25\text{ nM}$  à  $0,1\text{ }\mu\text{M}$  avec une sensibilité de  $6,0 \times 10^{-11}\text{ A}/\mu\text{M}$ , et un deuxième domaine de linéarité allant de  $0,1\text{ }\mu\text{M}$  et  $1\text{ }\mu\text{M}$  avec une sensibilité de  $1,54 \times 10^{-10}\text{ A}/\mu\text{M}$ . Nous avons conclu que pour des concentrations élevées, seul le CBI-PN doublement dérivé est largement majoritaire, tandis que pour des concentrations plus faibles, les pics du CBI-PN doublement ( $0.4\text{ V/Pt}$ ) et simplement dérivé ( $0.55\text{ V/Pt}$ ) se confondent, entraînant ainsi une surestimation de l'intensité du pic.

En conclusion, nous avons fait la preuve que les électrodes verre/ITO/ a-CNx peuvent servir d'électrode de détection. L'utilisation des électrodes en a-CNx permet d'avoir des pics mieux résolus pour le CBI-PN. Le transfert de la méthodologie en puce microfluidique montre que la détection du peptide de la TTR peut être effectuée dans une puce microfluidique à deux microélectrodes avec une bonne limite de détection acceptable. Les travaux encore en cours devraient permettre d'améliorer encore la sélectivité et spécificité de la détection en passant du platine au platine/a-CNx améliorant ainsi la discrimination entre simplement et doublement marqué en puce. D'autres paramètres sont encore entrain d'être optimisés, tels que d'autres types de prétraitement pour les électrodes verre/ITO/ a-CNx, étant donné que la réactivité et sélectivité des électrodes dépendent sensiblement du type de prétraitement mis en oeuvre. Cette orientation aura certainement une incidence sur la spécificité de la détection des espèces à analyser en puce microfluidique. Dans le cas du choix du traceur redox pour la configuration à deux microélectrodes, là aussi, des traceurs plus

stables et inertes devraient pouvoir améliorer qualitativement et quantitativement les données obtenues. La dernière étape est de pouvoir intégrer les modules de marquage *in situ* en « pré-colonne » et de détection en « post-colonne » dans une puce de séparation électrophorétique optimisée pour la séparation des formes native et mutée de la TTR pour l'analyse en temps réel d'échantillons de patients atteints de la polyneuropathie amyloïde familiale. Cette méthodologie mettant à profit les propriétés de a-CN<sub>x</sub> pourrait aussi être envisagée pour caractériser et discriminer les isoformes des protéines tau impliquées pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer en collaboration avec le LPNSS et le LPN. De plus, le principe général d'utilisation de microélectrodes sur verre transparent, conducteur et polarisable en puce microfluidique permettraient d'obtenir des microdispositifs robustes combinant la détection optique et électrochimique, voire pour l'électrochimiluminescence.



# Liste des Abréviations

a-CN <sub>x</sub>	carbone azoté amorphe
AFM	Microscopie à force atomique
AQC	6-aminoquinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl carbamate
BQ	Benzoquinone
CBI	Cyanobenzoisindole
CV	voltammétrie cyclique
CS-AFM	current sending atomic force microscopy
DA	Dialdéhyde
DIMIPOLE	Dispositifs microfluidiques à interfaces polarisables pour des séparations électrophorétiques de haute résolution.
DPV	voltammétrie impulsionnelle différentiel
FAP	Polyneuropathie amyloïde familiale
FQ	3-(2-furyol) quinoline-2-carboxaldéhyde
HAC	Hemiacétal cyclique
ITO	Oxyde d'étain dopé à l'indium
MA	Monohydraté acyclique
NDA	naphatalène-2,3-dicarboxaldéhyde
OPA	Othophathaladéhyde
PDMS	polydiméthylsiloxane
PN	Peptide natif
PWF	Pont Wheastone Fluidique
RIE	Reactive ion etching
SIE	spectroscopie d'impédance électrochimique
TTR	Transthyrétine
XPS	Spéctroscopie par rayon X

# Liste des symboles

$\alpha_a, \alpha_c$	Coefficient de transfert anodique et cathodique
$A_c$	Aire de contact AFM (m <sup>2</sup> )
$\beta_a, \beta_c$	Coefficient de Taffel
$\alpha$	Paramètre du CPE
$C$	Concentration de l'espèce consommée (mol/L)
$C_{EDL}$	Capacité de la couche de diffusion électrique (F)
$C_s$	Capacité de la couche de Stern (F)
$C_d$	Capacité de double couche (F)
$C_{GC}$	Capacité de Gouy Chapman (F)
$C_H$	Capacité de Helmutz (F)
$D$	Coefficient de diffusion (m <sup>2</sup> /s)
$d$	Longueur du canal (m)
$\Delta\Phi$	Différence de potentiel au borne de la double couche
$E$	Potentiel (V)
$E^0$	Potentiel standard du couple (V)
$E_{p/2}$	Potentiel de pic à mi-hauteur (V)
$E_{tip}$	Module d'élasticité des matériaux de la pointe AFM (Pa)
$E_{film}$	Module d'élasticité du film (Pa)
$E_{eq}$	Potentiel d'équilibre (V)
$E_l$	Energie de liaison (J)
$E_c$	Energie cinétique électronique (J)
$E^*$	Module d'élasticité réduit (Pa)
$\epsilon_0$	Constante de permittivité (8,85.10 <sup>-12</sup> F/m)
$\epsilon_{H_2O}$	Constante diélectrique de l'eau
$f$	Fréquence (Hz)
$F$	Constante de Faraday (96500 C)
$F_c$	Force mesurant la raideur de contact AFM (N)
$F_v$	Ecoulement (μL/s)
$\gamma$	Surtension de l'interface polarisable (V)

## Liste des symboles

$\gamma_0$	Potentiel limite de polarisabilité (V)
$h$	hauteur du canal (m)
$h$	constante de Planck (J.s) (équation II-31)
$I_p$	Intensité du pic (A)
$i_L$	Courant limite (A)
$i_{qs}$	intensité du courant quasi-stationnaire (A)
$J$	Densité de courant (A/cm <sup>2</sup> )
$K$	Conductivité des solutions (S.cm)
$k_0$	Constante de vitesse de transfert de charge hétérogène (m/s)
$K_a$	Constante d'acidité
$K_x$	Constante de la réaction x
$\chi^2$	Facteur de corrélation
$L$	Longueur typique de l'écoulement (m/s)
$L_\gamma$	Longueur de contrôle (m)
$L_{1/2}$	Largeur a mi-hauteur (V)
$L_H$	Epaisseur de la couche de Helmotz (m)
$L_{GC}$	Epaisseur de la couche d Gouy-Chapman (m)
$\lambda$	Libre parcours moyen (m)
$M$	Masse molaire (g/mol)
$n$	Nombre d'électrons échangés
$\eta$	Viscosité (Pa.s <sup>-1</sup> )
$\eta$	Surteintion (V) (équation III-28)
$\Phi$	Déphasage
$P$	Pression (Pa)
$P_e$	Nombre de Pecklet
$\rho$	Masse volumique (g/L)
$Q$	Paramètre du CPE ( F.s <sup>(<math>\alpha-1/\alpha</math>)</sup> )
$q$	nombre de H <sup>+</sup> échangé dans la réaction électrochimique
$R$	Constante des gaz parfaits (J/K/mol)
$r_0$	rayon de l'électrode de platine (m)
$R_t$	Résistance de transfert de charge ( $\Omega$ .cm <sup>2</sup> )
$R_{t,\eta \rightarrow 0}$	Résistance de transfert de charge à surteintion nulle ( $\Omega$ .cm <sup>2</sup> )
$R_e$	Résistance de l'électrolyte ( $\Omega$ .cm <sup>2</sup> )

$Re$	Nombre de Reynolds (équation V-1)
$R_{HF}$	Résistance haute fréquence ( $\Omega.cm^2$ )
$R_f$	Résistance fluïdique ( $\Omega$ )
$R_I$	Résistance de l'interface polarisable ( $\Omega$ )
$R_c$	Résistance du microcanal ( $\Omega$ )
$R_{tip}$	Rayon de courbure de la pointe AFM (m)
$R_{verre/CN_x}$	Résistance de l'interface verre/CN <sub>x</sub> ( $\Omega.cm^2$ )
$R_{ITO/CN_x}$	Résistance de l'interface ITO/CN <sub>x</sub> ( $\Omega.cm^2$ )
$S$	Surface de l'électrode ( $m^2$ )
$S_{p-e}$	Surface pointe AFM -échantillon ( $m^2$ )
$\sigma_C$	Conductivité du microcanal (S/m)
$\sigma_I$	Conductivité de l'interface polarisable (S/m)
$\sigma$	Erreur sur les mesures
$t$	Temps (s)
$v(x)$	Vitesse du flux selon l'axe x (m/s)
$u_{av}$	Vitesse moyenne du flux (m/s)
$V_m$	Volume molaire au point d'ébullition ( $cm^3/g/mol$ )
$V_l$	Vitesse moyenne du liquide en mouvement (m/s)
$V$	Volume de la cellule ( $m^3$ )
$v$	Vitesse de balayage (V/s)
$\nu$	Fréquence de radiation ( $s^{-1}$ ) (Equation II-31)
$\nu_{tip}$	Coefficient de poisson des matériaux de la pointe AFM
$\nu_{film}$	Coefficient de poisson du film
$\omega$	Pulsation (1/Hz)
$w$	Longueur de la microélectrode de travail (m)
$W$	Impédance de Warburg
$X$	Paramètre d'association
$x$	Fraction molaire
$x_e$	Largeur de la microélectrode de travail (m)
$X_e$	Largeur de la microélectrode de travail adimensionné
$z$	Charge des ions
$Z$	Impédance électrochimique
$Z_f$	Impédance faradique

## Liste des symboles

$Z_g$	Impédance globale
$\zeta$	Potentiel zeta (V)



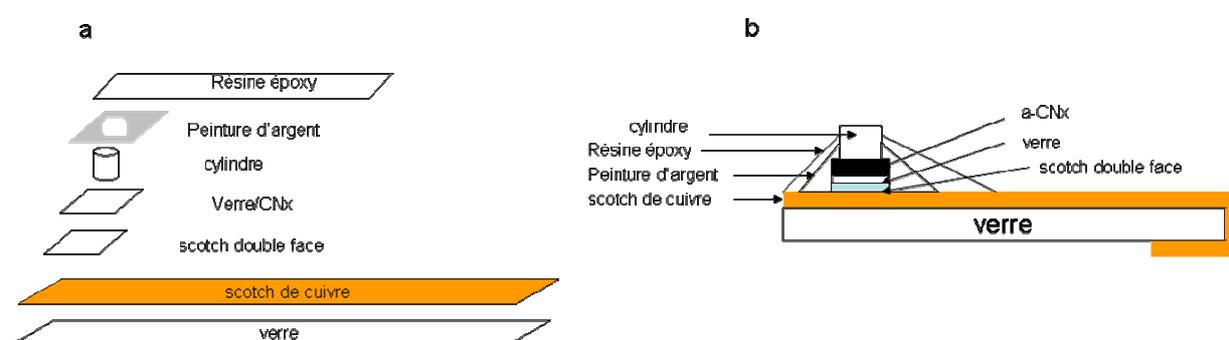
# Annexe I

<b>Fabrication des électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur verre.....</b>	<b>287</b>
<b>Mesure de l'épaisseur des films de a-CN<sub>x</sub> sur verre par SEM-FEG.....</b>	<b>287</b>
<b>Mesure 4 pointes sur les électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur verre et sur verre/ITO.....</b>	<b>288</b>
Mesure sur verre.....	288
Mesure sur les films déposés sur verre/ITO.....	288
<b>Etude dans KCl.....</b>	<b>289</b>
Electrode P15.....	289
Electrode P30.....	290



### ***Fabrication des électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur verre.***

Pour les électrodes de a-CN<sub>x</sub> sur du verre, la première étape consiste à coller un scotch de cuivre sur une lamelle de verre. Notre dépôts de a-CN<sub>x</sub> sur verre est alors fixé sur le cuivre à l'aide d'un scotch double face. Un disque de rayon 3 mm est fixé sur les dépôts pour avoir une surface d'électrode bien définie. Le substrat des dépôts de a-CN<sub>x</sub> étant isolant, le contact électrique entre le cuivre et le CN<sub>x</sub> est assuré par une couche de peinture d'argent. Les bords et la peinture d'argent sont isolés en déposant de la résine époxy (Figure Annexe-8).



**Figure Annexe-8 : Design des électrodes verre/CNx pour les tests électrochimiques.**

### ***Mesure de l'épaisseur des films de a-CN<sub>x</sub> sur verre par SEM-FEG.***

Les épaisseurs des films de a-CN<sub>x</sub> déposés sur verre sont déterminés à l'aide du SEM-FEG et répertoriées dans le Tableau Annexe-1.

	P3	P7	P15	P30
Epaisseur (nm)	210	220	315	1034

**Tableau Annexe-1 : Valeurs des épaisseurs de films de a-CN<sub>x</sub> sur verre.**

### **Mesure 4 pointes sur les électrodes de a-CNx sur verre et sur verre/ITO.**

La conductivité électronique est mesurée grâce à la méthode à 4 pointes sur les dépôts de a - CNx sur verre et sur verre/ITO et sur a - C sur verre/ITO.

Une intensité est appliquée à l'échantillon et un courant est mesuré, une résistance peut alors être déterminée par l'équation III-10. La résistivité peut être calculée à partir de la formule III-11.

#### **Mesure sur verre.**

Les valeurs moyennes des résistivités sont notées dans le Tableau annexe- .

	P3	P7	P15	P30
Resistivité moyenne ( $\Omega.m^{-1}$ )	$1,70.10^{-3}$	$1,75. 10^{-3}$	$4,56. 10^{-3}$	$3,21. 10^{-2}$

**Tableau annexe- 2 : Valeurs moyenne des résistivités pour les dépôts de a-CNx sur verre.**

#### **Mesure sur les films déposés sur verre/ITO.**

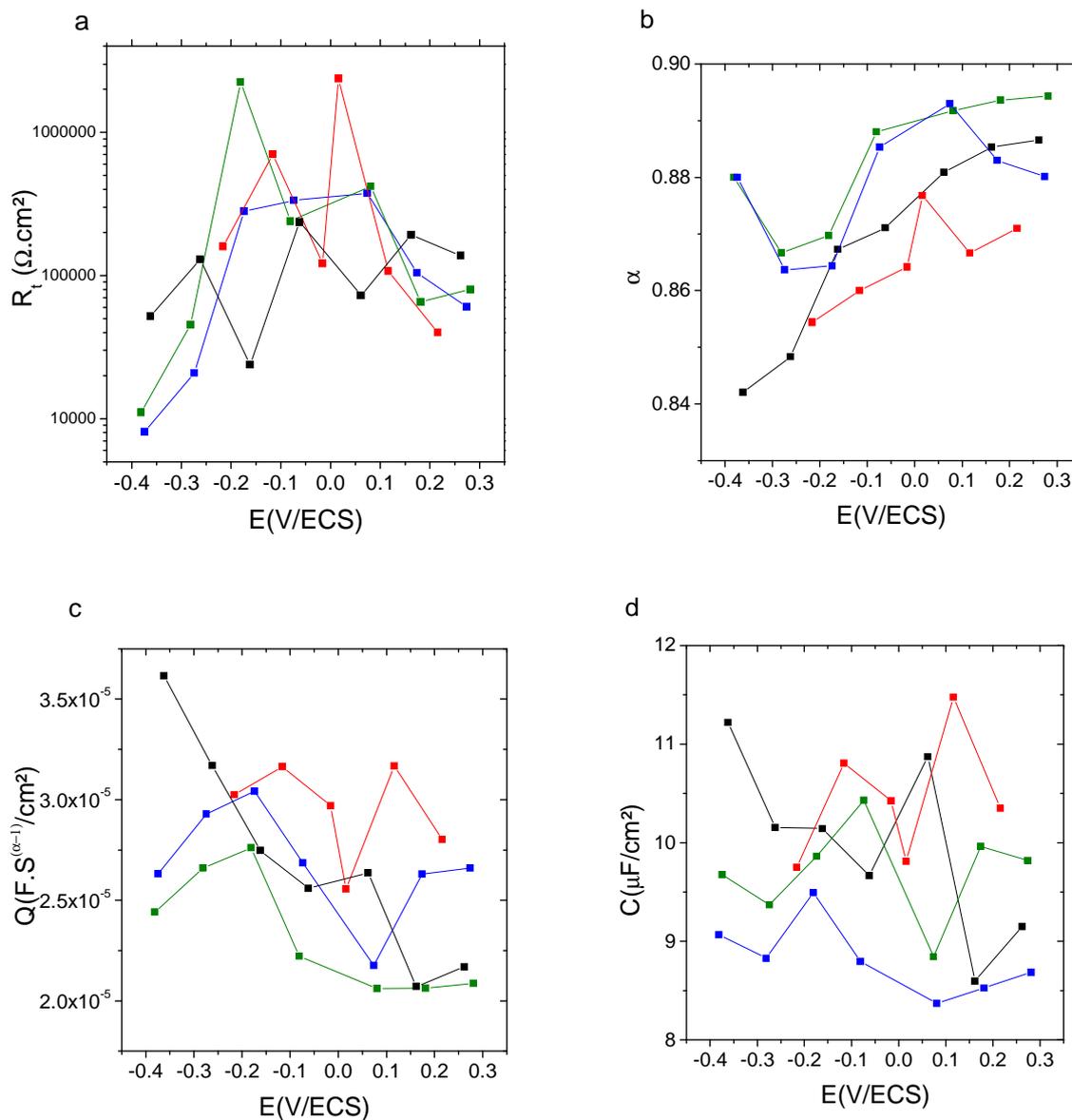
La même chose est réalisée sur les substrats de verre/ITO. Les valeurs de résistivités moyennes sont répertoriées dans le Tableau annexe-.

	a-C	P3	P7	P15	P30
Resistivité moyenne ( $\Omega.m^{-1}$ )	$6,42.10^{-6}$	$6,6610^{-6}$	$7,3.10^{-6}$	$1,06.10^{-5}$	$1,33.10^{-5}$

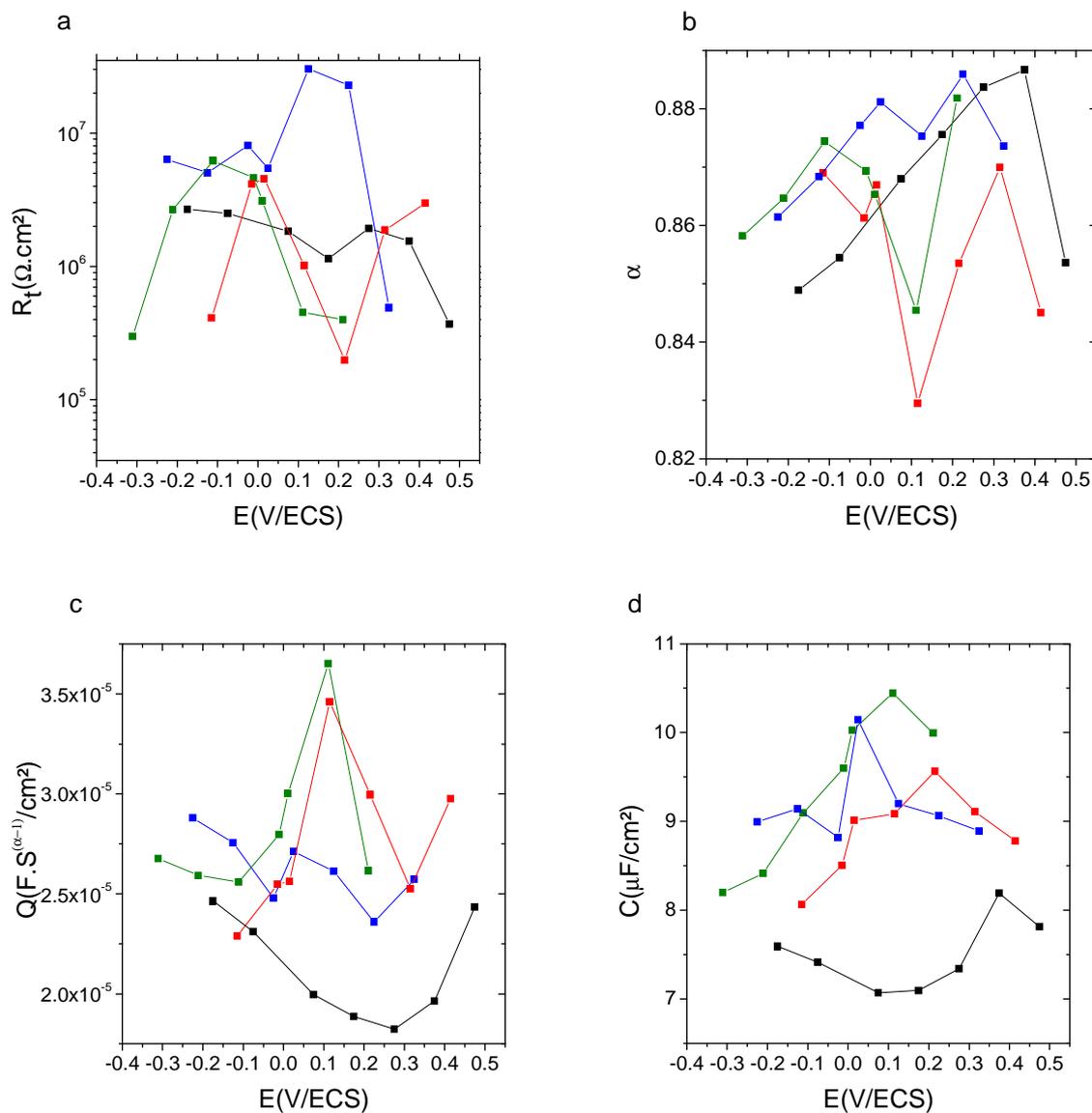
**Tableau annexe-3 : Valeurs moyenne des résistivités pour les dépôts de a-CNx sur verre/ITO.**

**Etude dans KCl.****Electrode P15.**

Les Figures annexe2 et annexe-3 montre les variations de  $\alpha$ ,  $Q$ ,  $R_t$  et  $C_{eq}$  pour deux autres électrodes.



**Figure annexe-2 : Paramètres du circuit selon le potentiel pour une électrode P15 a) variation de la résistance de transfert de charge  $R_t$ . b) variation de  $\alpha$ . c) variation de  $Q$ . d) variation de la capacité de double couche  $C_d$  pour différentes concentrations en KCl 0,1 M(en noir), 0,2 M(en rouge), 0,5 M(en vert), 1,0 M(en bleu)**



**Figure annexe-3 : Paramètres du circuit selon le potentiel pour une électrode P15 a) variation de la résistance de transfert de charge  $R_t$ , b) variation de  $\alpha$ , c) variation de  $Q$ , d) variation de la capacité de double couche  $C$ , pour différentes concentrations en KCl 0,1 M(en noir), 0,2 M(en rouge), 0,5 M(en vert), 1,0 M(en bleu)**

### Electrode P30.

La Figure annexe-9 montre les variations de  $\alpha$ ,  $Q$ ,  $R_t$  et  $C_{eq}$  pour la deuxième électrode.

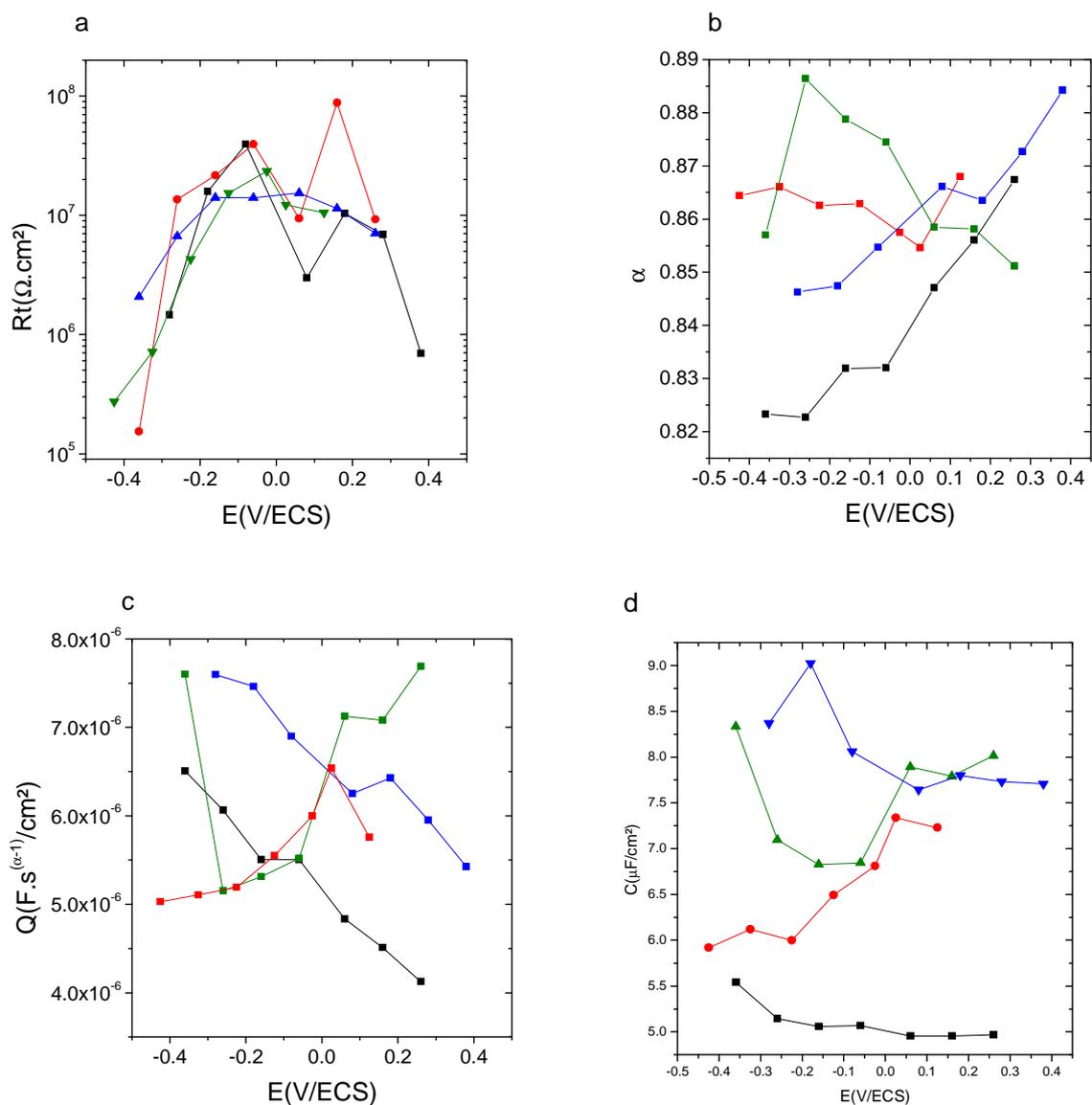


Figure annexe-9 : Paramètres du circuit selon le potentiel pour une électrode P30 a) variation de la résistance de transfert de charge  $R_t$ . b) variation de  $\alpha$ . c) variation de  $Q$ . d) variation de la capacité de double couche  $C$ . pour différentes concentrations en KCl 0,1 M(en noir). 0,2 M(en rouge). 0,5 M(en vert). 1,0 M(en bleu)



# **Annexe II-Publication**







ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Investigating of labelling and detection of transthyretin synthetic peptide derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde



Mathilde Faure<sup>a,b,1</sup>, Sonia Korchane<sup>c,1</sup>, Isabelle Le Potier<sup>c</sup>, Antoine Pallandre<sup>c</sup>,  
Claude Deslouis<sup>a,b</sup>, Anne-Marie Haghiri-Gosnet<sup>d</sup>, Jean Gamby<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, UPR 15, F-75252 Paris, France

<sup>b</sup> UPMC, LISE UPR 15 CNRS; 4 Place Jussieu, case postale 133, F-75252 Paris, France

<sup>c</sup> Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Institut Galien Paris-Sud CNRS UMR 8612, Châtenay-Malabry, France

<sup>d</sup> CNRS, Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, UPR20, Marcoussis 91460, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 January 2013

Received in revised form

18 April 2013

Accepted 24 April 2013

Available online 3 May 2013

#### Keywords:

Transthyretin

Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde

Capillary electrophoresis

Differential pulse voltammetry

### ABSTRACT

Labelling and detection of a synthetic peptide (PN) mimicking a tryptic fragment of interest for the diagnosis of familial amyloid polynuropathy have been investigated optically and electrochemically. We decided to covalently label naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA), a fluorogenic and electroactive molecule on PN. First, the optimization of the labelling chemical reaction was performed by capillary electrophoresis coupled with laser induced fluorescence detection (CE-LIF). The analytical parameters such as separation efficiency and peak area were considered to propose this optimized derivatization reaction. The results obtained allowed us to establish the pH and ionic strength of the derivatization buffer, the molar ratio between NDA and PN and the reaction time of the labelling. Optimal conditions are obtained when  $[NDA]/[PN]=40$ , buffer pH of 9, buffer ionic strength of 70 mM and reaction time of 15 min. Second, differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) were also used to characterize NDA-labelled PN and different electroinactive amino acids (histidine, lysine, serine, threonine) which are in the PN sequence. The electrochemical detection experiments demonstrated that the labelled biomolecules could be also easily detected at low concentration. Moreover, the derivatization reaction could be followed to describe more precisely the labelling process of these biomolecules. Optimal conditions for labelling are obtained when  $[NDA]_{total}/[CN^-]$  ratio = 1 and  $[NDA]_{total}/[amino\ acid\ or\ peptide]=100$  with a buffer having a pH=9 on a glassy carbon electrode. In all cases, an obvious oxidation peak for the N-2-substituted-1-cyanobenz-[ $\beta$ ]-isoindole derivative (CBI) has been observed at 0.5–0.7 V/SCE. The multi-labelling of PN and lysine were shown with DPV. We presumed this result to occur because of the shouldered shape of the DPV peak shape. These experiments confirm that NDA can be used as a derivative agent for PN, allowing for electrochemical and fluorescence detections with a limit of detection of labelled PN estimated at 0.2  $\mu$ M and 5  $\mu$ M, respectively.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

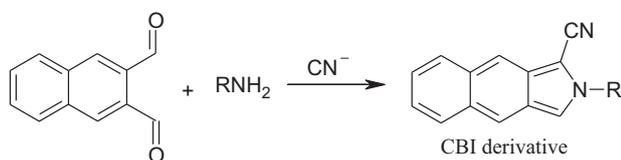
The naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) is a fluorogenic and electroactive reagent commonly used to covalently react with amino functional group of various molecules (see in Scheme 1). This compound is particularly attractive to tag biomolecules such as peptides and proteins and therefore to create novel diagnostic strategies. The N-2-substituted-1-cyanobenz-[ $\beta$ ]-isoindole (CBI) derivative represents also another opportunity to collect

\* Corresponding author at: CNRS Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques UPR 15 UPMC, 4 place Jussieu F-75252 Paris France. Tel.: +33 144273640; fax: +33 144274074.

E-mail address: [jean.gamby@upmc.fr](mailto:jean.gamby@upmc.fr) (J. Gamby).

<sup>1</sup> The both authors have equally contributed to this work.

competitive data with electrochemical [1] or optical detections [2–4]. In recent years, electrochemical detection (ED) has been used with different techniques of separation, such as liquid chromatography in order to analyze amino acids neuron from Helix Aspersa neuron [5] or several aliphatic amines [6]. Capillary electrophoresis has also been coupled with ED for detection of amino acids in brain homogenate [7], in single erythrocyte [8] and in single mouse peritoneal macrophages [9]. Electrochemical properties of CBI have been utilized to identify compounds from Planorbis cornus dopamine neuron. Detection and separation of amino acids and small peptides can also be carried out in microchips [10]. Electrochemical detection presents some advantages for multi-derivatized molecules [11]. Indeed, peptides which bear more than one  $NH_2$  group can be derivatized as often as their number of  $NH_2$  groups. These multi-derivatized amino acids



**Scheme 1.** Derivatization reaction of primary amine by NDA.

PN : N<sub>term</sub>-TSESGELHGLTTEEEFVVEGIYK-C<sub>term</sub>

**Scheme 2.** Sequence of the studied peptide (PN).

present a self-quenching effect and therefore are difficult to detect by fluorescence [12] whereas electrochemical response is not attenuated. This derivative was already used and reported in the literature because of its highly fluorescent and relatively stable properties [12,13]. The use of cyanure as nucleophilic in the reaction instead of other one like 2-mercaptoethanol usually used, permits to obtain the more stable and the best fluorescence intensity for derivative [13].

Here we will focus on the reaction between the NDA and a small peptide of 22 amino acids (PN) likely to be useful for the diagnosis of transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy [14–16] (see in Scheme 2). First, in a systematic approach, we study by capillary electrophoresis coupled with laser induced fluorescence (CE-LIF) the influence of some of major parameters to analytically evaluate their influence over the derivatization reaction efficiency. We believe that the following results demonstrate that we optimized the tagging pathway to analyze small biomarkers bearing amino group. Second, taking into account the tagging reaction efficiency established by CE-LIF, properties of CBI derivatives which are also electrochemically active have been studied by differential pulse voltammetry (DPV). Indeed, selectivity can be achieved by varying the electrode potential in order to compare characteristics of derivatized peptide and non electro-active amino acids which are in peptide sequence.

Lysine and threonine have been selected because they are C-terminal and N-terminal amino acids, respectively. Serine and histidine have been selected because these amino acids are the more acidic and more basic ones, respectively (Table 1).

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

#### 2.1.1. Chemicals

NDA was purchased from Interchim (Montluçon, France). Potassium cyanide, HEPES, boric acid, lysine, serine and threonine were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Methanol and sodium hydroxide from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and the PN peptide was obtained from Genepep (Prades le Lez, France), histidine and tyrosine from Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne).

#### 2.1.2. Peptide labelling

The labelling method was inspired and adapted by previous works on NDA labelling [1,12,13]. Peptide samples were labelled by adding to 50  $\mu$ L of peptide ( $2 \times 10^{-4}$  M in water), 100  $\mu$ L KCN dissolved in a borate buffer, 150  $\mu$ L borate buffer (ionic strength varying from 10 mM to 100 mM and pH varying from 8 to 10) and 100  $\mu$ L NDA in methanol. The mixture was kept at room temperature away from light. The reaction time, pH and ionic strength of the buffer, the concentration of the NDA and of the KCN were optimized.

**Table 1**  
Peak potential characteristics for the derivatized 25  $\mu$ M for each amino acid (AA-CBI) and for 25  $\mu$ M PN-CBI versus saturated calomel electrode.

Amino acid	$E$ (mV)	Sd <sup>a</sup> (mV)	$L_{1/2}$ <sup>b</sup> (mV)
Lysine	540	3	170
Histidine	570	4	240
Threonine	580	5	210
Serine	590	5	140
PN	555 <sup>c</sup> 690 <sup>d</sup>	4 6	190 190

<sup>a</sup> Standard deviation.

<sup>b</sup> Full-widths at mid-height.

<sup>c</sup> TTR simply derivatized.

<sup>d</sup> TTR doubly derivatized.

### 2.2. Instrumentation

#### 2.2.1. Capillary electrophoresis

A Beckman Coulter PA800 Capillary electrophoresis was coupled with a 442 nm laser of 42.1 mW (BFI Optilas France, Evry, France). The capillary electrophoresis instrument was adapted to be compatible with the 442 nm laser. For that, two different filters were used in the commercial Beckman capillary system: a laser filter (441.6 nm) and an emission filter (490 nm) (CVI Melles Griott, Voisins le Bretonneux, France). Those filters were placed in an analogous way to the original filters.

Separations were carried out with fused-silica capillaries (Phymep, Paris, France) of 75  $\mu$ m i.d. having an effective length of 50 cm and a total length of 60.2 cm. Before each electrophoretic run, the capillary was sequentially flushed with 0.1 M sodium hydroxide (3 min), then with MilliQ water (3 min), and then equilibrated with the separation buffer for 3 min. The analyses were performed at +25 kV, with LIF detection (excitation wavelength,  $\lambda_{ex}$  = 442 nm).

#### 2.2.2. Electrochemical measurement

Electrochemical measurements were performed using a Biologic SP-300 electrochemical analysis system with EC-lab software. Experiments were performed with a three-electrode cell configuration. The reference and the counter electrodes were a saturated calomel electrode (SCE) and a platinum grid (Pt), respectively. The working electrode was glassy carbon with an area equal to 0.071 cm<sup>2</sup>. DPV parameters as modulation time (100 ms), modulation amplitude (7.5 mV), and scan rate (25 mV s<sup>-1</sup>) have been optimized to obtain analytical curves. Baselines were recorded after DPV response with a blank solution.

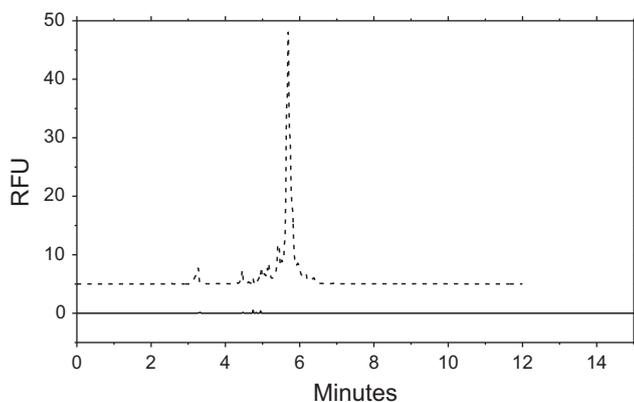
## 3. Results and discussion

### 3.1. Tagging reaction optimization by capillary electrophoresis

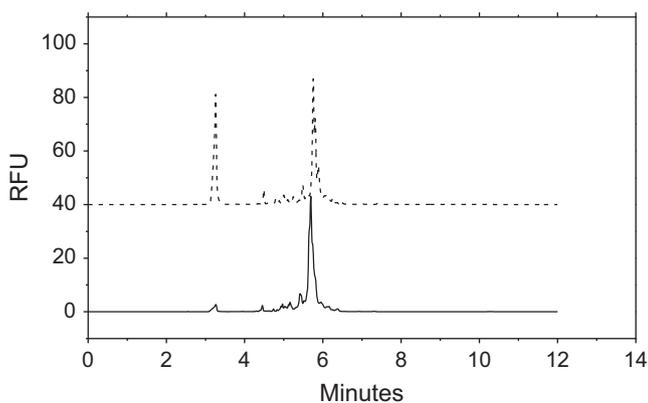
From the literature, it is clear that the chemical and structural aspects of the biomarker are the first parameters to reach high reacting efficiency. Several authors have used NDA\CN<sup>-</sup> mixtures for amino acids (AA) and small peptides labelling [17–20]. Their reports were an inspiring root for our work. However, reaction parameters have been optimized to get the best reaction yield for our peptide (22 AA).

We obviously see in Fig. 1 the fluorogenic character of the NDA. In fact, when there is no reaction with the peptide, there is no peak. However, after the peptide derivatization, we logically detect a peak corresponding to the CBI derivative.

In order to develop an efficient derivatization method, the main parameters were fixed by our readings or studies. First, inspired by



**Fig. 1.** Electropherograms of derivatized PN (top) and blank NDA: sample containing the reaction mixture except the peptide (bottom). Derivatization conditions: peptide concentration 0.2 mmol/L, 50 mM borate buffer pH 10, NDA/PN ratio=40. Electrophoretic conditions: silica capillary (50 cm effective length, 57 cm total length and a 75  $\mu$ m inner diameter), 40 mM HEPES buffer pH 8, 25 kV, 25 °C. LIF detection  $\lambda_{ex}$ =442 nm. For better legibility a shift of -5 RFU has been done with the blank.



**Fig. 2.** Effect of the NDA/PN molar ratio on the derivatized PN electropherogram: NDA/PN ratio = 100 (top), NDA/PN ratio = 40 (bottom). Derivatization and electrophoretic conditions are similar to these given in Fig. 1.

Hu et al. [19], a 1:1 M ratio of KCN and NDA was fixed for all studies, then we evaluated the yield of the reaction by measuring the peak area when NDA/PN molar ratio changes keeping all the other parameters constant. And in order to keep a pseudo-first-order reaction, we worked with a high excess of NDA compared to PN.

Fig. S1 in Supplementary material shows the importance of the first studied parameter: the molar ratio between peptide and NDA. We see a net increase in the CE peak area that is characteristic of the tagged peptide, between a NDA/PN molar ratio of 20 and 40, and the maximum peak area is reached for a ratio equal to 40. This observation shows that the reaction is quantitative for this ratio. When the NDA/PN ratio is higher than 40, the main peak area decreases, and it seems that a side peaks appearance is responsible. Indeed, the fluorogenic reagent may react very slowly in different pathways to form fluorescent side products [20]. Those side products can be seen in Fig. 2 underlining the differences between a 40 and a 100 NDA/PN molar ratio. In fact, the intensity of the 3.5 min peak is much larger in the ratio 100 than in the ratio 40. Moreover, at 5.7 min a peak corresponding to the CBI derivative becomes shouldered when the ratio reaches 100.

Previous studies revealed that the reaction yield increases when the ionic strength of the buffer solution (borate buffer) increases, certainly due to the catalytic effect of this concentration [12]. Thus, we studied the influence of the ionic strength of the

borate buffer (from 10 mM to 100 mM) on the reaction yield by keeping the NDA/PN ratio and the pH equal to 40 and 10, respectively. As expected and displayed in Fig. S2 (see Supplementary material), we obtained an increase of the peak area when the ionic strength increases. However, on the same time, the separation efficiency dramatically decreases. This can be explained by the analysis buffer characteristics. In fact, all the analysis were performed with a 40 mM HEPES buffer pH=8 as background electrolyte (BGE). On the other hand, ionic strength of derivatization solution was increasing that makes its conductivity higher than the BGE's one. This phenomenon leads to a flattening of the peaks. In this context, the best compromise between the reaction yield and the separation efficiency was the buffer ionic strength of 70 mM.

The third optimized parameter is the reaction pH. It represents another critical parameter that controls the reaction yield. De Montigny et al. [13] reported that the optimum pH of the reaction depends on the amine's pKa. In this direction, Lunte et al. [2] found that the optimum pH for derivatization was usually near to the analyte pKa. Taking into account the pKa range of the peptide amine function (from 8.7 to 10.7) and the increase of the fluorescence yield at alkaline pH, we chose to study the reaction on pH varying between 8.5 and 10.

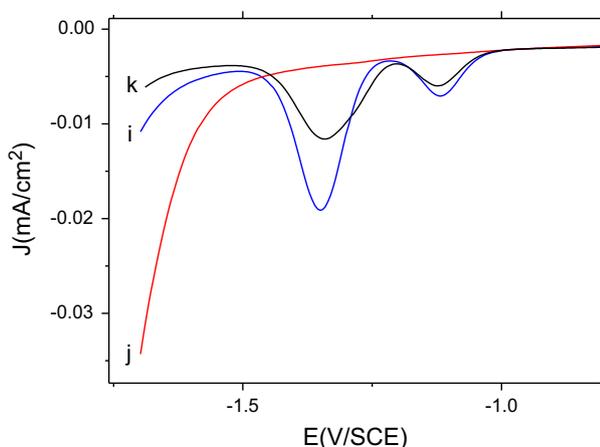
As presented in Fig. S3 (see Supplementary material), an increase of the separation efficiency was observed for pH ranging from 8.5 to 9.5, while a decrease of the peak area was observed in this pH range. When the pH is higher than 9.5, the separation efficiency decreased, whereas the peak area increases. In this context, the best compromise between the reaction yield and the separation efficiency was the borate buffer pH 9.

Experiments were carried out to find the optimum reaction time. From the literature we knew that this parameter is another critical one that is correlated with other parameters such as peptide or amino acid concentration, sample volume, composition of the incubating solution [17–21]. The conformation of the peptide is also a factor to take into account because the steric hindrance increases the reaction time. In our work, the optimum reaction time was 15 min. Moreover, the stability of the peptide labelled with NDA was studied, and we found out that it was stable for at least 5 h in darkness. This latter condition is very important because the photobleaching phenomenon occurs quickly when the sample is light-exposed.

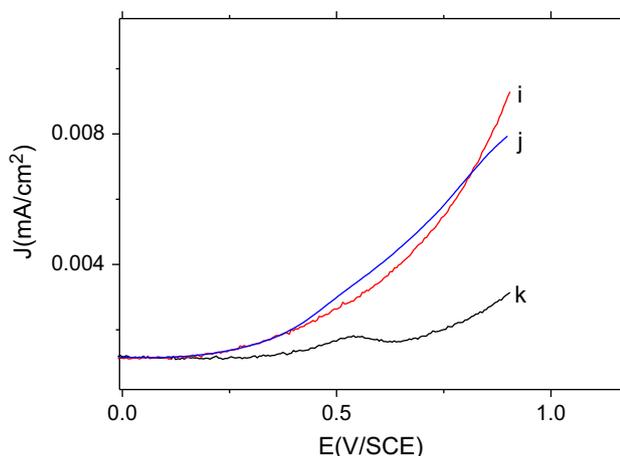
Finally, the sensitivity of detection of the CE-LIF method was studied by calculating the limit of detection (LOD) corresponding to a signal-to-noise ratio of 3. In the optimized conditions defined above (reaction time of 15 min, NDA/PN molar ratio equal to 40, ionic strength buffer of 70 mM and pH buffer equal to 9) the LOD of labelled PN was found to be 5  $\mu$ M.

### 3.2. Electrochemical characterization

The electrolyte support for all experiments is constituted by 100 mM borate buffer in methanol:water mixture (50:50 v/v). PN derivatization was followed by differential pulse voltammetry (DPV) at 25 mV s<sup>-1</sup>. Figs. 3 and 4 display signal differences between 25  $\mu$ M PN alone, 2.5 mM NDA and for online derivatization solution constituted by 25  $\mu$ M PN with 2.5 mM NDA in presence of 2.5 mM KCN in 100 mM electrolyte support at pH=9 (NDA/PN in a molar ratio of 100). No oxidation or reduction peaks was observed for peptide alone. This confirmed that PN peptide was electroinactive in the potential window, in spite of tyrosine presence in PN sequence which was expected as an electroactive amino acid. Moreover, in this oxidative potential window NDA is also electroinactive (see in Fig. 4). Nevertheless, if we consider a reductive potential window, reduction of two aldehydes groups NDA at pH 9 were observed at -1.1 V/SCE and -1.3 V/SCE. In the case of



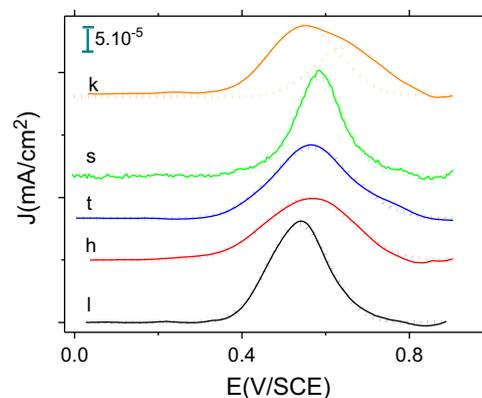
**Fig. 3.** DPV at 25 mV/s on glassy carbon ( $S=0.071 \text{ cm}^2$ ) in 100 mM borate buffer at pH=9. Reductive potential window (i) 2.5 mM NDA in methanol:water (50:50 v/v), (j) 25  $\mu\text{M}$  PN, (k) 25  $\mu\text{M}$  PN derivatization with 2.5 mM NDA NDA/PN molar ratio of 100.



**Fig. 4.** DPV at 25 mV/s on glassy carbon ( $S=0.071 \text{ cm}^2$ ) in 100 mM borate buffer at pH=9. Oxidative potential window (i) 2.5 mM NDA in methanol:water (50:50 v/v), (j) 25  $\mu\text{M}$  PN, (k) 25  $\mu\text{M}$  PN derivatization with 2.5 mM NDA NDA/PN molar ratio of 100.

derivatized PN peptide, an oxidation peak was located at 0.55V/ECS corresponding to CBI oxidation. As noted in Fig. 4, CBI oxidation is irreversible in agreement with the literature [11,22]. Likewise, there was only one peak and no shouldered peak for CBI. It seemed to confirm the inactivity of tyrosine residue in PN. In the literature, peptides with tyrosine residue show two waves of oxidation, one for tyrosine and one for the isoindole ring of CBI [22]. For example, Nussbaun et al. explained that the peak potential of isoindole group was characteristic to the derivatized amino acid or peptide. In order to provide an answer to this hypothesis, derivatization of four amino acids contained in PN sequence were performed for lysine, serine, histidine and threonine at the same concentration for each AA (25  $\mu\text{M}$ ). Peaks potential for CBI-(lysine), CBI-(serine), CBI-(histidine) and CBI-(threonine) were found at 0.54 V/SCE; 0.57 V/SCE, 0.59 V/SCE and 0.58 V/SCE, respectively as shown in Fig. 5. Our results shown that lysine which was doubly derivatized was easier to oxidize than histidine and serine. Moreover, amino acids with basic chains like histidine are more easily oxidized than one with neutral or acid chains like serine. Threonine has a chain more acidic than the histidine one but more basic than the serine chain.

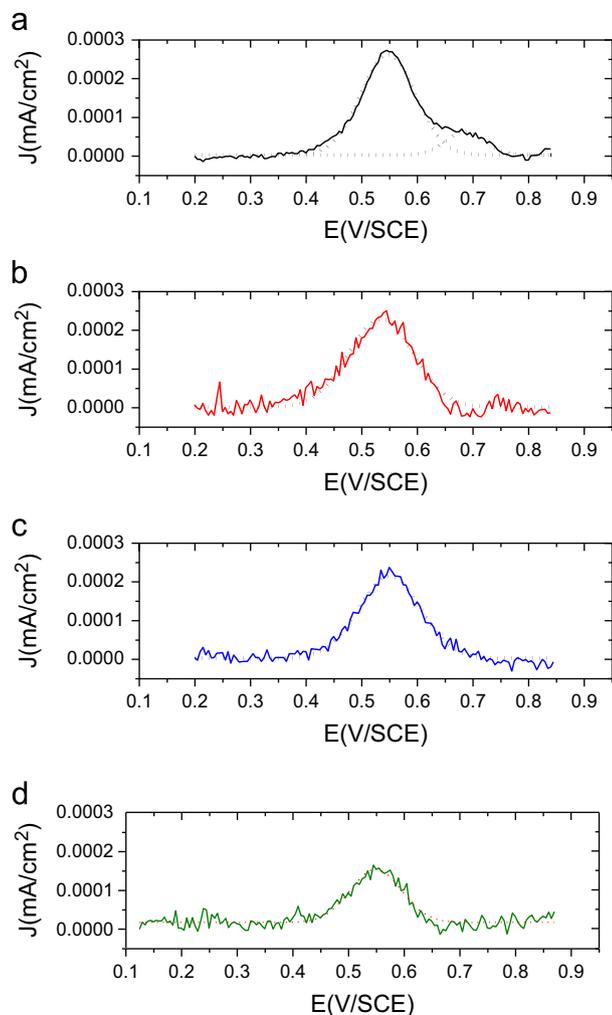
Furthermore, peak potential is dependent on the chain length and the derivatized  $\text{NH}_2$  number. In addition PN peak potential



**Fig. 5.** DPV at 25 mV/s on glassy carbon ( $S=0.071 \text{ cm}^2$ ) in 100 mM borate buffer at pH=9, (h) CBI-(histidine), 2.5 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  histidine = 100, (l) CBI-(lysine), 2.5 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  lysine = 100, (t) CBI-(threonine), 2.5 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  threonine = 100, (s) CBI-(serine), 2.5 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  serine = 100, (k) CBI-(PN), 2.5 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  PN = 100.

occurred approximately at the same peak potential found value that lysine. This seems to demonstrate that PN derivatized is relatively easily oxidized. By considering the PN sequence of 22 amino acids (see in Scheme 2), we assume that PN is obviously doubly derivatized, first by the threonine and second by the second  $\text{NH}_2$  group of lysine to form a CBI-TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK-CBI.

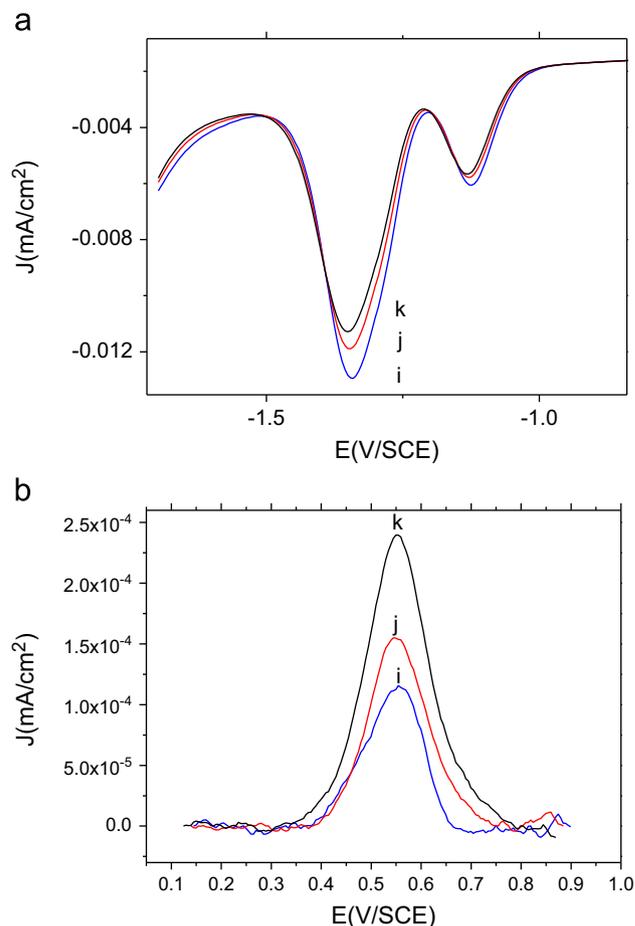
Three different protocols of derivatization were performed with DPV. The first one at pH=10 with 2.5 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  PN molar ratio of 100, the second one at pH=9 with 1 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  PN molar ratio of 40, the last one at pH=10 with ratio 1 mM NDA/25  $\mu\text{M}$  PN molar ratio of 40. As displayed in Fig. 6, CBI derivative oxidation peak was located at 0.55 V/SCE for each protocol, whatever the scan rates. These observations underline that any chemical reaction (such as proton transfer) is involved during charge transfer reaction on CBI derivative obtained from peptide. Indeed, the oxidation process of CBI-PN is only due to a loss of electron. Otherwise, peaks intensity would have been found as dependent of the protocol used. The peak area for the first method was found to be equal to  $(3.8 \pm 0.3) \times 10^{-5}$ ,  $(3.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$  for the second, and  $(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-5}$  for the third protocol. A comparison for the both pH at molar ratio of 40 shows a quasi-identical area. Moreover, peak area of the first protocol with NDA/PN molar ratio of 100 was found as being more important than the one obtained with NDA/PN molar ratio of 40. The observed difference was due to the fact that peptide was probably doubly derivatized leading to a self-quenching effect, which happened to be annoying with a fluorescence detection but not with an electrochemical detection. The peak can be decomposed into two different peaks, the first one corresponding to the doubly derivatized at 0.55 V/SCE and the second one to the simply derivatized at 0.69 V/SCE, this latter being more difficult to oxidize and having a peak potential more anodic than amino acids because of the chain length. An area of  $3.5 \times 10^{-5}$  and  $2 \times 10^{-5}$  were found for the doubly and simply derivatized, respectively. Another protocol with low concentration of PN (10  $\mu\text{M}$ ) in borate buffer pH 10, and ratio of 40 (0.4 mM NDA/10  $\mu\text{M}$  PN) was studied by DPV. The peak of CBI-PN was also present at 0.55 V/SCE and had an area of  $(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-5}$ . The peak potential is therefore independent of peptide concentration. When added PN concentration increases, CBI-PN yielded increases too, while the corresponding peak potential position still remains independent of the concentration of CBI-PN. In addition, the peak area increased with concentration of CBI-PN formed. Thereby, we have demonstrated that CBI-PN was quantitative using electrochemical detection as low concentration as 10  $\mu\text{M}$  of peptide.



**Fig. 6.** DPV of CBI-PN: (a) borate buffer pH=10, 2.5 mM NDA/25  $\mu$ M PN molar ratio 100, (b) borate buffer pH=9, 1 mM NDA/25  $\mu$ M PN molar ratio 40, (c) borate buffer pH=10, 1 mM NDA/25  $\mu$ M PN molar ratio 40, (d) 10  $\mu$ M PN in borate buffer pH=10, 0.4 mM NDA/10  $\mu$ M PN molar ratio 40. Scan rate, 25 mV/s; modulation time, 100 ms; modulation amplitude, 7.5 mV.

Finally, the third method at pH=10 with NDA/PN molar ratio of 40 was also studied by cyclic voltammetry leading to the same previous conclusions: no variation on peak potential position when CBI- PN increases and for scan rate variation.

For protocol at pH=10 and 1 mM NDA/25  $\mu$ M PN molar ratio of 40, variation of peak intensity against time has been investigated. As displayed in Fig. 7, the peak intensity increased as CBI yielded was increasing. Peak intensity was followed after 3, 9 and 15 min of derivatization time (Fig. 7A). At the same time, an increase CBI-PN can be correlated to a decrease of the two NDA peaks reduction. As mentioned previously, NDA was electroactive through successive reduction of the two aldehydes groups (see in Fig. 7B). In the other hand, it was an original way for online monitoring of PN derivatization. A time of 3 min was sufficient to obtain the formation of CBI-PN. Nevertheless, peak intensity was higher for a derivatization time over 15 min in agreement with those obtained with fluorescence detection. Stability of the labelling protocol was also performed by electrochemistry. We observed that the CBI-PN peak was still present at least after 24 h. After 30 min, the CBI peak area represents 98% of the *i* value, 97% after 1 h and 80% after 24 h. This confirms that the solution has to be kept away from light, then the labelling reaction is stable



**Fig. 7.** (A) DPV of CBI-PN reductive potential window for 1 mM NDA/25  $\mu$ M PN: (i) derivatization time of 3 min, (j) derivatization time of 9 min, (k) derivatization time of 15 min. (B) DPV of CBI-PN oxidative potential window: (i) derivatization time of 3 min, (j) derivatization time of 9 min, (k) derivatization time of 15 min.

and the solution can be analyzed by electrochemistry 24 h after mixing.

#### 4. Conclusions

This work describes NDA derivatives of AAs and peptide for quantitative analysis. From this assessment we decided to perform several experiments to optically and electrochemically characterize the label reaction of NDA with AAs involved in peptide PN. The response of derivatives on glassy carbon electrode exhibits excellent electrochemical properties and adequate stability over 24 h. The labelling reaction was studied by characterizing the resulting labelled molecules with optically and electrochemically characterizations. The measurements are coherent. We notice that the limit of CBI-PN detection is slightly lower for electrochemical measurements (0.2  $\mu$ M) compared to laser induced fluorescence detection (5  $\mu$ M). CBI-AAs can be detected at lower working potential, +0.5–0.7 V/ SCE, making this approach selective enough and enabling difference between simply or doubly derivatized peptide. These results have demonstrated the practical utility of detecting CBI derivatives electrochemically in micro-total analysis ( $\mu$ -TAS). Indeed, electrochemical detection is particularly attractive to perform portable  $\mu$ -TAS. Electrochemical detection could rather simplify the future miniaturized instrument set-up since the popular electrophoretic separations already require electrical parts. Even if it benefits from a good limit of detection, the introduction of

optical detection in microfluidic analytical instrument is experimentally rather complicated or bulky.

### Acknowledgements

We are indebted to Myriam Taverna for discussions and access to experimental facilities. This research was supported by the French ANR (Agence Nationale de la Recherche) in the context of the P2N "DIMIPOLE" project.

### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.060>.

### References

- [1] M.D. Oates, B.R. Cooper, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1573–1577S.
- [2] M. Lunte, O.S. Wang, *LC GC* 7 (1989) 908–910.
- [3] S.W. Su, Y.C. Liao, C.W. Whang, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 681–687.
- [4] S. Zhao, Y. Song, Y.M. Liu, *Talanta* 67 (2005) 212–216.
- [5] C.A. Vyas, S.M. Rawls, R.B. Raffa, J.G. Shackman, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 63 (2011) 119–122.
- [6] S. Lamba, A. Pandit, S.K. Sanghi, V.S. Gowri, A. Tiwari, V.K. Baderia, D.K. Singh, P. Nigam, *Anal. Chim. Acta.* 614 (2008) 190–195.
- [7] T.J. O'Shea, R.D. Greenhagen, S.M. Lunte, G.E. Lunte, *J. Chromatogr.* 593 (1992) 305–312.
- [8] Q. Dong, X. Wang, L. Zhu, W. Jin, *J. Chromatogr. A.* 959 (2002) 269–279.
- [9] Q. Weng, W. Jin, *Electrophoresis* 22 (2001) 2797–2803.
- [10] J. Wang, G. Chen, M. Pumera, *Electroanalysis* 15 (2003) 862–865.
- [11] S.M. Lunte, T. Mohabbat, O.S. Wong, T. Kuwana, *Anal. Biochem.* 178 (1989) 202–207.
- [12] B.K. Matuszewski, R.S. Givens, K. Srinivasachar, R.G. Carlson, T. Higuchi, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1102–1105.
- [13] P. De Montigny, J.F. Stobaugh, R.S. Givens, R.G. Carlson, K. Srinivasachar, L. A. Sternson, T. Higuchi, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1096–1101.
- [14] V. Planté-Bordeneuve, J. Carayol, A. Ferreira, D. Adams, F. Clerget-Darpoux, M. Misrahi, G. Said, C. Bonaiti-Pellie, *J. Med. Genet.* 40 (2003) 1–7.
- [15] S.M. Johnson, S. Connelly, C. Fearn, E.T. Powers, J.W. Kelly, *J. Mol. Biol.* 421 (2012) 185–203.
- [16] Y. Ando, M. Nakamura, S. Araki, *Arch. Neurol.* 62 (2005) 1057–1062.
- [17] R.G. Carlson, K. Srinivasachar, R.S. Givens, B.K. Matuszewski, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 3978–3983.
- [18] G. Rammouz, M. Lacroix, J.C. Garrigues, V. Poinot, F. Couderc, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 1223–1239.
- [19] T. Hu, H. Zuo, C.M. Riley, J.F. Stobaugh, S.M. Lunte, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 381–388.
- [20] L.-Y. Zhang, Y.-M. Liu, Z.-L. Wang, J.-K. Cheng, *Anal. Chem. Acta* 508 (2004) 141–145.
- [21] V.A. Frerichs, J.K. Herrmann, A. Aguirre, L.A. Colon, *Microchem. J.* 78 (2004) 135–142.
- [22] M.A. Nussbaum, J.E. Przedwiecki, D.U. Staerk, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1259–1263.

## Supplementary Materials

### Investigating of labelling and detection of Transthyretin synthetic peptide derivatized with Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde

Mathilde Faure<sup>a,b,†</sup>, Sonia Korchane<sup>c,†</sup>, Isabelle Le Potier<sup>c</sup>, Antoine Pallandre<sup>c</sup>, Claude Deslouis<sup>a,b</sup>, Anne-Marie Haghiri-Gosnet<sup>d</sup>, Jean Gamby<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, UPR 15, F-75252 Paris, France

<sup>b</sup> UPMC, LISE UPR 15 CNRS ; 4 Place Jussieu, case postale 133, F-75252 Paris, France

<sup>c</sup> Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Institut Galien Paris-Sud CNRS UMR 8612, Châtenay-Malabry, France

<sup>d</sup> CNRS, Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, UPR20, Marcoussis 91460, France

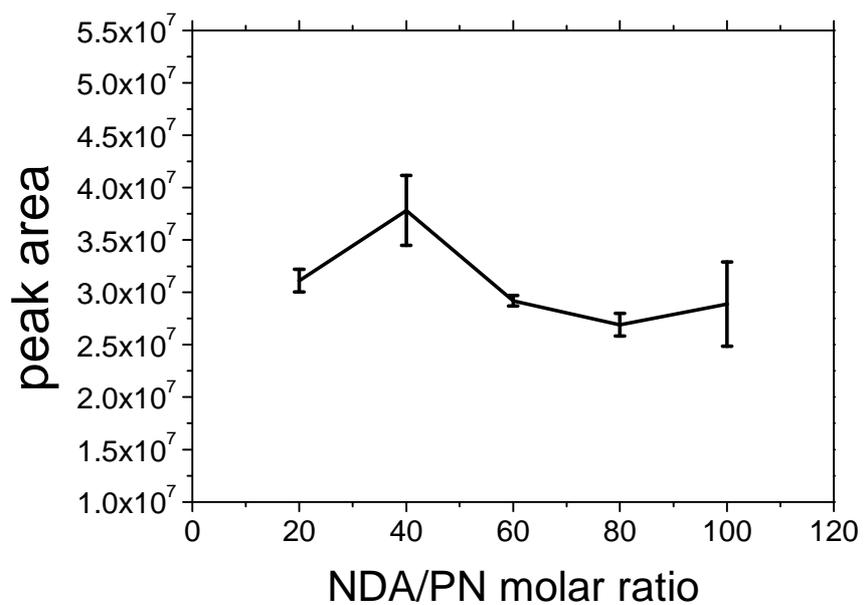
---

\* Corresponding author:

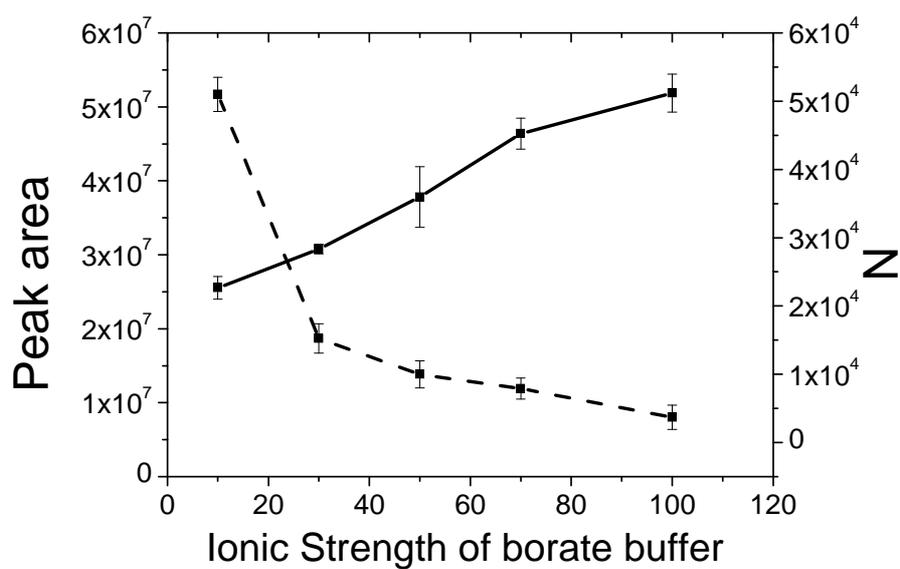
[jean.gamby@upmc.fr](mailto:jean.gamby@upmc.fr): tel: +33144273640 fax: ++33144274074

† The both authors have equally contributed to this work

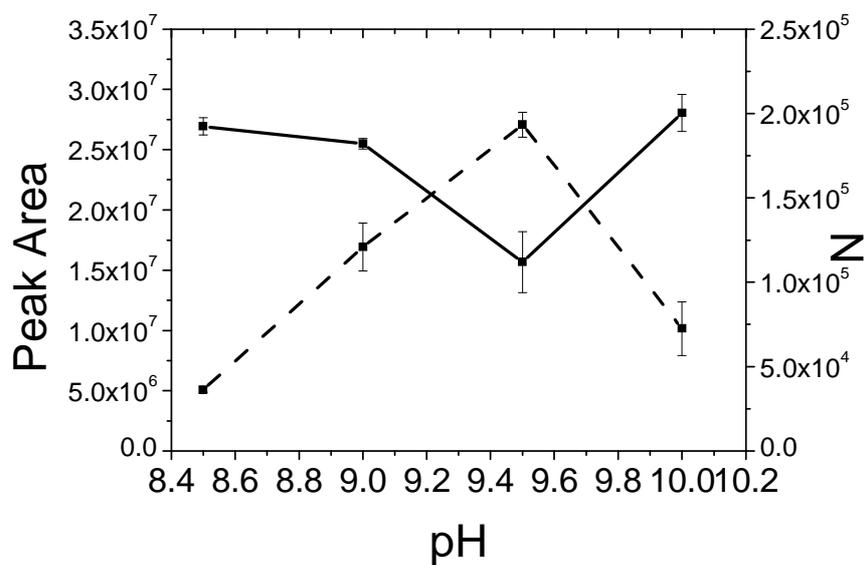
**Fig. S1:** Effect of molar ratio of NDA/PN on peak area of CBI derivative. Error bar correspond to the RSD (repetition number: 5). Derivatization and electrophoretic conditions are similar to these given in Fig. 1.



**Fig. S2:** Evolution of the peak area (solid line) and the separation efficiency (plate number) (dashed line) while the ionic strength of the derivatization buffer changes. Error bar correspond to the relative standard deviations (repetition number: 5). Derivatization and electrophoretic conditions are similar to these given in Fig. 1.



**Fig. S3:** Influence of the derivatization buffer pH on the peak area (solid line) and separation efficiency (dashed line) of the labeled PN. Error bar correspond to the relative standard deviations (repetition number: 5). Derivatization conditions as in Fig. 1 except: buffer ionic strength, 70 mM, electrophoretic conditions as in Fig. 1 except: BGE, 40 mM borate buffer pH=10.



Elaboration et études des propriétés de films minces de carbone amorphe azoté (a-CN<sub>x</sub>) sur verre conducteur: vers l'élaboration de support en verre polarisable pour la détection électrochimique et/ou optique en puce microfluidique

## Résumé

Une détection électrochimique et optique en puce microfluidique nécessite l'utilisation de supports transparents et conducteurs sur lesquels les processus d'oxydation/réduction du solvant sont minimisés dans un large domaine de potentiel et doivent posséder également une bonne réactivité électrochimique vis à vis des espèces à détecter. C'est pour ces raisons que les supports en verre transparent et conducteur (ex: Verre/ITO) font partie des meilleurs candidats. Cependant, la fenêtre de potentiel accessible restant limitée, nous avons élaborés des protocoles de dépôts de carbone amorphe azoté (CN<sub>x</sub>) avec différentes stoechiométries par pulvérisation cathodique sur les substrats de verre conducteur, répondant ainsi parfaitement aux deux impératifs précités. Ces lames de verres «polarisables» ont été caractérisées à l'air et en solution. La large gamme de conductivité obtenue destine ces supports à différentes applications en microfluidique: pouvoir moduler le flux électroosmotique en électrophorèse ou comme microélectrode de détection. Les résultats montrent aussi qu'il est possible d'activer électrochimiquement, voire de régénérer la réactivité des supports, et ce faisant éviter un polissage. L'efficacité de l'activation des électrodes sur verre a été démontrée pour la caractérisation électrochimique d'un marqueur fluorescent, le naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA), ainsi que pour la détection de différents acides aminés et peptide de la Transthyretine dérivés par le NDA. Enfin, des résultats préliminaires d'une configuration spécifique à 2 microélectrodes en puce microfluidique montrent qu'il est possible de dériver et de détecter la Transthyréline.

Mots clés : Carbone azoté amorphe, réactivité électrochimique, détection, naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde, benzoisindole, transthyréline, microfluidique.

## Résumé en anglais

Electrochemical combined with optical detection in microchip requires the mutual use of transparent and conductive materials onto which the process of oxidation/ reduction of the solvent are minimized over a wide range of potential and must also have a good electrochemical reactivity with respect to species to be detected. That is for these reasons that transparent and conductive glass slides (eg glass/ITO) are among the best candidates. However, the potential window available on these slides remains limited. We have developed protocols for deposition of amorphous carbon nitride (a-CN<sub>x</sub>) with different nitrogen content sputtered on conductive glass slides and complies fully with the above two requirements? These polarizable glass slides were characterized in air and in solution. The wide range of conductivity obtained with these materials destined them for different applications in microfluidics : to modulate the electroosmotic flow in electrophoresis or as microelectrode detection microchips. The results also show that it is possible to electrochemically activate or regenerate the reactivity of th glass/ITO/a-CN<sub>x</sub> electrodes and thereby avoid polishing. The efficiency of the activation of the glass/ITO/a-CN<sub>x</sub> electrodes was demonstrated for the electrochemical characterization of a fluorescent label, 2,3-naphatène dicarboxyaldehyde (NDA), and the detection of different amino acids and peptide derivatives of the transthyretin by the NDA. Finally, preliminary results with a specific two microelectrodes configuration show that it is possible to derive and detect Tranthyretin in microchip.

Keywords: amorphous carbon nitride, electrochemical reactivity, detection, naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde , benzoisindole, transthyretin, microfluidics