

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen
Faculté des Sciences
Département de Physique
Unité de Recherche Matériaux et Energies Renouvelables



Thèse pour l'obtention du diplôme de

Doctorat

En Physique Energétique et Matériaux

Présentée par :

Melle Amina KERMAD

Sur le Thème :

**Étude et réalisation d'un biocapteur à base
de silicium structuré (Électro) chimiquement**

Soutenue en 2014 devant la commission d'examen

M. Nasr Eddine CHABANE SARI	Professeur à l'Université de Tlemcen	Président
Mme. Nassera GHELLAI	Professeur à l'Université de Tlemcen	Directrice de thèse
Melle. Sabrina SAM	Maitre de Recherche au C.R.T.S.E ALGER	Co-directrice de thèse
M. Nour Eddine GABOUZE	Directeur de Recherche au C.R.T.S.E ALGER	Examineur
M. Abed Edayem KADOUN	Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbés	Examineur
M. Lacene LARABI	Professeur à l'Université de Tlemcen	Examineur
M. Abdelhalim BENMANSOUR	Professeur à l'Université de Tlemcen	Invité

REMERCIEMENTS

Mes remerciements, avant tous, à notre DIEU « ALLAH » tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant ces longues années d'études afin que je puisse arriver à ce stade.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Centre de Recherche en Technologie des Semi-Conducteurs pour l'Energétique (CRTSE) à Alger et l'Unité de Recherche en Matériaux et Energies Renouvelables (URMER), du département de Physique, à la Faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.

Cette thèse a été réalisée sous la direction de Mme Nassera GHELLAI, Professeur à l'Université de Tlemcen. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde gratitude de m'avoir encouragée à progresser et aller de l'avant. Je la remercie vivement pour ses remarques pertinentes et ses conseils qui m'ont été très précieux.

Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à ma co-directrice de thèse, Melle Sabrina SAM, Maitre de Recherches au CRTSE pour la formation scientifique et technique. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus sincère gratitude qu'il m'est particulièrement difficile de condenser en quelques lignes... Je la remercie pour son soutien continu et pour m'avoir mise en avant.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude à Mr Nasr Eddine CHABANE SARI, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté d'honorer de présider le Jury.

Que les honorables membres du jury, Mr Nour-Eddine GABOUZE, Directeur de Recherches au CRTSE, Mr Abdedaiem KADOUN, Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbés, Mr Mr Lahsen LARABI, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen et Mr Abdelhalim BENMANSOUR, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, veuillent croire en mes remerciements anticipés pour avoir bien voulu accepter d'enrichir et d'évaluer ce travail.

Au cours de mes années de stage au CRTSE, j'ai été toujours soutenue par Mr Nour-Eddine GABOUZE Directeur de la division des Couches Minces et Applications (CMA), je le remercie de m'avoir accueilli dans sa division. Je lui suis sincèrement reconnaissante pour toutes ses remarques pertinentes et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Sa disponibilité, sa modestie et son expertise m'ont été très précieuses. Merci pour tout.

Mes remerciements vont également à Mr Messaoud BOUMAOUR, ex-Directeur de l'UDTS ainsi que Mr Abderrahmane MOUSSI l'actuel Directeur du CRTSE pour m'avoir accueillie au sein du CRTSE.

Je remercie tendrement les membres de l'équipe CMA 14 Nawel CHIBOUB, Samia BELHOUSSE, Fatma-Zohra TIGHILT, et Kahina LASMI qui m'ont souvent soutenue et encouragée on créant une bonne ambiance de travail.

Mes remerciements vont également vers les membres de l'équipe CMA 11 Karima BELDJILALI, Malika BEROUAKEN, Chafiaa YADDADEN, Katia CHEBOUT, Hocine CHERAGA, Maha AYAT, Amel LOUNES et Nihad FORTAS, qui m'ont toujours aidée et encouragée durant mon séjour au CRTSE.

Les membres de l'équipe CMA12 et particulièrement son chef d'équipe Mr Aissa KEFFOUS qui était toujours prêt à rendre service avec bonne humeur, Lamia TALBI, Nabila RAJDEL Assia BOUKEZZATA, et Abdelhak CHERIET qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

Je dis merci à celle qui m'a toujours accompagnée et soutenue dans tous mes moments de joie et de désespérance durant nos longues années d'études ensemble à TLEMCEN et à ALGER, à Khadidja KHALDI qu'elle trouve ici toute les expressions de reconnaissance et de gratitude.

Aussi, je tiens à remercier mes camarades doctorantes au CRTSE, particulièrement Nadia AIT AHMED, Kawthar M'HAMMEDI, Nafissa ZEKRI et d'autres pour leurs soutiens et encouragements.

Sans citer de noms, que mes amis et mes collègues de travail à l'Université de Tlemcen et au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) trouvent en ces quelques mots, l'expression de mes plus sincères remerciements, pour avoir accepté de m'orienter, m'aider ou tout simplement, pour m'avoir écoutée.

Enfin, je terminerai en remerciant mes chers parents et mes chers frères et sœurs Fatima Zohra, Ahmed Lamine, Majda et mon adorable Lotfi en termes de reconnaissance pour leur patience avec moi, leurs soutiens et leurs encouragements.

SOMMAIRE

Introduction générale	9
Chapitre I : Généralités sur les biocapteurs	
Introduction	13
I Histoire des biocapteurs	14
II Définition	15
III Qualités métrologiques du biocapteur	16
IV Description du biocapteur	16
IV.1 Le biorécepteur	16
IV.2 Le transducteur	18
IV.2.1 Biocapteurs manométriques	18
IV.2.2 Biocapteurs piézoélectriques	19
IV.2.3 Biocapteurs thermiques	19
IV.2.4 Biocapteurs optiques	20
IV.2.5 Les capteurs ENFET	21
IV. 2. 6 Biocapteurs électrochimiques	22
IV. 2. 6. 1 Biocapteurs conductimétriques	22
IV. 2. 6. 2 Biocapteur potentiométriques	23
IV. 2. 6. 3 Biocapteurs ampérométriques	24
V Techniques d'immobilisation des biomolécules	28
VI Les applications des biocapteurs	30
VII Les biocapteurs enzymatiques	33
VII.1 Définition et classification	33
VII.2 La catalyse enzymatique	34
VII.3 Principe de fonctionnement d'un biocapteur enzymatique	36
VII.4 Propriétés des enzymes immobilisées	37
VII.4.1 Stabilité	37
VII.4.2 Propriétés cinétiques	37
VII.4. 2. 1. Le modèle de Michaelis & Menten	37

VII.5. Paramètres affectant la réponse des capteurs enzymatique	39
VII.5.1 Effet du pH	39
VII.5.2 Effet de température	40
VII.5.3 Effet de force ionique	41
III.5.4 Effet des interférences	42
Références	44

Chapitre II : Le silicium poreux

Introduction	46
Partie I : Etude bibliographique sur le silicium poreux	
I Formation du silicium poreux par anodisation électrochimique	47
I.1 Mécanisme de dissolution du silicium	47
I.2 Les trois régimes d'anodisation électrochimiques	48
I.3 Les paramètres d'anodisation électrochimique	49
I.3.1 Nature du substrat et condition d'éclairement	49
I.3.2 Densité de courant	50
I.3.3 Temps d'anodisation	50
I.3.4 Composition de l'électrolyte	50
I.3.5 Température	51
I.4 Les caractéristiques des couches poreuses de silicium	51
I.4.1 La porosité	51
I.4.2 Surface spécifique	52
I.4.3 Épaisseur des couches de silicium poreux	52
I.4.4 Les différentes morphologies du silicium poreux	53
I.5 Autres propriétés importantes du silicium poreux	54
I.5.1 Propriétés chimiques	54
I.5.2 Biocompatibilité du silicium poreux	54
I.6 Les applications du silicium poreux	55
I.6.1 Domaine de microélectronique	55
I.6.2 Domaine de l'optoélectronique	56

I.6.3 Les guides d'ondes	56
I.6.4 Capteurs et biocapteurs	56
Partie II : Le silicium poreux élaboration et caractérisation	
I. Méthodes expérimentales	59
I.1 Préparation des échantillons de silicium	59
I.2 Cellule électrochimique	60
I.3 Sources de courant	61
I.4 Condition de formation de silicium méso-poreux	61
I.4.1 Type de substrats de silicium	61
I.4.2 Electrolytes d'anodisation	61
I.4.3 Densité du courant et temps d'anodisation	62
II Caractérisation des couches de silicium poreux	62
II.1 Détermination de la porosité par gravimétrie	62
II.2. Caractérisation par MEB	62
II. 3. Caractérisation par angle de contact	63
II.4 Caractérisation par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	64
Conclusion	65
Références	66
Chapitre III : Fonctionnalisation de la surface du silicium poreux et immobilisation de l'enzyme	
Introduction	70
Partie I : Notions théoriques sur les étapes de fonctionnalisation du silicium poreux	
I Etat de l'art sur le greffage covalent de groupements organiques sur la surface de silicium	73
I.1 Hydrosilylation en présence d'un initiateur	73
I.2 Hydrosilylation thermique	74
I.3 Hydrosilylation photochimique	74
I.4 Hydrosilylation induite par micro-ondes	76
I.5 Hydrosilylation catalysée par des acides de Lewis	75
I.6 Réaction avec un organomagnésien ou un organolithien	76

I.7 Procédés électrochimiques	76
II Greffage de la monocouche d'acide par Hydrosilylation thermique à la surface de silicium poreux	76
III Activation des terminaisons acides	77
IV Immobilisation de l'enzyme	80
Partie II : Préparation des couches fonctionnalisées du silicium poreux	
I Le couplage thermique des ferrocènes à la surface de H-Si(111)	84
I.1 Les surfaces de silicium (111) hydrogénées	84
I.1.1 Introduction	84
I.1.2 Procédure expérimentale	85
I.2 Hydrosilylation photochimique de l'acide undécylénique à la surface hydrogénée de silicium	86
I.2.1 Procédure expérimentale	86
I.3 Le couplage des molécules de ferrocène sur les surfaces acides de silicium	87
I.3.1 Introduction	87
I.3.2 Procédure expérimentale	87
I.4 Caractérisation IR en mode de réflexion totale (ATR)	88
II. Fonctionnalisation des couches poreuses de silicium	89
II.1 Greffage par hydrosilylation thermique	89
II.1.1 Procédure expérimentale	89
II.1.2 Caractérisation par angle de contact du SiP après greffage de l'acide	91
II.1.3 Caractéristiques FTIR du SiP après greffage de l'acide	91
II.2 Activation des terminaisons acides	92
II.2.1 Procédure expérimentale	92
II.2.2 Caractérisation par angle de contact des surfaces activées	93
II.2.3 Caractéristiques FTIR des surfaces activées	94
II.3 Immobilisation de la HRP	96
II.3.1 Procédure expérimentale	95
II.3.2. Caractérisation par MEB des surfaces immobilisées avec HRP	96
II.3.3 Caractérisation par mesure de l'angle de contact des surfaces immobilisées avec HRP	96

II.3.4 Caractérisation par FTIR des surfaces immobilisées avec HRP	97
Conclusion	99
Références	100
Chapitre IV : Application des couches modifiées du silicium poreux par HRP pour la détection du phénol	
Introduction	104
Partie I : Aspects théoriques	
I Généralités sur les phénols	106
I.1 Définition et structure	106
I.2 Nomenclature	106
I.3 Origine	106
I.4 Toxicité	107
I.5 Propriétés chimiques des composés phénoliques	107
II Principe d'une électrode immobilisée avec HRP pour la détection des phénols	110
III La voltampérométrie cyclique	110
III.1 Principe de la méthode	110
III.2 Espèces redox en solution	111
III.3 Espèces redox greffées en surface	112
Partie II: Etude du comportement électrochimique de la HRP immobilise sur le silicium poreux	
I Etude du comportement électrochimique des ferrocènes couplées à la surface acide de silicium plat	117
II Etude électrochimique de la HRP immobilisée sur le SiP	119
II.1 Etude électrochimique directe de la HRP immobilisée sur le SiP	119
II.2 Etude électrochimique de la HRP immobilisée sur le SiP en présence de H ₂ O ₂	122
II.3 Etude électrochimique de la HRP immobilisée sur le SiP en présence du phénol	124
II.3.1 Etude de l'effet de la concentration du phénol sur la réponse de la HRP immobilisée	126
II.3.2 Stabilité de la réponse électrochimique de la HRP immobilisée	127
Conclusion	128
Références	129
Conclusion générale	131

Annexes : Techniques de caractérisation

ANNEXE I : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	133
ANNEXE II : Mesure d'angle de contact	138
ANNEXE III : Microscopie électronique à balayage	139
Résumé	141

Introduction générale

L'industrialisation intensive ainsi que les utilisations agricoles et domestiques d'un nombre croissant de produits chimiques ont conduit à la dissémination de nombreux composés dans l'environnement à savoir les dérivés phénoliques [1], à l'origine d'une pollution importante des écosystèmes. Ces composés peuvent avoir de graves répercussions sur la santé des organismes vivants, en particulier celle de l'Homme [1, 2]. Il existe donc à l'heure actuelle une forte demande pour des méthodes d'analyse rapides et peu coûteuses permettant le suivi des polluants chimiques présents dans l'environnement et l'évaluation de leurs effets toxiques.

Les techniques analytiques de détection déjà disponibles sont coûteuses et compliquées à mettre en œuvre. Par conséquent, il subsiste un besoin capital de développer de nouvelles méthodes de détection qui soient rapides, simples d'utilisation et qui puissent mesurer de très faibles concentrations. Ces méthodes pourraient alors compléter, voir remplacer les techniques classiques existantes. Les capteurs électrochimiques utilisant les méthodes voltampérométriques remplissent ces critères pour des analyses faciles et rapides [3], et ils sont susceptibles d'être miniaturisés [4], pour permettre le développement d'appareils de détection multi-analytes pouvant fonctionner directement sur terrain [5].

La fabrication de capteurs pour la détection de molécules chimiques requiert la modification de la surface d'une électrode par des molécules sondes. Les travaux les plus récents dans ce domaine font référence à l'immobilisation d'enzymes à la surface d'une électrode. En effet, des électrodes modifiées avec des enzymes oxydases (Tyrosinase, Horse Radish Peroxydase) ont été développées et utilisées pour la détermination des peroxydes. Par la suite, ces électrodes modifiées ont été utilisées pour la détection et la dégradation d'autres composés, tels que les amines aromatiques et les dérivés phénoliques, sous des conditions appropriées [6,7].

Par ailleurs, le mode d'immobilisation de l'enzyme est un facteur déterminant pour les performances du capteur [8, 9]. A ce niveau, une grande stabilité peut être obtenue par immobilisation de monocouches organiques d'une manière covalente et irréversible à la surface de silicium via la formation de la liaison silicium-carbone [10- 12].

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés au silicium sous sa forme poreuse comme substrat pour l'immobilisation de ces enzymes. Le silicium poreux (SiP), de par ses propriétés exceptionnelles constitue la matrice idéale pour le développement de capteurs

chimiques ou biologiques [13-15]. En effet, de par sa grande surface spécifique, le SiP permet l'accrochage d'un grand nombre de molécules sondes ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la sensibilité du capteur.

Ce manuscrit se compose de quatre chapitres:

Dans le premier chapitre, nous aborderons une étude bibliographique sur les biocapteurs, leur principe de fonctionnement, leurs différents constituants, leurs modes de transduction et les techniques d'immobilisation des biorécepteurs. Nous exposons également dans ce chapitre les biocapteurs à base d'enzymes. En effet, après une présentation de l'aspect catalytique des enzymes, une étude bibliographique sera axée sur les lois fondamentales régissant les processus enzymatiques.

Le deuxième chapitre est consacré au substrat de SiP. Dans la première partie, nous exposerons une étude bibliographique sur la fabrication du SiP par la méthode électrochimique, en décrivant les mécanismes et les paramètres qui gèrent le phénomène de formation des pores, les caractéristiques et les propriétés des couches poreuses et enfin ses différentes applications potentielles. La deuxième partie sera consacrée aux procédés expérimentaux utilisés pour obtenir le silicium méso-poreux. Les couches poreuses obtenues seront caractérisées par gravimétrie, par microscopie électronique à balayage (MEB), par angle de contact et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Dans le troisième chapitre nous détaillerons la procédure suivie pour la modification des surfaces de SiP par l'enzyme. Nous commencerons dans la première partie par un état de l'art des différents procédés connus pour préparer des monocouches organiques liées de façon covalente à une surface de silicium hydrogénée via la formation d'une liaison silicium carbone. Dans cette même partie, à travers une étude bibliographique, un intérêt particulier sera porté à l'étape intermédiaire qui consiste à générer un ester actif à partir des groupements acides en surface (Activation). Après une exposition des principales contraintes qu'il faut prévenir dans le but de choisir l'enzyme la plus adéquate, nous focaliserons notre attention dans la dernière étape de fonctionnalisation du SiP, au couplage de l'enzyme sur la surface activée du SiP par la formation de liaisons amides. Dans la deuxième partie de ce troisième chapitre, nous présenterons le matériel et les méthodes utilisés pour l'immobilisation de

l'enzyme choisie la Horse Radish Peroxydase (HRP) à la surface du SiP, en passant en premier temps par le greffage de monocouches terminées par des fonctions acides.

Après chaque étape de fonctionnalisation des couches poreuses du silicium, des mesures par angle de contact et des analyses par FTIR seront effectuées.

Le quatrième chapitre sera réservé à l'étude du comportement électrochimique, par voltampérométrie cyclique, des surfaces de SiP modifiées par l'enzyme en présence du phénol. Après un aperçu sur les phénols, leur mécanisme réactionnel avec la HRP et un rappel sur la théorie régissant la voltampérométrie cyclique des espèces greffées en surface, nous aborderons dans la deuxième partie l'étude expérimentale du comportement électrochimique des surfaces modifiées en absence et en présence du phénol.

Bibliographies

- [1] **T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumiya, T. Hanaoka, F. Mizukami, M. Ono**, Sensors and Actuators B, 153 (2011), 361.
- [2] **R.D.C. Silva Luz, F.S. Damos, A.B. de Oliveira, J. Beck, L.T. Kubota**, Sensors and Actuators B, 117, (2006), 274.
- [3] **E. Bakker**. Anal. Chem, 76, (2004), 3284.
- [4] **W. Yantasee, Y. Lin, K. Hongsirikarn, G. E. Fryxell, R. Addleman, C. Timchalk**. Environ. Health Perspect, 115,(2007), 1683.
- [5] **K. C. Honeychurch, J. P. Hart**. Trends Anal. Chem, 22, (2003), 456.
- [6] **J. Huang, Y. Tsai** sensors and Actuators, 140, (2009), 267.
- [7] **T. Ruzgas, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga**, Analytica Chimica Acta, 311, (1995), 245.
- [8] **A.M. Rossi, L. Wang, V. Reipa, T.E. Murphy**, Biosensors and Bioelectronics 23,(2007), 741.
- [9] **X. Lu, Z. Wen, J. Li**, Biomaterials, 27, (2006), 5740.
- [10] **E. G. Robins, M. P. Stewart, J. M. Buriak**. Chem. Commun,(1999), 2479.
- [11] **R. Boukherroub, J.T.C. Wojtyk, D.D.M. Wayner, D.J.J. Lockwood**, Journal of the Electrochemical Society H59, (2002), 149.
- [12] **P. Gorostiza, C. Henry de Villeneuve, Q.Y. Sun, F. Sanz, X. Wallart, R. Boukherroub, P.J. Allongue**, Journal of Physical Chemistry B, 110, (2006), 5576.
- [13] **M. P. Stewart, J. M. Buriak**. Adv. Mater, 12, (2000), 859.
- [14] **M. Archer, M. Christophersen, P.M. Fauchet**, Biomedical Microdevices 6, (2004), 203.
- [15] **L.T. Canham**, Advanced Materials 7, (1995), 1033.

CHAPITRE. I. GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOCAPTEURS

Introduction

La détection d'une espèce chimique ou biologique ainsi que l'évaluation de sa quantité ou sa concentration ont été l'objet de nombreuses recherches ces dernières années du fait de leurs nombreuses applications dans des domaines très variés (biologie, biochimie, médecine, sécurité, agriculture et environnement) [1]. Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'une espèce chimique ou biologique sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre. Les biocapteurs sont considérés comme une solution alternative particulièrement intéressante, aux techniques analytiques traditionnelles telle que la chromatographie ou la spectrométrie. De plus, leur petite taille, leur facilité d'utilisation ou encore la possibilité de réaliser des mesures sur site, font des biocapteurs des outils particulièrement intéressants [2]. L'évolution de ces instruments a commencé depuis une cinquantaine d'années, sous la pression de trois facteurs principaux [3]:

- Le besoin en capteurs fiables qu'entraîne la croissante sévérité des normes dans le domaine biochimique (pharmacie, monitoring médical);
- La généralisation de l'automatisation dans le génie des procédés;
- La recherche du moindre coût dans le domaine de l'analyse biomédical ou environnemental.

Dans ce chapitre, nous présentons des généralités sur les biocapteurs ainsi que les différentes méthodes de transduction et les différents types de biorécepteurs utilisées dans la conception des biocapteurs, en mettant l'accent sur les biocapteurs enzymatiques.

I. Histoire des biocapteurs

On peut dire que l'histoire des biocapteurs a débuté dans les années 1950 grâce au développement par L.C Clark d'une l'électrode permettant de mesurer l'oxygène dissous dans le sang des patients ayant subi des interventions chirurgicales [4]. Par la suite, Lyons et Clark [5] ont proposé de coupler cette électrode à une enzyme en vue d'une application dans le domaine de la chirurgie cardiovasculaire. Dans ce premier biocapteur, l'enzyme glucose oxydase (GOD), immobilisée sur l'électrode à oxygène via une membrane de dialyse, catalysait l'oxydation du glucose en consommant l'oxygène. Dans les années qui ont suivi, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce premier biocapteur à glucose [6] ou dans le but d'appliquer son principe au développement d'autres biocapteurs enzymatiques. On peut ainsi citer par exemple le biocapteur potentiométrique proposé par Guilbault et Montalvo en 1969 pour la détection de l'urée [7]. Mais ce n'est qu'en 1975 que le premier biocapteur à glucose basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fut commercialisé par la société Yellow Springs Instrument (Ohio, Amérique).

Depuis, l'engouement pour ce type d'outil n'a cessé de croître, conduisant à des évolutions considérables. Les enzymes ont été remplacées par des bactéries dans les biocapteurs proposés par Diviès [8] dans la dernière moitié des années 70. L'incorporation du biocapteur à glucose électrochimique dans le pancréas a pu être réalisée par Clemens *et al* [9]. A la même période, un biocapteur enzymatique utilisant la lactate déshydrogénase (LDH), a été commercialisé par Roche (Suisse) pour la détection du lactate. Il a été le précurseur d'une nouvelle génération de biocapteurs employant un médiateur soluble, les sels de ferrocyanure, dont le rôle est d'améliorer le transfert des électrons issus de la réaction enzymatique entre les biomatériaux et l'électrode. L'utilisation de ces sels et de leurs dérivés a été ensuite étendue aux capteurs utilisant des oxydoréductases, telles que la GOD [10] en 1984. Des anticorps ont également été employés pour la construction d'immuno-capteurs [11].

De nouvelles techniques de détection permettant le suivi en temps réel des réactions d'affinité, telle que la Résonance plasmonique de surface (SPR), ont été développées dans les années 90. C'est également à cette époque qu'ont été commercialisées par la société MediSense's les premières électrodes de carbone sérigraphiées.

Enfin, les progrès réalisés dans le domaine des biocapteurs depuis le début du 21ème siècle ont été possibles grâce à l'évolution des micro- et des nanotechnologies, des sciences des matériaux, de la biotechnologie ou de l'informatique. Les chercheurs sont maintenant

capables d'isoler et de manipuler des structures, telles que l'ADN ou les récepteurs, de les associer avec des nanotubes de carbones ou des nanoparticules d'or ou d'argent. Les transducteurs sont par ailleurs de natures très variées et de tailles de plus en plus petites. Les performances et la simplicité de fonctionnement des biocapteurs ont été fortement améliorées. Les techniques de traitement du signal deviennent plus rapides et précises. La possibilité de combiner une large gamme d'entités biologiques et de transducteurs permet la résolution de problèmes analytiques très variés dans le domaine de la santé, de l'agroalimentaire ou encore de l'environnement.

II. Définition

Un biocapteur est un outil ou système analytique conçu pour transformer une réponse biologique en un signal électrique [12]. Ce dispositif est basé sur l'accouplement spatial direct d'un composé biologiquement actif immobilisé, appelé « biorécepteur » ou « éléments de reconnaissance biologique », avec un transducteur qui agit en tant que détecteur et un amplificateur électronique [13]. Le biocapteur emploie les systèmes biologiques à différents niveaux d'intégration pour identifier spécifiquement la substance à déterminer. La première étape de cette interaction est la formation d'un complexe spécifique de la substance active immobilisée avec l'analyte.

La figure (I-1) représente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans l'échantillon, toute information utile à son évaluation.

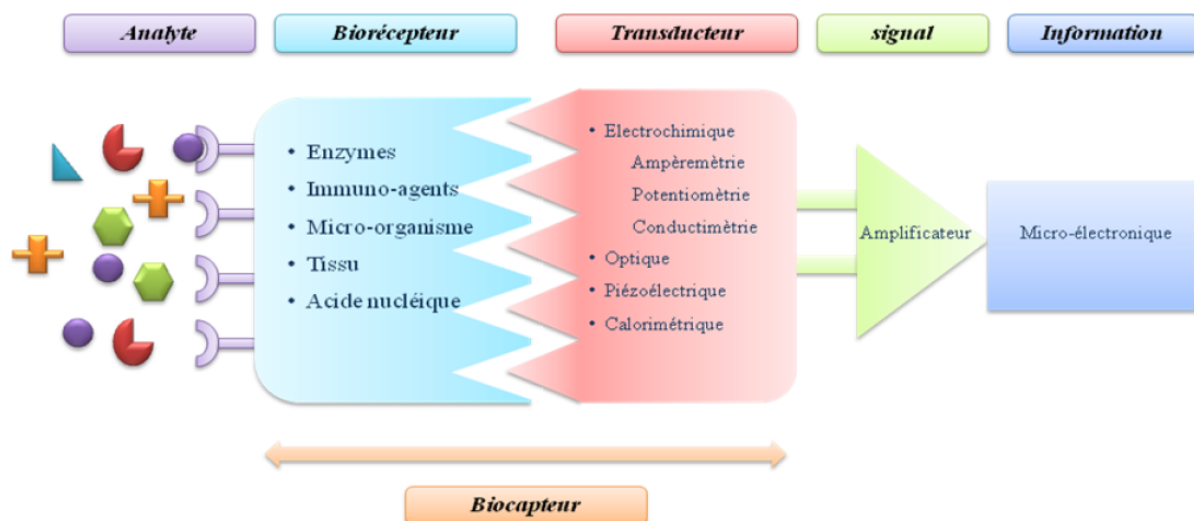


Figure. I. 1. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

III. Qualités métrologiques du biocapteur

Un biocapteur, comme tout outil d'analyse, est un organe de saisie d'informations. Les performances des biocapteurs sont généralement évaluées expérimentalement par leur sensibilité, leur limite de détection (LD), leur gamme linéaire et dynamique, leur reproductibilité et/ou leur sélectivité. Les autres paramètres évalués incluent le temps de réponse, la stabilité opérationnelle et de stockage du capteur. Idéalement, la surface de détection est régénérée pour que le transducteur soit recyclable. Toutefois, dans certains cas, notamment dans le domaine de l'analyse clinique, l'usage unique peut être plus adapté.

IV. Description du biocapteur

IV. 1. Le biorécepteur

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur. Il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une molécule active (par exemple : enzyme, anticorps, ADN, cellule entière, micro-organisme) immobilisée qui transforme ce substrat en un produit détectable par le transducteur. Dans un biocapteur, le biorécepteur offre une spécificité et une sensibilité élevée pour un groupe particulier d'analyte, ainsi qu'une réponse rapide. Plusieurs types de biorécepteurs ont été utilisés comme moyen de reconnaissance moléculaire pour le développement de biocapteurs. Parmi ces biorécepteurs on cite par exemple les biocapteurs à enzymes qui utilisent généralement des enzymes spécifiques pour la capture et la génération catalytique d'un produit qui est alors directement mesuré grâce à une large gamme de transducteurs (électrochimiques, optiques, thermiques, acoustiques...). Ce type de biocapteurs à été souvent utilisé pour la quantification de contaminants tels que les pesticides, herbicides ou antibiotiques Le biorécepteur microorganisme est utilisé comme biocapteur pour la synthèse pharmaceutique, le traitement des eaux usées et l'industrie alimentaire.

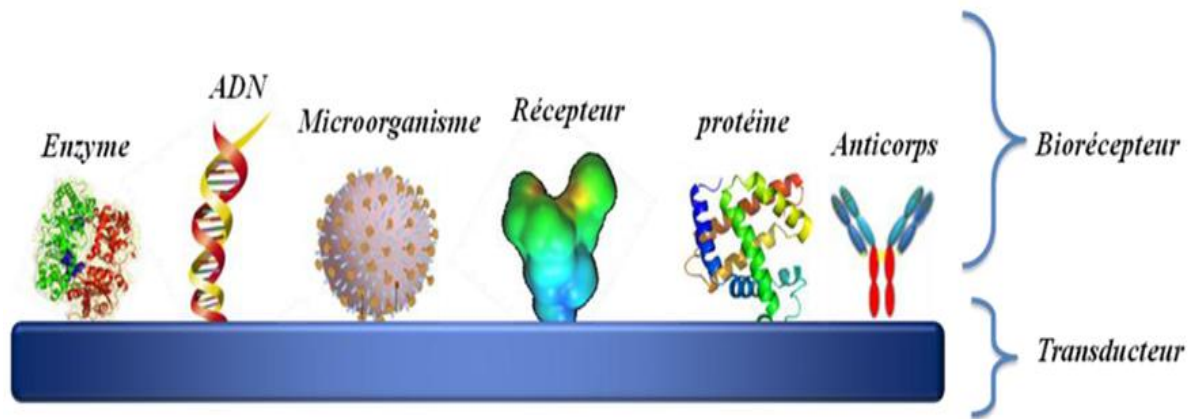


Figure. I. 2. Représentation schématique des différents biocapteurs

Comme l'illustre la figure (I-2) ci-dessus, ils existent différents types de biorécepteur :

- ✚ Les enzymes [14] qui sont les plus utilisées et les plus commercialisées. En effet, elles présentent un grand nombre d'avantages notamment la reproductibilité des lots mais par contre il peut y avoir une instabilité de leur fonctionnement et la nécessité d'utiliser un cofacteur ou plusieurs enzymes associées pour un même biocapteur.
- ✚ Les microorganismes [15] (cellules entières) principalement utilisés en cas de systèmes réactionnels complexes puisque les enzymes et cofacteurs essentiels y sont intrinsèquement présents.
- ✚ Les tissus et [16,17] (structures spécialisées contenues dans les cellules) aussi bien d'origine animale que végétale. Ils sont surtout utilisés pour la détection des aminoacides de par leur robustesse et leur bonne cohésion.
- ✚ Les immunorécepteurs et les chémorécepteurs [18,19] fonctionnant sur le principe de réaction antigène/anticorps qui induit généralement une faible variation de signal (variation de potentiel par exemple). Cette modification est très difficile à détecter, c'est pourquoi il faut amplifier le signal (en utilisant par exemple un marquage de l'antigène ou de l'anticorps) qui catalysera la production d'un composé détectable.

Ainsi, selon la nature de l'élément biologique immobilisé, plusieurs types de biocapteurs peuvent être évoqués.

-Les biocapteurs microbiens,

-Les biocapteurs immunologiques,

-Les biocapteurs enzymatiques.

Une étude plus approfondie des biocapteurs enzymatiques sera menée dans la deuxième partie de ce chapitre.

IV. 2. Le transducteur

Le transducteur représente l'autre élément du biocapteur. Il sert à exploiter la modification biochimique du substrat par le biorécepteur pour la transformer en signal exploitable. Dans le sens général, on peut dire que le transducteur assure la conversion d'un type d'énergie dans un autre.

Suivant le type de réaction et les substances libérées ou consommées, on choisira le transducteur correspondant. Le choix du transducteur dépend aussi de l'application du biocapteur. Différents systèmes de transduction, basés sur des principes différents, sont généralement utilisés afin de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal exploitable. D'une part, des transducteurs non spécifiques et applicables peuvent être employés, indiquant des paramètres généraux tels que l'enthalpie de réaction (thermistance), le changement de la masse (cristal piézoélectrique), ou l'épaisseur de la couche (réflectométrie). D'autre part, une indication spécifique peut être réalisée avec les électrodes potentiométriques pour des espèces comme H^+ , OH^- , NH_3 , CO_2 ou H_2O_2 .

IV. 2. 1. Biocapteurs manométriques

Les biocapteurs manométriques reposent sur la détection des changements de pression. En effet, une variation de la concentration d'un gaz dans une cavité close peut être considérée comme un changement de la pression partielle du gaz. Le ligand est, en général, une enzyme qui permet de transformer l'espèce à détecter en gaz [20]. Ce type de capteur présente l'avantage de ne jamais être en contact direct avec l'échantillon à analyser comme l'illustre la figure (I-3).

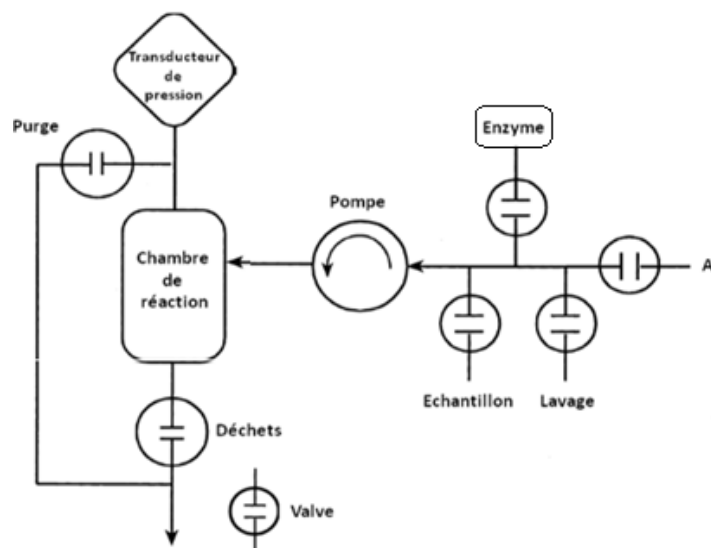


Figure. I. 3. Exemple d'un biocapteur manométrique : biocapteur à glucose développé par Jenkins & Delwiche [20] (précision du biocapteur 0.2 mM, gamme de travail : de 0 à 5 mM).

IV. 2. 2. Biocapteurs piézoélectriques

Ces biocapteurs sont basés sur la mesure de l'oscillation d'un cristal de quartz sur lequel est immobilisé le composé biologique (figure I-4). En effet, un cristal de quartz présente l'avantage de pouvoir osciller sous l'effet d'un stimulus électrique lorsqu'il est plongé partiellement ou totalement dans un milieu liquide. Cette caractéristique permet de quantifier tout changement de masse à la surface du cristal de quartz à condition que les propriétés physico-chimiques du milieu soient connues. Effectivement, une modification de la masse va entraîner un changement quantifiable de la fréquence de résonance. Ces biocapteurs présentent l'avantage de donner des réponses rapides mais ont une sélectivité qui dépend de la couche active et peuvent manquer de sensibilité en fonction du système oscillant utilisé.

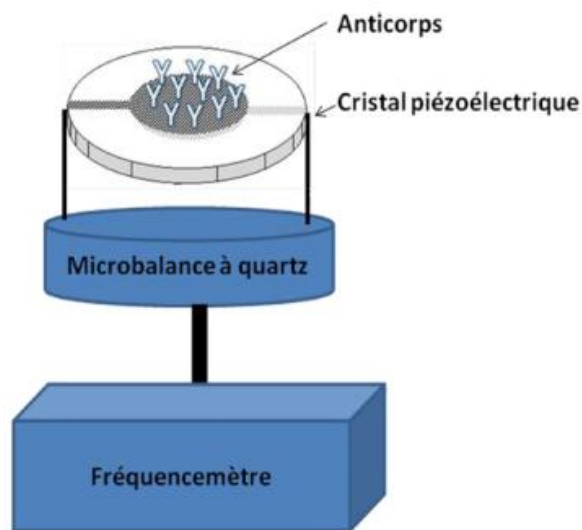


Figure. I. 4. Exemple d'un biocapteur piézoélectrique [21].

IV. 2. 3. Biocapteurs thermiques

Ces biocapteurs, développés dans les années 1970, permettent de transformer un signal biochimique en un signal thermique. Un microcalorimètre ou une résistance thermique, raccordé au composé biologique, permet de mesurer les modifications d'enthalpie ou de température dues à une réaction entre le biorécepteur et l'espèce à détecter (figure I-5). Lorsque ces biocapteurs thermiques sont immunochimiques, on les appelle « TELISA » [22] (Thermometric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Ces biocapteurs ont été utilisés notamment dans la détection d'insuline. Les principaux avantages de ce genre de biocapteurs sont leur rapidité de réponse, leur reproductivité, l'absence d'interférence des produits dérivés et d'interférence électrochimique ou optique et la stabilité des colonnes d'enzymes. Cependant, leur coût est relativement élevé du fait de la lourde instrumentation nécessaire à

leur mise en œuvre, l'obligation d'un prétraitement pour des échantillons spécifiques et l'avalissement (encrassement) pour une utilisation prolongée.

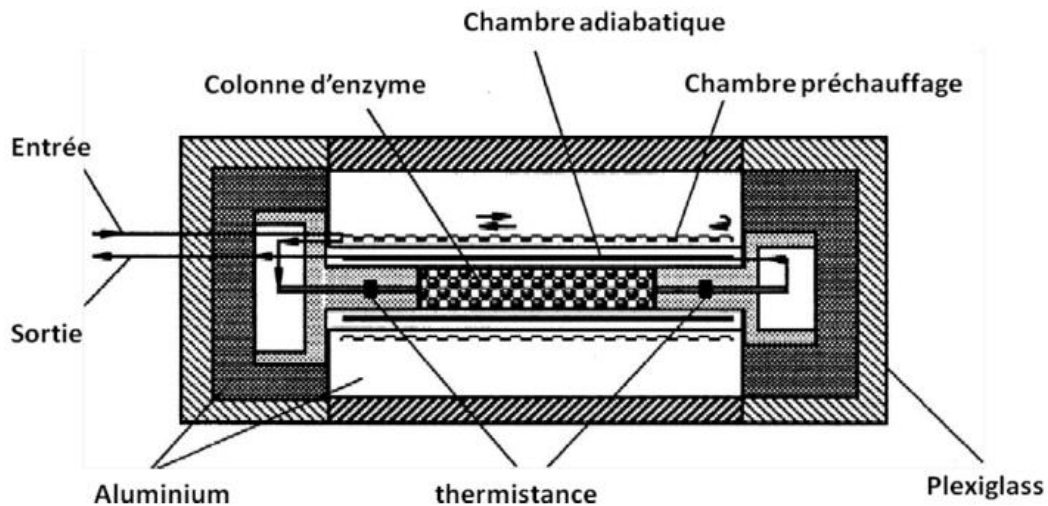


Figure. I. 5. Exemple d'un biocapteur thermique [23] (gamme de travail : de 0,5 à 16 mMol.L⁻¹).

IV. 2. 4. Biocapteurs optiques

Les capteurs optiques à enzymes, appelés parfois 'optodes' ou 'optrodes' par analogie avec les électrodes, sont en général des capteurs optochimiques qui exploitent la variation des propriétés optiques du milieu ou d'un récepteur immobilisé, en présence d'une grandeur chimique ou physico-chimique à mesurer (figure I-6).

De nombreuses techniques optiques ont été adaptées afin d'être utilisées pour l'élaboration de biocapteurs. Les principales méthodes sont : la mesure de l'absorbance, de la chemiluminescence, de la fluorescence, de la résonance plasmonique de surface ou encore de l'onde évanescente.

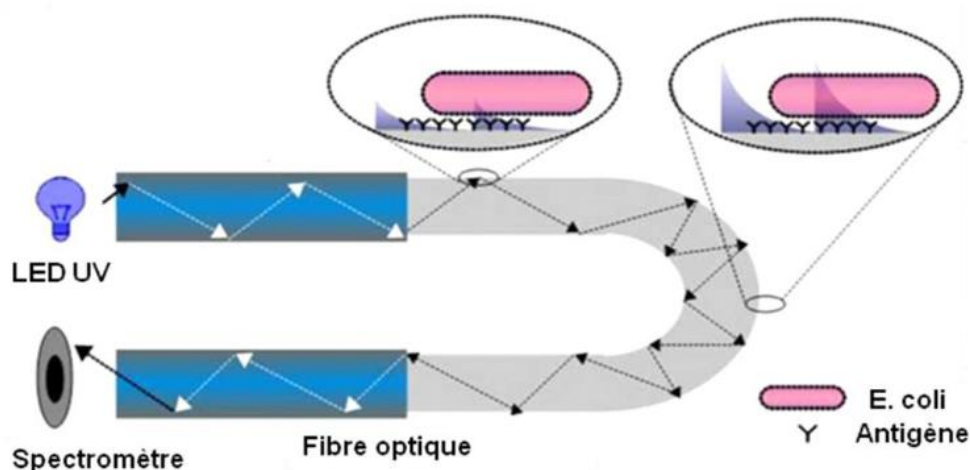


Figure. I. 6. Exemple d'un biocapteur à onde évanescente [24].

IV. 2. 5. Les capteurs ENFET

Les capteurs enzymatiques ENFET (Enzyme Field Effect Transistor) (figure I-7) sont construits à partir d'un capteur ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) sur lequel on accole une membrane enzymatique à la membrane sélective aux ions. Le produit de la réaction enzymatique choisie pour le dosage est détecté par l'ISFET.

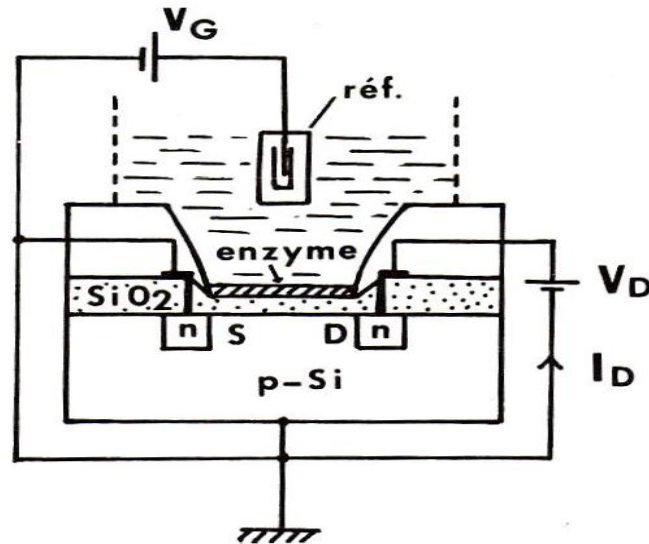


Figure. I. 7. Représentation schématique d'un capteur enzymatique à semi-conducteur (ENFET)

Il est à noter que l'ISFET est, en fait, un transistor MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) dont l'électrode de grille est remplacée par une combinaison d'une membrane sélective d'ions ISE (Ion Selective electrode) (figure I-8) dans une solution analytique et d'une électrode de référence. L'ISE peut être SiO_2 , Al_2O_3 , Si_3N_4 ou Ta_2O_5 .

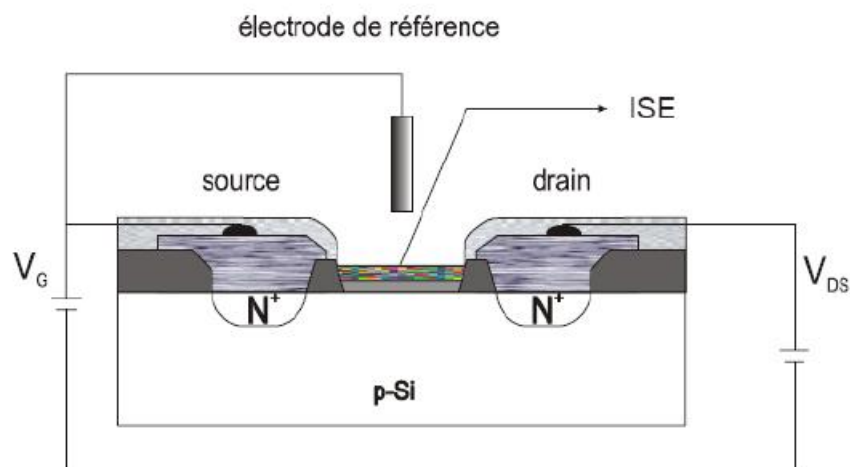


Figure. I. 8. Schéma d'un capteur ISFET

L'interaction entre l'ion à doser et le film mince change les propriétés de l'interface isolant électrolyte, d'où une modification de la tension de seuil et par la suite, du courant de drain.

IV. 2. 6. Biocapteurs électrochimiques

Les biocapteurs électrochimiques ont pour principe de transformer la réponse biochimique en signal électrique qui peut être amplifié et mesuré. Les biocapteurs électrochimiques ont pour principaux avantages leur simplicité, leur coût de revient relativement faible et leur rapidité de réponse. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité. En effet, quand le potentiel appliqué est élevé, si l'échantillon à analyser contient des substances électroactives contaminantes ou des protéines, celles-ci vont avoir tendance à s'agglomérer sur l'électrode. Ces biocapteurs peuvent être ampérométriques, potentiométriques ou conductimétriques.

IV. 2. 6. 1. Biocapteur conductimétrique

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie [25]. La conductimétrie permet de mesurer les variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions enzymatiques, figure (I-9).

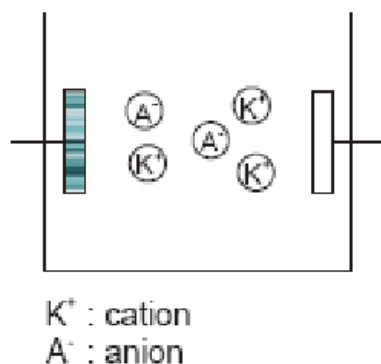


Figure. I. 9. Migration d'ions, résistance

La conductance d'un corps est donnée par l'équation (I-1)

$$G = \gamma \cdot \frac{A}{\lambda} \quad (\text{I-1})$$

La constante γ (en $\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) qui est la constante caractéristique d'un produit connu, est la conductance ou conductivité spécifique; A/λ (en cm) est la constante géométrique de la cellule; A est la surface de l'électrode et λ est la longueur de l'électrode.

La mesure de la conductance d'un électrolyte s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes dont la surface A et la longueur λ sont données. L'étalonnage ou le contrôle de la cellule sont effectués en mesurant sa conductance G_e pour un électrolyte de conductivité γ_e connue : $k = G_e/\gamma_e$. Lorsque l'on connaît la constante de conductivité de la cellule k , on peut déterminer la conductivité γ d'un électrolyte quelconque, en mesurant la conductance G de la cellule immergée dans cet électrolyte : $\gamma = G/k$.

IV. 2. 6. 2. Biocapteur potentiométrique

Le potentiomètre permet de mesurer l'accumulation de charge sur une électrode indicatrice (électrode de mesure), (figure I-10).

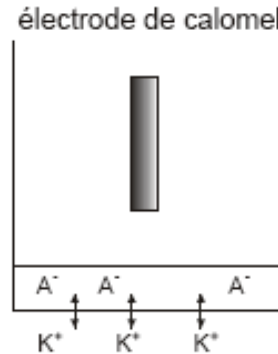


Figure. I. 10. Accumulation de charge, potentiel

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence (figure I-11). La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser [26].

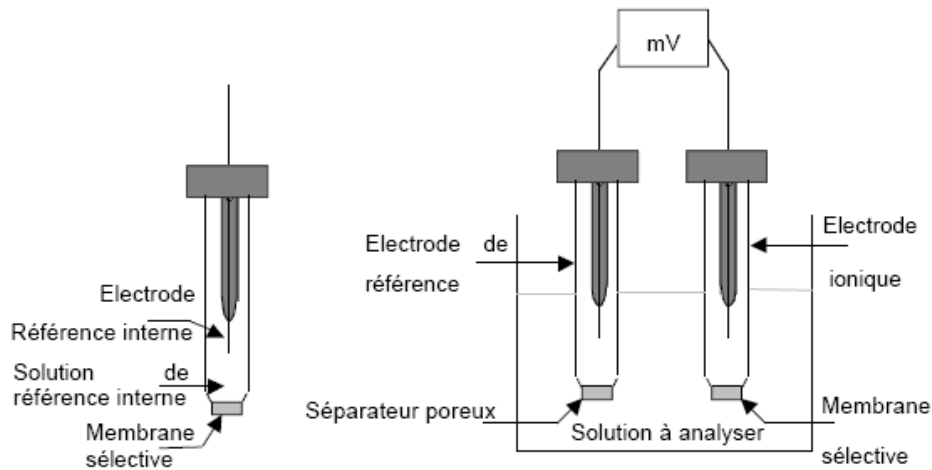


Figure. I. 11. Schéma d'une électrode ionique et de la chaîne de mesure.

Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration (activité) de l'échantillon selon le model Nernstien :

$$E_p = E_{ox/red}^0 + RT/nF * \ln a_{Ox}/a_{Red} \quad (I-2)$$

Où :

E_p : représente le potentiel du couple redox ;

$E_{ox/red}^0$: le potentiel normal standard du couple redox ;

R : la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) ;

$a_{\text{Ox}}/a_{\text{Red}}$: le rapport de l'activité de l'espèce déterminant le potentiel à l'état oxydé et à l'état réduit ;

T : la température absolue en Kelvin ;

F : constante de Faraday = $96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$.

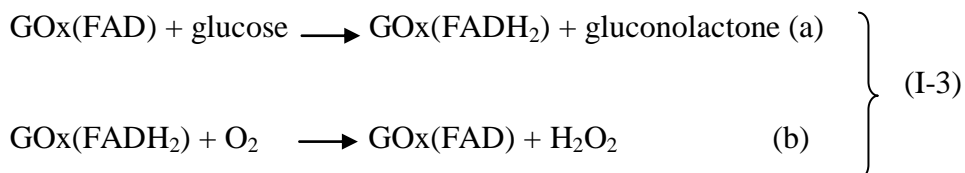
IV. 2. 6. 3. Biocapteurs ampérométriques

Les biocapteurs ampérométriques [27-29] font partie des dispositifs les plus répandus et les plus commercialisés. La biotechnologie analytique a débuté par ces biocapteurs suite aux travaux de Clark en 1956. Par la suite, un grand nombre de travaux ont été réalisés par différentes équipes. Ces dispositifs reposent sur la mesure du courant produit lors d'une réaction chimique. De ce fait, ce type de capteur nécessite un biorécepteur qui consomme ou produit une espèce électroactive. La détection d'un substrat en solution est alors réalisée *via* l'oxydation ou la réduction de cette espèce directement à la surface de l'électrode (potentiel constant et enregistrement de l'intensité).

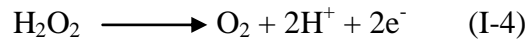
On distingue trois groupes de biocapteurs ampérométriques: les biocapteurs de première génération, les biocapteurs de deuxième génération et les biocapteurs de troisième génération

IV. 2. 6. 3. 1. Les biocapteurs de première génération

La première génération de biocapteurs ampérométriques (figure I-12) a été développée par Leland Clark [4]. Dans ces systèmes, l'analyte, obtenu suite à la réaction avec l'enzyme, est directement oxydé ou réduit au niveau de l'électrode. En prenant l'exemple d'un biocapteur à glucose utilisant la glucose oxydase comme enzyme (le biorécepteur), nous avons les réactions rédox suivantes (équations I-3-a et I-3-b).



Par la suite, ce principe a été amélioré et développé notamment par Updike et Hicks qui, en 1967, ont mis au point un système à deux électrodes à oxygène, dont une recouverte d'enzyme, ce qui permet de mesurer une différence de courant par rapport à l'électrode référence [6]. En 1973, Guilbault et Lubrano [30] ont finalisé une électrode enzymatique quantifiant le glucose par la mesure du courant résultant cette fois de l'oxydation du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction enzymatique, sur une anode polarisée, selon l'équation (I-4) :



Dans ce type de système, deux cas de figure se présentent donc. On peut mesurer soit la consommation de dioxygène (figure I-12. a) soit la production d'eau oxygénée (figure I-12. b).

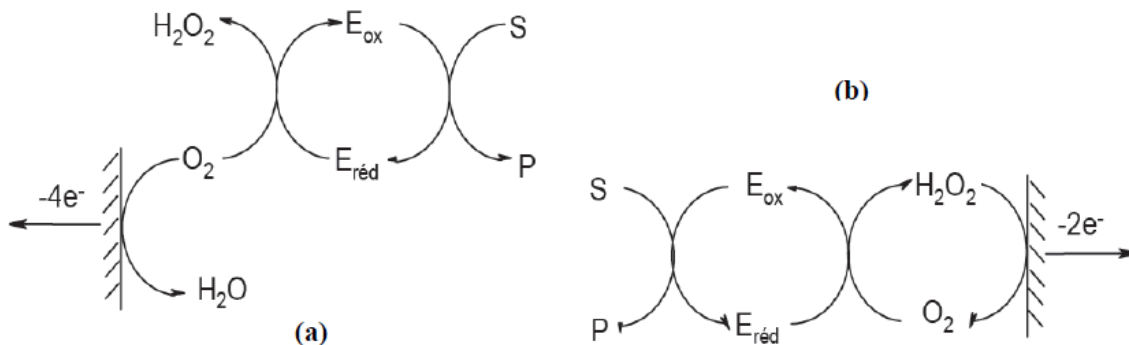


Figure. I. 12. Principe des biocapteurs ampérométriques de première génération pour la détection de la consommation de dioxygène (a) et la production de peroxyde d'hydrogène (b).

Quel que soit le mode de détection choisi des limitations existent. Effectivement, les biocapteurs à glucose, basés sur la détection de la consommation de dioxygène, sont assujettis aux fluctuations de la pression partielle en oxygène et à la limitation stoechiométrique d'oxygène (concentration en oxygène dissous bien inférieure à la concentration physiologique en glucose). De ce fait, la réponse de ces biocapteurs perd en linéarité vis-à-vis de la concentration de glucose dans le milieu.

De même les biocapteurs à glucose, basés sur la détection de la production de peroxyde d'hydrogène, présentent également des limitations. En effet, un grand nombre de substances « électroactives », telles l'acide ascorbique, l'acide urique, le glutathion ou encore les catécholamines présentes dans les organismes vivants, sont susceptibles d'être oxydées au potentiel d'oxydation du peroxyde d'hydrogène (+0,65V / ECS). De ce fait, cela va créer des interférences dans la réponse du biocapteur vis-à-vis du glucose rendant la mesure non sélective.

Bien d'autres pistes ont été proposées afin de s'affranchir de telles interférences, mais une nouvelle génération de biocapteurs ampérométriques a également été développée dans le but d'augmenter la sélectivité de l'électrode.

IV. 2. 6. 3. 2. Les biocapteurs de deuxième génération

La seconde génération de biocapteurs ampérométriques (figure I-13) est constituée de transducteurs qui utilisent d'autres espèces oxydantes, appelées médiateurs, comme transporteurs d'électrons entre l'électrode et le centre rédox de l'enzyme (équation I-5).

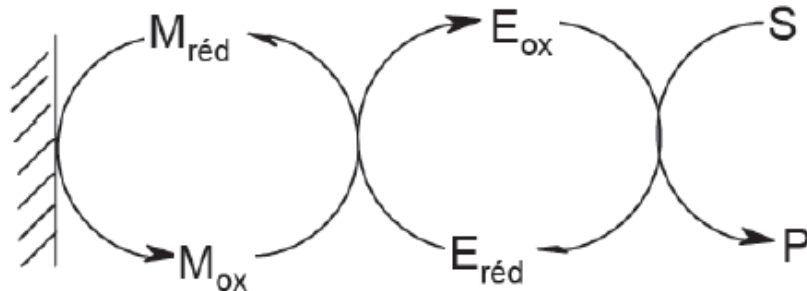
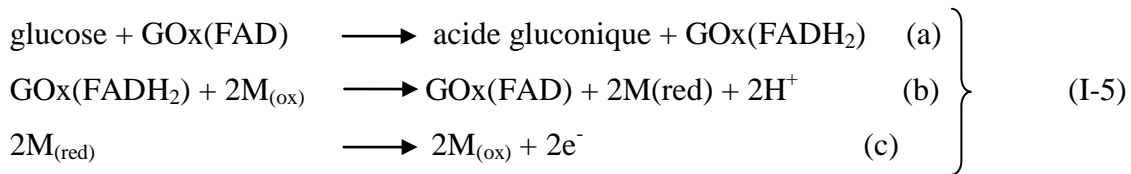


Figure. I. 13. Principe des biocapteurs ampérométriques de deuxième génération.

Par conséquent cette catalyse enzymatique mettant en jeu un troisième couple rédox ($\text{M}_{(\text{ox})} / \text{M}_{(\text{red})}$) permet de travailler à des potentiels plus faibles, ce qui diminue sensiblement l'influence de l'oxygène et les interférences dues aux substances contaminantes. Un grand nombre des espèces présentes naturellement dans les organismes vivants, ont un potentiel rédox faible et souvent inférieur à celui de l'oxygène. On comprend donc bien la nécessité d'abaisser le potentiel de travail des biocapteurs, en utilisant un médiateur (figure I-14), afin de s'affranchir des interférences dues à ces substances.

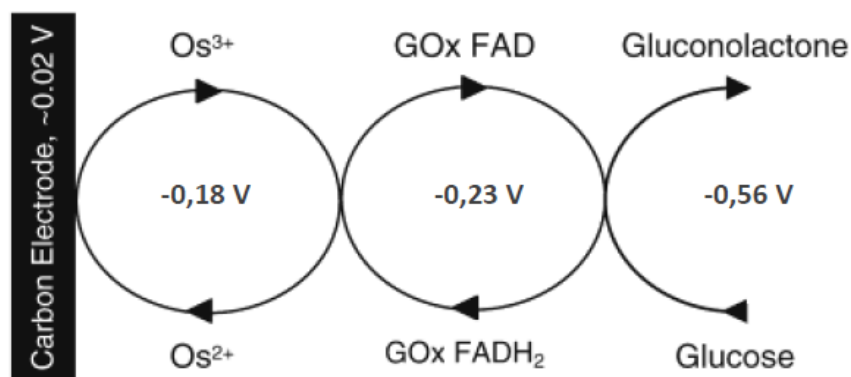


Figure. I. 14. Echelle des potentiels standards des couples redox mis en jeu dans une bioanode (/ Ag/AgCl) dédiée à l'oxydation du glucose.

Les médiateurs sont, en général, des espèces de faible poids moléculaire. Le cofacteur de l'enzyme lui-même peut être utilisé en tant que médiateur. Malheureusement celui-ci ne peut se régénérer spontanément à un potentiel convenable à l'anode.

Les médiateurs peuvent être utilisés soit en solution, soit de préférence en l'immobilisant à la surface de l'électrode. En solution, la mise en œuvre est plus facile mais n'est pas technologiquement viable en tant que biocapteur *in vivo*. En effet, certains médiateurs sont toxiques et les immobiliser permet de limiter leur impact sur l'organisme. De plus,

l'immobilisation du médiateur permet une utilisation sur la durée et donc baisse les coûts ce qui est un facteur non négligeable. Cependant, ces biocapteurs ampérométriques présentent l'inconvénient d'avoir une stabilité assez réduite. De plus, un certain nombre de critères doivent être respectés afin de sélectionner le médiateur :

- ✘ La tension appliquée ne doit pas dépasser le potentiel de réduction de l'oxygène.
- ✘ Le médiateur réduit ne doit pas réagir avec l'oxygène.
- ✘ Le transfert des électrons entre le médiateur et l'enzyme doit être très rapide.
- ✘ Le médiateur ne doit pas être influencé par le pH.
- ✘ Le médiateur doit être non toxique.

Ces systèmes sont donc soumis à un grand nombre de contraintes et donc une troisième génération de biocapteurs a été étudiée.

IV. 2. 6. 3. 3. Les biocapteurs de troisième génération

Dans la troisième génération de biocapteur, le principe est ici d'avoir un transfert d'électron direct entre l'enzyme et l'électrode *via* le site actif de l'enzyme (figure I-15). Ceci se fait tout en gardant une séparation spatiale minimale entre les deux sites (accepteur et donneur d'électrons).

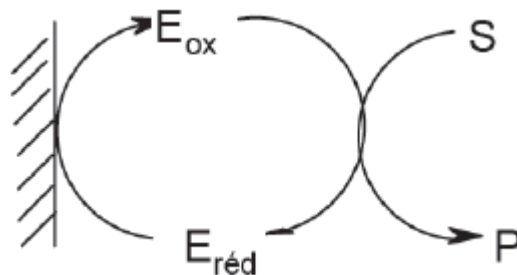


Figure. I. 15. Principe des biocapteurs ampérométriques de troisième génération.

Ces systèmes présentent l'avantage de limiter fortement les interférences que l'on peut rencontrer lors de dosage dans des milieux complexes [31], et ce du fait que le potentiel de travail est très bas, proche du potentiel rédox de l'enzyme. Cependant très peu d'enzymes permettent le transfert direct des électrons avec des électrodes dites conventionnelles. Cet état de fait fut à l'origine de la nécessité de développer de nouveaux matériaux d'électrode.

Les biocapteurs ampérométriques de troisième génération présentent théoriquement une bonne sélectivité et de ce fait possèdent un fort potentiel de développement. Néanmoins, très peu de biocapteurs ampérométriques de troisième génération le sont réellement. En effet, la plupart des technologies développées, hormis certaines à base de nanotubes de carbone qui

permettent une connexion intime avec le site actif de l'enzyme [32], nécessitent l'incorporation de médiateur dans le matériau d'électrode.

V. Techniques d'immobilisation des biomolécules

V. 1. Introduction

Un point essentiel pour la fabrication d'un biocapteur est le greffage des biomolécules actives (enzymes, anticorps, cellules, ou tissus...) sur la surface du transducteur. Différentes procédures d'immobilisation du biorécepteur ont été développées dans le but d'avoir une immobilisation efficace et stable des biomolécules actives sur la surface du transducteur, de maintenir complètement les propriétés biologiques des biomolécules actives et garantir une accessibilité et une réactivité maximales du biorécepteur [33- 35], la sélection d'une méthode d'immobilisation appropriée dépend de la nature de la molécule biologique, du type du transducteur utilisé, des propriétés physico-chimiques de l'analyte et des conditions opératoires du biocapteur [12]. Il existe plusieurs techniques d'immobilisation que l'on peut subdiviser en procédés physiques et en procédés chimiques (figure I-16).

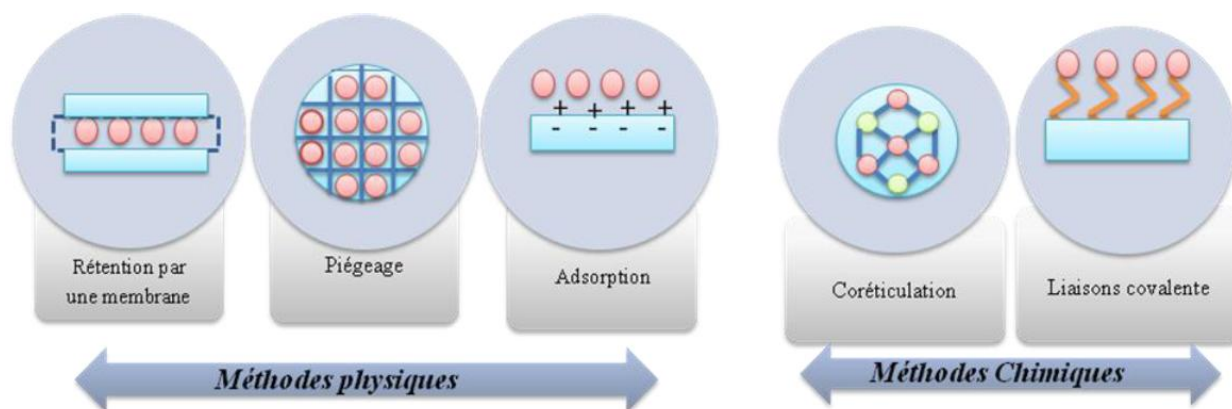


Figure. I. 16. Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'élément biologique.

Préalablement, l'immobilisation physique laisse le biorécepteur intact, mais la faiblesse de la liaison (forces de Van der Waals) peut entraîner une perte du biorécepteur et une sensibilité élevée aux paramètres physico-chimiques (t° , pH,...). Ce type de rétention exploite la grande différence de taille entre la molécule sonde et la cible, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir la molécule. Parmi les immobilisations qui appartiennent à cette catégorie on cite : l'immobilisation par adsorption qui est basé sur l'établissement d'interactions de faible énergie de type ionique, polaire ou hydrophobe ou encore des liaisons

hydrogènes et des forces Van der Waals, entre les groupes fonctionnels de la molécule active (biorécepteur) et la surface de support (le transducteur).

L'immobilisation par piégeage consiste à incorporer la molécule biologiquement active dans une matrice organique (polymères) ou inorganique (argiles). Nous trouvons aussi la rétention par une membrane qui consiste en une technique d'immobilisation connue sous le nom Langmuir-Blodget (LB). Elle repose sur l'adsorption de biomolécule sur une monocouche de tensio-actif, comme l'octodécylamine (ODA) grâce à la force électronique. On obtient un film LB dans lequel la biomolécule est emprisonnée entre deux couches d'ODA. Une fois déposé sur le transducteur, ces films sont traités avec des vapeurs de glutaraldehyde pour améliorer leur stabilité.

Tandis que l'immobilisation chimique implique la formation d'une liaison chimique entre la molécule active et un groupe réactif d'un agent d'immobilisation ou du support. La liaison se réalise, soit par création d'une vraie liaison covalente (fixation covalente sur support active) soit par coréticulation qui est basée sur l'interaction entre une protéine de charge (comme l'albumine) et un agent bifonctionnel, pour la formation d'un réseau [36]. L'immobilisation chimique présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée [37].

Le développement des biocapteurs réalisé dans ce travail se base sur le greffage des molécules par des liaisons covalentes. Ainsi, on s'intéresse, dans ce qui suit, à définir ce type de liaison.

V. 2. Greffage covalent

L'utilisation des liaisons covalentes permet d'obtenir une bonne stabilité de vie de la biomolécule active greffée sur l'électrode. Elle permet également d'avoir des fortes liaisons qui assurent une meilleure fixation de la biomolécule sur la surface du transducteur. Cette technique est basée sur la réaction entre un groupement fonctionnel de la molécule active et un groupement fonctionnel du support préalablement activé. Les groupements fonctionnels disponibles pour les enzymes ou les protéines proviennent des chaînes latérales des acides aminés, notamment les groupements ϵ -amine de la lysine, carboxyle de l'aspartate et du glutamate, sulfhydryles de la cystéine et hydroxyphénolique de la tyrosine. Des réactifs bifonctionnels, tels que le glutaraldéhyde et carbodiimide sont aussi très utilisés pour l'immobilisation des protéines. D'autres stratégies utilisent des interactions d'affinité spécifique entre les molécules préalablement fixées aux supports et les molécules sondes à immobiliser.

Pour assurer des liaisons covalentes, généralement, des surfaces métalliques telles que l'or et l'argent peuvent être fonctionnalisées avec des groupement amines, hydroxyles ou carboxyles en réagissant avec des aminoalcanethiols, hydroxyalcanethiols et carboxylalcanethiols simultanément.

Plus récemment, des électrodes métalliques sur lesquelles sont déposés, par voie électrochimique, des films de polymère conducteur fonctionnalisé permettent l'immobilisation des biomolécules actives par liaison covalente.

VI. Les applications des biocapteurs

Les biocapteurs font partie de l'instrumentation qui touche un grand nombre de secteurs d'activité industrielle, notamment le secteur médical en domaine hospitalier ou à domicile, le secteur agro-alimentaire pour le contrôle des processus de fabrication, le secteur de la protection de l'environnement et le secteur de la défense.

VI. 1. Le secteur biomédical

À l'heure actuelle, ce sont les capteurs enzymatiques les plus utilisés en raison de la spécificité du dosage et de la facilité de mise en œuvre. Les enzymes et les transducteurs correspondants sont aussi disponibles en général dans le commerce.

Dans le domaine médical, c'est l'électrode à glucose oxydase qui retient l'attention, à cause de l'intérêt qu'elle présente pour le dosage du glucose dans le sang et dans l'urine pour le diagnostic du diabète. Cependant, l'utilisation du biocapteur *in vivo* demande la résolution des problèmes de biocompatibilité. Outre l'électrode de glucose, d'autres biocapteurs sont capables de doser les métabolites en milieu biologique : l'électrode d'urée et de créatinine permet le contrôle de la fonction rénale, l'électrode de cholestérol pour le dépistage et la prévention de l'artériosclérose, l'électrode d'acétylcholine pour le suivi du neurotransmetteur en relation avec la transmission chimique au niveau des synapses et l'électrode de lactate pour l'évaluation de l'effort musculaire [38].

VI. 2. Le secteur agroalimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les applications des biocapteurs sont multiples, grâce à leur sensibilité aux produits biologiques. Les biocapteurs se prêtent au dosage des ingrédients, additifs alimentaires, contaminants ou toxines. L'utilisation de l'électrode de glucose permet

de déterminer la fraîcheur de la viande par la consommation du sucre par les microbes présents à la surface [39]. De même, il est possible d'avoir une indication de l'état de fraîcheur des poissons par un capteur sensible à l'hypoxanthine, à la lysine et à l'inosine 5 monophosphate [40, 41]

VI. 3. Le secteur environnemental

Afin de répondre aux nouvelles dispositions législatives concernant le contrôle des rejets de polluants, les biocapteurs présentent des avantages certains sur les techniques d'analyses chimiques conventionnelles même si elles sont extrêmement précises, n'en demeurent pas moins coûteuses et nécessitent une main d'œuvre qualifiée. Les biocapteurs sont, pour leur part, très sensibles et peuvent détecter de très faibles concentrations de toxiques [42].

Ils peuvent également opérer dans des matrices complexes directement prélevées dans le milieu naturel, les délais de réponse sont donc courts puisque la préparation des échantillons est rapide. Ceci permet alors d'envisager l'emploi de tels outils pour instrumenter des sites et obtenir des informations en continu et en temps réel quant à la présence de polluants. Depuis une vingtaine d'années, de nombreux biocapteurs destinés au contrôle environnemental ont été développés, et dans certains cas commercialisés, pour détecter les grandes familles de substances susceptibles de polluer les écosystèmes aquatiques.

VI. 3. 1. Les pesticides

Différents types de biocapteurs ont été développés afin de détecter les pesticides [42].

Un grand nombre de ces biocapteurs repose sur l'inhibition des enzymes cholinestérasés par des composés organophosphorés et carbamates et utilisent des capteurs électrochimiques comme transducteurs. Cremisini et al. (1995) proposent, par exemple, un capteur ampérométrique à acétylcholinestérase pour la détection de paraoxon dans la gamme 1 à 15ppb [43]. On trouve également des capteurs conductimétriques ou ISFET pour la détection de méthyl-parathion ou de méthyl-paraoxon avec des limites de détection (L_d) inférieures à 25 ppb [44, 45].

L'utilisation de systèmes FIA 11 (le système d'analyse par injection en flux continue) permet de se rapprocher de la configuration la plus adaptée aux mesures sur site et a été utilisée par Pogacnik et Franko (2001) pour étudier l'inhibition de cholinestérasés de différentes origines par du paraoxon (L_d inférieure à 0,5ppb) et du carbofuran (L_d inférieure à 5ppb) afin d'optimiser le choix du biorécepteur [46]. Quelques immunocapteurs ont également fait

l'objet de recherches. La plupart est basée sur des détections optiques et permet la mise en évidence d'atrazine, de s-triazines et de carbaryl [47].

Enfin, des capteurs à cellules entières sont apparus récemment et reposent généralement sur la mesure de l'activité photosynthétique de cellules algales perturbée en présence d'herbicides.

En mesurant la fluorescence chlorophyllienne, Frense et al. (1998) ont mis en évidence la présence d'atrazine jusqu'à 1ppb [48].

Les travaux menés par Védrine (2003) ont débouché sur la mise au point d'un biocapteur à cellules algales sensible à des concentrations inférieures à 0,25 ppb en atrazine, à 0,025ppb en diuron et isoproturon et à 0,5ppb en simazine [49].

D'autres auteurs se sont intéressés aux variations de la consommation d'O₂ ou de la production de CO₂ lors de la photosynthèse pour détecter la présence d'herbicides [50 - 52].

VI. 3. 2. Les métaux lourds

Pour la détection de métaux lourds, des enzymes purifiées ont permis la mise au point de biocapteurs adaptés pour la détection des métaux lourds notamment l'uréase [53, 54] et la phosphatase alcaline [55, 56].

Des biocapteurs optiques utilisant des algues *Chlorella vulgaris* comme biorécepteurs ont permis de suivre l'activité des phosphatases alcalines membranaires ainsi que leurs perturbations en présence de divers métaux lourds avec des limites de détection d'environ 10 ppb pour Cd²⁺ et Pb²⁺ [57].

D'autres capteurs basés sur la fluorescence chlorophyllienne d'algues immobilisées peuvent également servir à la détection du mercure et du cuivre comme l'ont montré Campanella et al. (2000) [51].

VI. 3. 3. Autres pollutions

Les phénols sont des molécules dont l'usage est très répandu (pesticides, plastiques, surfactants, médicaments...).

L'enzyme tyrosinase utilisant des dérivés phénoliques comme substrat a permis de développer de nombreux capteurs. Mai Anh et al. (2002) ont ainsi proposé des capteurs ISFET à tyrosinase pour la détection de phénol dans l'eau avec une limite de détection de 20 ppm pour le 4-chlorophénol [58]. De nombreux autres capteurs électrochimiques avec des limites de détection inférieures à 0,5ppb ont également fait l'objet d'études [42, 59].

Enfin, l'évaluation de la pollution organique globale peut être réalisée grâce à des biocapteurs basés sur la mesure de la DBO de bactéries immobilisées. La dégradation de molécules

organiques par les microorganismes s'accompagne en effet d'une augmentation de leur consommation en oxygène modifiant le signal mesuré par le capteur [12].

VII. Les biocapteurs enzymatiques

VII. 1. Définition et classification

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique et chirale [60]. Elles sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série *L* unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa.

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées.

Chaque classe est divisée en sous-classe et chaque sous-classe en sous-sous-classe. Un "numéro" de classification est associé à chaque enzyme et est appelé "EC number". Il se présente de la manière suivante : EC [numéro de la classe]. [numéro de la sous-classe]. [numéro de la sous-sous-classe].[numéro individuel de série dans la sous-sous classe].

Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en six grandes classes [61] : 1- les hydrolases ; 2- les oxydoréductases ; 3-les transférases ; 4-les lyases; 5-les isomérase et 6 –les liages.

1- *Oxydoréductases* (qui catalysent des réactions d'oxydoréduction)

Ce sont des enzymes qui transfèrent des électrons, seuls ou accompagnés de protons, d'un donneur à un accepteur, celui-ci peut être de l'oxygène

2- *Transférases* (qui catalysent le transfert de groupements fonctionnels)

Ce sont des enzymes (transaméthylase, transcétolase, etc.) qui catalysent le transfert d'un radical, d'un donneur à un accepteur.

3- *Hydrolases* (qui catalysent des réactions d'hydrolyse)

4- *Lyases* (qui catalysent des réactions d'addition sur une double liaison)

Ce sont des enzymes qui catalysent la formation d'une double liaison sur un substrat en déplaçant un groupe chimique. La double liaison peut s'établir entre deux atomes de carbone ou avec un atome différent : O, S, N, ou halogène...

- 5- *Isomérases* (qui catalysent des réactions d'isomérisation). Ce sont des enzymes qui catalysent des réarrangements intramoléculaires.
- 6- *Ligases* ou synthétases (formation des liaisons avec clivage de l'ATP).

VII. 2. La catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique repose sur les mêmes principes que les autres catalyses. Un catalyseur, ici l'enzyme, va permettre d'augmenter la vitesse d'une réaction et ce, sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci. Le catalyseur va permettre d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction et d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de réagir. En effet, l'état de transition se retrouve à une énergie inférieure, en présence d'enzyme, ce qui a pour résultat d'abaisser l'énergie d'activation comme illustré sur la figure I-17. a. Cette diminution de l'énergie d'activation augmente le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps comme on peut le voir sur la figure I-17. b. Ces phénomènes sont à mettre en relation avec les notions de Turn Over Number (TON) et Turn Over Frequency (TOF). Le TON représente le nombre de moles de substrat converties par le catalyseur. Le TOF peut être défini comme le nombre de moles de substrat converties par le catalyseur par unité de temps.

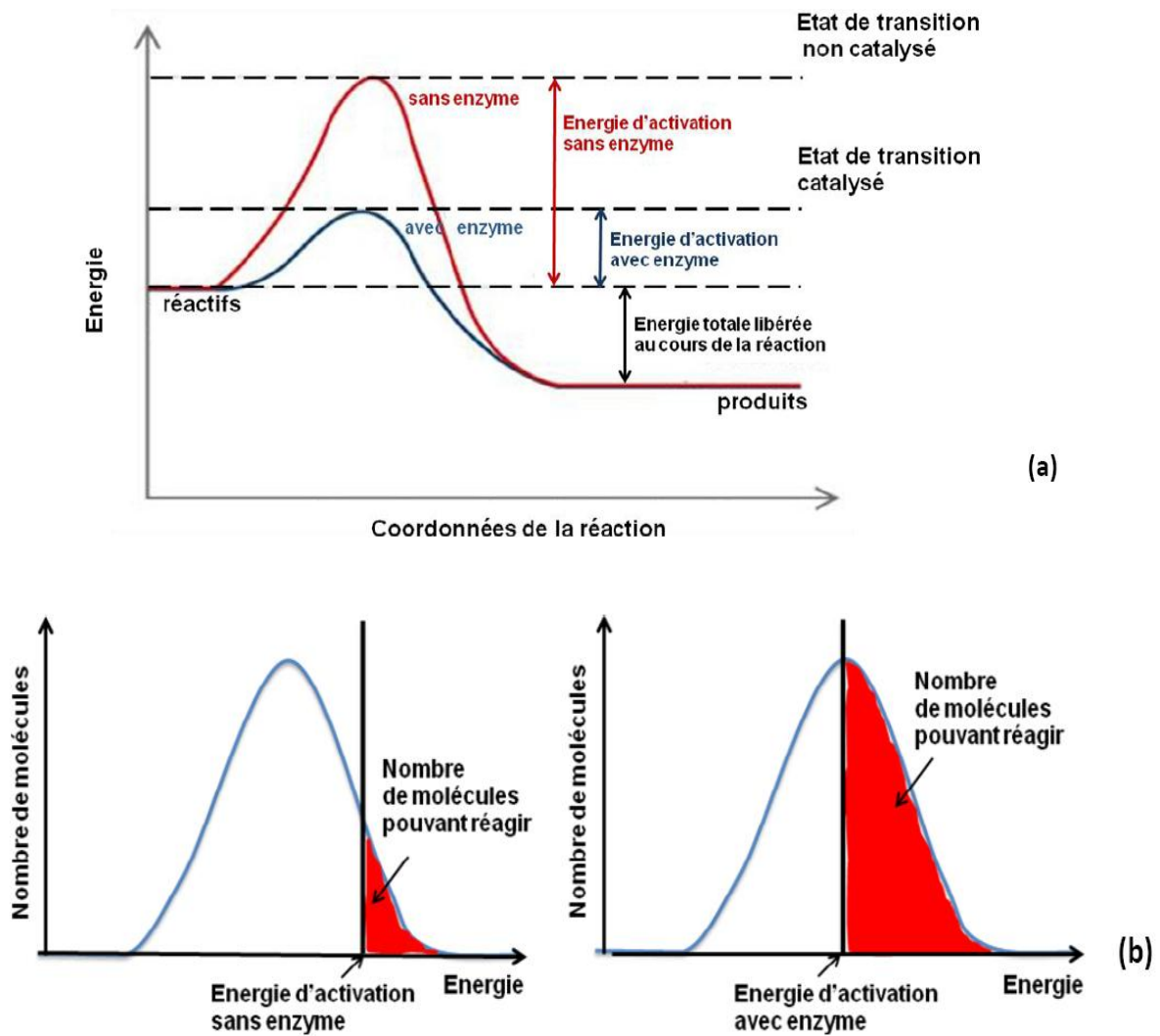


Figure I. 17. (a) Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme [60]. (b) Effet de la diminution de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules susceptibles de réagir [62].

Dans les faits, le substrat va se lier à l'enzyme et plus particulièrement au site actif de celle-ci afin de former un complexe intermédiaire enzyme-substrat [60]. Suite à la rupture de cette liaison, dont la durée de vie est limitée et bien définie, un produit va être formé (figure I-18).

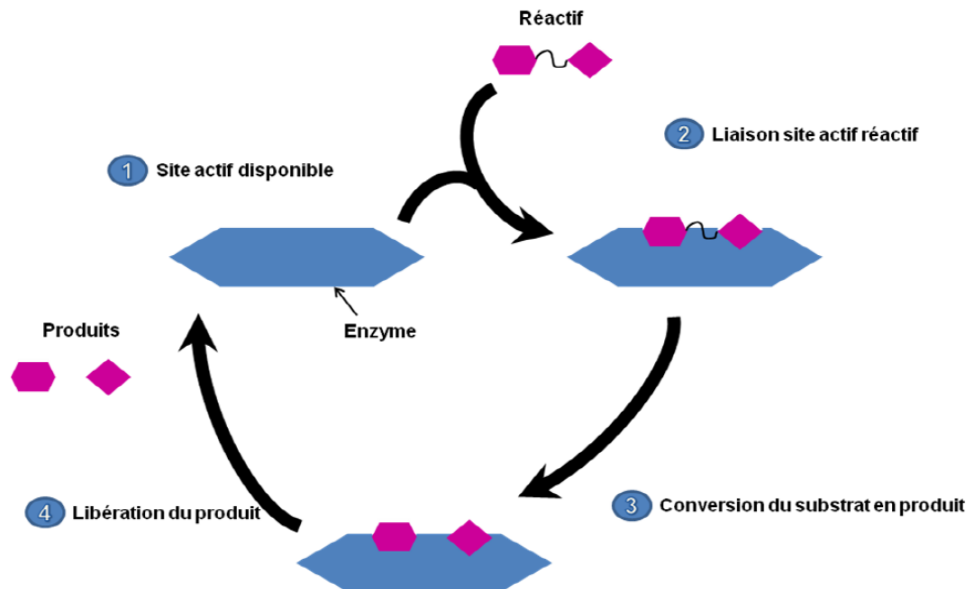


Figure. I. 18. Schéma du mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique (type protéase).

VII.3. Principe de fonctionnement d'un biocapteur enzymatique

Comme il est indiqué sur la figure (I-19), la surface sensible du transducteur est mise en contact avec la couche enzymatique. On suppose qu'il n'existe pas de transfert de masse à travers cette interface. La face externe de la couche enzymatique est trempée dans une solution contenant le substrat à doser. Ce substrat va migrer vers l'intérieur de cette couche et sera décomposé en produit de réaction dès qu'il entrera en contact avec l'enzyme immobilisée. Pour assurer une mise en équilibre rapides des concentrations, la membrane enzymatique doit être aussi fine que possible et la solution bien agitée pour assurer un apport constant en substrat. En résumé, les différentes étapes mises en jeu au cours du fonctionnement du capteur enzymatique sont :

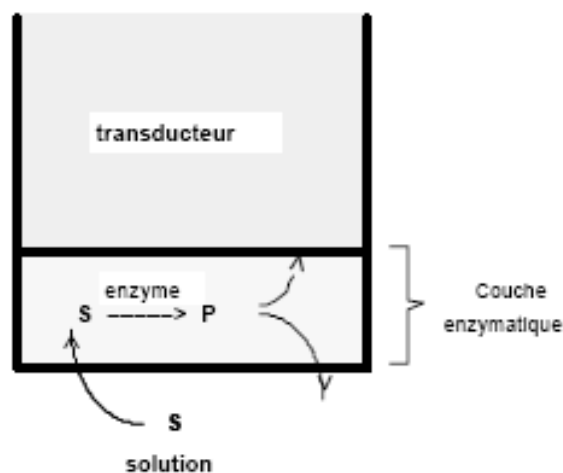


Figure. I. 19. Représentation schématique de la diffusion du substrat S et du produit P dans une couche enzymatique fixée sur un transducteur [12].

- 1) transport du substrat de la masse de la solution vers la couche enzymatique,
- 2) diffusion du substrat dans cette couche accompagnée de la transformation enzymatique du substrat en produit de réaction,
- 3) migration du produit vers le transducteur,
- 4) conversion de la concentration du produit à cette interface, par le transducteur, en signal électrique.

VII.4. Propriétés des enzymes immobilisées

L'immobilisation des enzymes conduit très souvent à un changement de leurs propriétés physiques, chimiques et cinétiques [63].

VII.4. 1. Stabilité

Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support.

VII.4. 2. Propriétés cinétiques

L'immobilisation des enzymes affecte beaucoup leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de la réaction enzymatique proprement dit, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale V_M et de la constante de Michaelis K_M de l'enzyme ; cette dernière constante pouvant avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons.

VII.4. 2. 1. Le modèle de Michaelis & Menten

VII.4. 2. 1. 1. L'équation de Michaelis & Menten

Les premiers à avoir proposé et développé une théorie en catalyse enzymatique en phase homogène, furent Leonor Michaelis et Maud Menten, en 1913 [64]. Ils proposèrent une équation, l'équation de Michaelis & Menten (équation 7), reposant sur l'hypothèse qu'un équilibre rapide entre les concentrations en enzyme, en substrat et en complexe enzyme-substrat s'établit au cours de la réaction catalysée. La concentration totale du substrat $[S]_0$ doit

être très supérieure en comparaison à celle de l'enzyme $[E]_0$ et les mesures de cinétique seront toujours faites pour des concentrations de produit très faible.



Où k_1 , k_{-1} et k_2 sont les constantes de vitesse

La vitesse V s'écrit sous la forme :

$$v = V_M \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{I-7})$$

Où $K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$, est la constante de Michaelis de l'enzyme

V_M est la vitesse maximale de la réaction enzymatique.

VII.4. 2. 1. 2. Les constantes cinétiques

➤ La vitesse maximale

La vitesse maximale est l'asymptote de la branche hyperbolique représentant l'équation de Michaëlis-Menten dans le modèle de Michaëlis-Menten. Cette branche hyperbolique est aussi appelée courbe de saturation de l'enzyme par le substrat (figure I-20) :

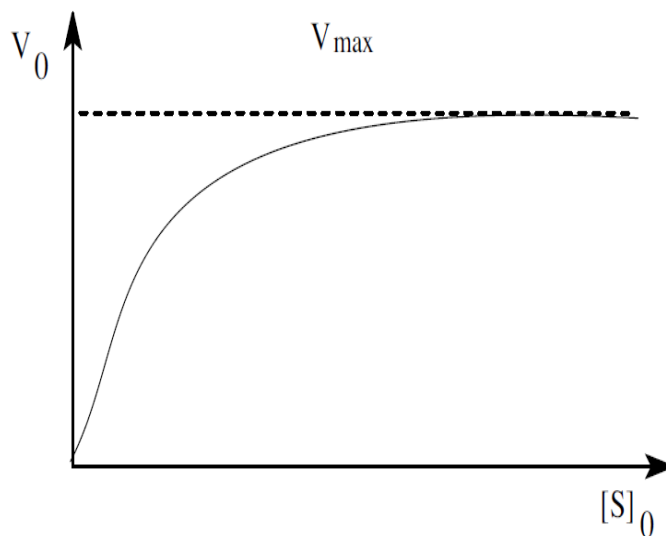


Figure. I. 20. Relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique (V) et la concentration initiale du substrat ($[S]_0$) pour une concentration en enzyme ($[E_0]$) donnée.

➤ **La constante catalytique**

La constante catalytique d'une enzyme, appelée k_{cat} , est une mesure de l'activité catalytique maximale de cette enzyme. Elle représente le nombre de molécules de substrat par unité de temps.

➤ **Constante de Michaelis**

La constante de Michaelis, appelée K_M , est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue avec la constante de Michaelis.

Elle peut être définie également comme la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale. Son unité est donc exprimée en mol.L^{-1} .

➤ **Constante de spécificité**

La constante catalytique et la constante de Michaelis, prises séparément, ne sont pas suffisantes pour caractériser une enzyme. En effet, une enzyme peut avoir une grande affinité vis-à-vis de son substrat (faible valeur de K_M) mais une efficacité catalytique faible (faible valeur de k_{cat}) et inversement. Le rapport entre ces deux constantes, $\frac{k_{cat}}{K_M}$, représente mieux la spécificité globale d'une enzyme par rapport à son substrat. Ce rapport est appelé efficacité catalytique.

VII.5. Paramètres affectant la réponse des capteurs enzymatique

VII. 5. 1. Effet du pH

La sensibilité au pH de la réponse d'un capteur est expliquée simplement par le fait que les substrats et les sites actifs des enzymes portent souvent des groupes fonctionnels acides ou basiques dont l'ionisation varie avec le pH. Ce dernier peut agir sur les paramètres cinétiques. Ces effets de pH et leur magnitude diffèrent d'une enzyme à l'autre [65] (figure I-21). Donc l'effet du pH relève de deux possibilités : d'une part l'activité enzymatique est fonction du pH, d'autre part le pH peut agir sur l'équilibre de dissociation du produit formé dont une forme seulement est détectable par le transducteur. Dans le cas où le pH intervient dans l'activité enzymatique, une perte de cette activité peut être compensée par l'augmentation de la charge enzymatique de la membrane.

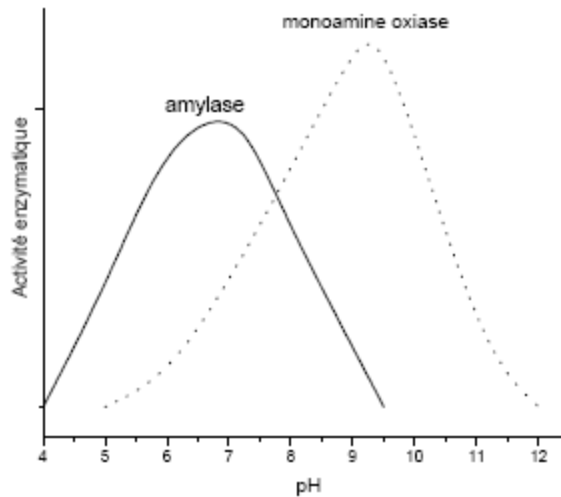


Figure. I. 21. L'effet de pH sur deux enzymes différentes.

VII. 5. 2. Effet de température

La vitesse des réactions chimiques augmente généralement avec la température en raison de l'énergie cinétique fournie aux molécules pour augmenter le nombre de collisions efficaces conduisant aux produits de réaction. Cependant, pour les enzymes dont la structure tertiaire, très ordonnée et complexe, est nécessaire à la fixation stéréospécifique du substrat, l'élévation de la température peut détruire cette structure conduisant à la perte d'activité enzymatique.

L'activation par la température d'une réaction enzymatique s'accompagne toujours du phénomène de dénaturation thermique irréversible. Il existe une température optimale qui permet d'obtenir une vitesse constante pendant toute la durée de l'expérience. Il en résulte l'existence d'une température critique T_c , au-delà de laquelle il se produit le phénomène de dénaturation.

La température augmente également la vitesse de diffusion des différentes espèces chimiques dans la couche active, ce qui améliore le temps de réponse.

Lorsque la charge enzymatique de la membrane active est élevée, la concentration du produit formé au contact du transducteur est pratiquement la même que celle du substrat dans la solution à doser. Dans ce cas, une augmentation de l'activité enzymatique par élévation de température a peu d'influence sur la réponse du capteur [12].

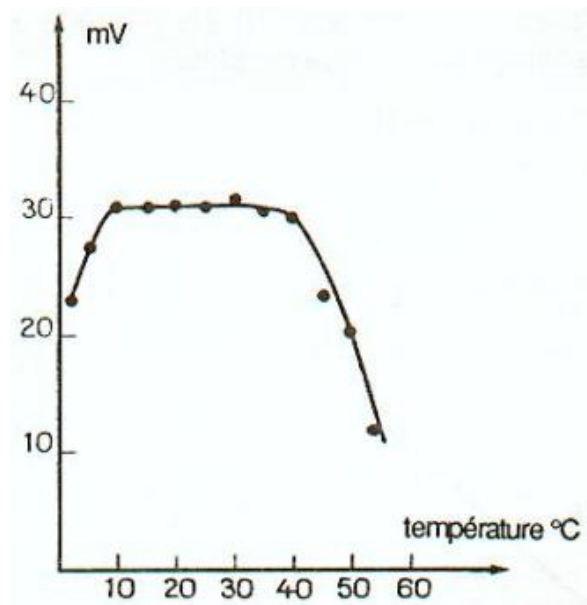


Figure. I. 22. Réponse de l'électrode à AChE vis-à-vis de l'acétylcholine (10^{-2} M) en fonction de la température.

Sur la figure (I-22), on peut remarquer que la réponse du capteur est peu affectée par des variations de la température lorsque celle-ci reste comprise entre 10 et 40°C [3]. Au-delà de 40°C, la diminution de l'activité enzymatique correspond à la dénaturation de l'enzyme. Au-dessous de 10°C, l'activité apparente de la couche enzymatique diminue, entraînant une baisse de la réponse du capteur. Dans la pratique, il est conseillé de travailler à 30°C environ, soit à 10°C au-dessous de la température optimale utilisable, afin de limiter les phénomènes de dénaturation et de prolonger ainsi la durée de vie du capteur.

VII. 5. 3. Effet de force ionique

L'influence de la force ionique sur la vitesse d'une réaction enzymatique provient de la nature des sels choisis pour effectuer les solutions tampons. En effet, une même enzyme peut avoir une activité plus grande en milieu tampon citrate qu'en milieu tampon acétate au même pH. La différence vient du fait que le citrate chélate les ions métalliques présents qui pourraient inhiber l'enzyme. La présence des sels peut aussi affecter la vitesse d'une réaction enzymatique, soit par déplacement de l'équilibre de formation du complexe activé, soit par leur combinaison avec les réactants. Pour obtenir des résultats reproductibles, la force ionique du système ne doit pas varier de façon appréciable.

VII. 5. 4. Effet des interférences

Un composé est interférent lorsque sa présence modifie la réponse du capteur vis-à-vis de l'échantillon à doser. Il y a trois types d'interférents selon qu'ils agissent sur le transducteur de base, sur l'activité de l'enzyme ou sur les composés mis en jeu dans la réaction enzymatique.

VII. 5. 4. 1. Interférence sur le transducteur de base

Quelle que soit sa nature, le transducteur n'est jamais parfaitement spécifique à un produit, mais plutôt sélectif, ce qui le rend également sensible à d'autres substances. Ainsi, une électrode à cations monovalents, utilisée pour détecter NH_4^+ dans l'électrode à uréase [66, 67], est également sensible à Li^+ , Na^+ , K^+ et H^+ .

VII. 5. 4.2. Interférence sur l'activité de l'enzyme

Certains composés peuvent augmenter ou diminuer l'activité de l'enzyme : ce sont respectivement des activateurs ou des inhibiteurs. Lorsque le dosage du substrat s'effectue en présence des inhibiteurs, il est possible de lever l'inhibition en augmentant la charge enzymatique de la membrane

Ce phénomène s'explique aisément par l'observation des profils de concentration du substrat S et du produit P dans la couche fixée sur le transducteur (figure I-23). Lorsque la couche immobilisée possède une faible activité enzymatique (a), la concentration du substrat décrit au fur et à mesure de sa diffusion vers le transducteur ou elle est égale à $[\text{S}]_e$. Dans ce cas, la réaction enzymatique a lieu sur toute l'épaisseur de la couche active et la concentration du produit, au contact du transducteur, reste toujours inférieure à la concentration du substrat dans le milieu échantillon ($[\text{P}]_e < [\text{S}]_0$). À l'état stationnaire, ou $[\text{S}] + [\text{P}] = [\text{S}]_0$ en tout point de la couche active, toutes les molécules enzymatiques participent à la réaction dont la vitesse est traduite par la valeur de la concentration du produit $[\text{P}]_e$ à la surface du transducteur.

Lorsque la couche immobilisée possède une forte activité enzymatique (b), la vitesse de conversion du substrat est si rapide que cette réaction n'a lieu que dans une partie de la couche active, l'autre partie appelée « zone morte » n'est pas utilisée car la concentration du substrat y est nulle. La zone morte est limitée par une « frontière libre », dont la position varie avec l'activité de l'enzyme immobilisée. Dans cette partie de la couche, la concentration du produit atteint sa valeur maximale $[\text{S}]_0$ correspondant à la concentration du substrat dans le milieu échantillon. En conséquence, aucune variation de l'activité enzymatique en présence d'un activateur ou d'un inhibiteur ne peut être détectée puisque $[\text{P}]_e = [\text{S}]_0 = \text{constante}$.

On voit ainsi que l'interférence par ces composés peut être levée en augmentant la charge enzymatique de la couche active [68, 69].

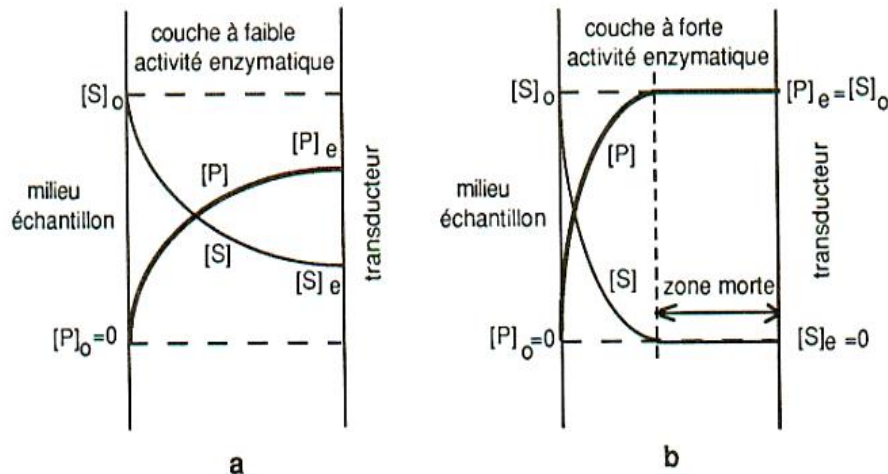


Figure. I. 23. Profils de concentration du substrat et du produit dans une couche à faible activité enzymatique (a) et une couche à forte activité enzymatique fixées sur un transducteur(b).

L'interférence sur l'activité enzymatique peut également provenir du non spécificité des enzymes. La non spécificité d'une préparation enzymatique peut aussi être dû à une contamination par d'autres protéines enzymatiques pouvant engendrer une sensibilité du capteur vis-à-vis d'autres espèces. Une purification de l'enzyme permet de résoudre ce type d'interférence.

VII. 5. 4. 3. Interférence sur les composés de la réaction

Lorsqu'un composé réagit avec un substrat ou un produit de la réaction, il peut apporter une erreur dans le dosage du substrat, en conséquence, la réponse du capteur est affectée.

Références

- [1] **N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, P. Clechet**, Techniques de l'Ingénieur, Doc. R 420, 360.
- [2] **B. Torbiero**, Thèse de doctorat, Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS De Toulouse, 21 novembre (2006).
- [3] **Anh Tuan Mai**. Thèse de doctorat, L'université Claude Bernard, Lyon. N° d'ordre : 194-2004, (2004).
- [4] **L. C. Clark**, Monitoring and control of blood and tissue O₂ tensions. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, **2** (1956), 41-48
- [5] **L. C. Clark, C. Lyons**, Ann. Ny Acad. Sci, 102, (1962), 29.
- [6] **S. J. Updike, G. P. Hicks**, Nature, 214, (1967), 986.
- [7] **G. G. Guilbault, J. G. Montalvo**, J. Am. Chem. Soc, 91, (1969), 2164.
- [8] **C. Diviès**, Ann. Microbiol. 126, (1975), 175.
- [9] **A. H. Clemens, P. H. Chang, R. W. Myers**, Journ. Annu. Diabetol. Hôtel-Dieu, (1976), 269.
- [10] **A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. Allen, O. Hill**, Anal. Chem, 56, (1984), 667.
- [11] **B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström**, Sens. Actuators, 4, (1983), 299.
- [12] **C. Tran-Minh**, Les biocapteurs. Principes, construction et applications. Paris, Masson. (1991).
- [13] **E. A. H. Hall**, Biosensors, Open University Press, Buckingham, (1990).
- [14] **M. Delvaux, S. Demoustier-Champagne**, Biosensors and Bioelectronics 18, (2003), 943.
- [15] **J. J. Pancrazio, J. P. Whelan, D. A. Borkholder, W. Ma and D. A. Stenger**, Annals of Biomedical Engineering 27, (1999), 697.
- [16] **B. R. Eggins, C. Hickey, S. A. Toft and D. M. Zhou**, Analytica Chimica Acta, 347, (1997), 281.
- [17] **R. Rizzuto, P. Pinton, M. Brini, A. Chiesa, L. Filippin, T. Pozzan**, Cell Calcium 26, (1999), 193.
- [18] **P. Blinder**, Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 5, (1990), 23.
- [19] **R. M. Buch, G. A. Rechnitz**, Biosensors, 4, (1989), 215.
- [20] **D. M. Jenkins, M. J. Delwiche**, Biosensors and Bioelectronics 18, (2003), 101.
- [21] **K. Bizet, C. Gabrielli, H. Perrot, J. Thérasse**, Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 10 (1995), 205.
- [22] **K. Ramanathan, B. Danielsson**, Biosensors and Bioelectronics, 16, (2001), 417.
- [23] **U. Harborn, B. Xie, R. Venkatesh, B. Danielsson**, Clinica Chimica Acta, 267, (1997), 225.
- [24] **R. Bharadwaj, V.V.R. Sai, K. Thakare, A. Dhawangale, T. Kundu, S. Titus, P.K. Verma, S. Mukherji**, Biosensors and Bioelectronics, 26, (2011), 3367.
- [25] **A. J. Bard, L.R. Faulkner**, Electrochemical Methods, J. Willey & Sons, (1980).
- [26] **A. J. Killard, M. R. Smyth**, Creatinine biosensors: principles and designs, reviews, (2000).
- [27] **Q. Chi, S. Dong**, Analytica Chimica Acta, 310, (1995), 429.
- [28] **S. Wolfgang**, Biosensors and Bioelectronics, 10, (1995), 181.
- [29] **Z.B. Zhang, S.J. Yuan, X.L. Zhu, K.G. Neoh, E.T. Kang**, Biosensors and Bioelectronics, 25, (2010), 1102.
- [30] **G.G. Guilbault, G.J. Lubrano**, Analytica Chimica Acta, 64, (1973), 439.
- [31] **W. Schuhmann, C. Kranz, J. Huber, H. Wohlschlager**, Synth. Met, 61, (1993), 31.
- [32] **S. Xu, X. Zhang, T. Wan, C. Zhang**, Microchimica Acta, 172, (2011), 199.

- [33] **A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson**, (Eds.), *Biosensors, fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford, (1987).
- [34] **G. G. Guilbault**, *Handbook of immobilized enzymes*. Marcel Dekker, New York, (1984).
- [35] **L. J. Blum, P. R. Coulet**, (Eds.), *Biosensors principles and applications*, Marcel Dekker, New York, (1991).
- [36] **Y. G. Li, Y. X. Zhou, J. L. Freng, Z. H. Jiang, L. R. Ma**, *Analytica Chimica Acta*, 382, (1999), 277.
- [37] **H. H. We, and all**, *immobilized enzymes*, *Anal chem*, 46, (1974), 602-.
- [38] **M. Mascini, G. Palleschi**, *Selective Electrode Reviews*, 11, (1989), 191.
- [39] **K. Rogers, E. J. D'costa**, *Biosensors for the food industry*. IUPAC Congress-Manchester, (1985).
- [40] **I. Karube, H. Matsuoka, S. Suzuki, E. Watanabe, K. Toyama**, *J. Agric. Food Chem*, 32, (1984), 314.
- [41] **E. Watanabe, H. Endo, K. Toyama**, *Appl. Microb. Biotechnol*, 29, (1988), 341.
- [42] **M. J. Dennison, A.P.F. Turner**, *Biotechnology Advances*, 13, (1995), 1.
- [43] **C. Cremisini, S. Di Sario, J. Mela, and al**, *Analytica Chimica Acta*, 311, (1995), 273.
- [44] **S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, J. M. Chovelon**, *Analytica Chimica Acta*, 459, (2002), 33.
- [45] **N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, P. Clechet, and al**, *Sensors and Materials*, 8, (1996), 161.
- [46] **L. Pogacnik, M. Franko**, *Talanta*, 54, (2001), 631.
- [47] **M. A. Gonzalez-Martinez, R. Puchades, A. Maquieira**, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, (1999), 204.
- [48] **D. Freuse, A. Muller, D. Beckmann**, *Sensors and Actuators B*, 51, (1998), 256.
- [49] **C. Védrine, J. C. Leclerc, C. Durrieu, and al**, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, (2003), 457.
- [50] **D. Schubnell, M. Lehmann, W. Baumann, and al**, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, (1999), 465.
- [51] **L. Campanella, F. Cubadda, M. P. Sammartino, and al**, *Water Resources*, 35, (2000), 69.
- [52] **P. Pandard, P. Vasseur, D. M. Rawson**, *Water Resources*, 27, (1993), 427.
- [53] **G. A. Zhylyak, S. V. Dzyadevych, Y. I. Korpan, and al**, *Sensors and Actuators B*, 24-25, (1995), 145.
- [54] **C. H. Tsai, R. A. Doong, H. C. Chiang, and al**, *Analytica Chimica Acta*, 481, (2003), 75.
- [55] **J. Marcos, A. Townshend**, *Analytica Chimica Acta*, 299, (1994), 129.
- [56] **S. Kamtekar, R. Pande, M. S. Ayyagari, and al**, *Materials Science and Engineering*, 3, (1995).
- [57] **C. Durrieu, C. Tran Minh**, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51, (2002), 206.
- [58] **T. Mai-Anh, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, and al**, *Talanta*, 56, (2002), 627.
- [59] **S. Cosnier, J. J. Fombon, P. Labbé, and al**, *Sensors and Actuators B*, 59, (1999), 134.
- [60] **D. Voet, J. G. Voet**, *Biochimie*, De Boeck Université, Bruxelles, (1998),
- [61] **M. Dixon, and E. Webb**. *Enzymes*. London, Longman Group Limited. (1971).
- [62] **L. Stryer**, *la biochimie*, Flammarion médecine sciences, Paris, (1958).
- [63] **Pure and A ppl. Chem.** Commission on analytical nomenclature, *Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes*, 48, (1976), 127.
- [64] **L. Michaelis, M. L. Menten**, *Biochem. Z*, 49, (1913), 333.
- [65] **C. Tran- Minh, G. Broun**, *C. R. Acad. Sci. Paris. Se. D*, 276, (1973), 2215.
- [66] **S. Fabiano**, Thèse de doctorat, N° d'ordre : 54-2002, (2002).
- [67] **C. Tran-Minh, R. Guyonnet, J. Beaux**, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. C*, 286, (1978), 115.
- [68] **C. Tran-Minh, E. Selegny, G. Broun**, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. C*, 275, (1972), 309.
- [69] **C. Tran-Minh, G. Broun**, *Anal. Chem*, 47, (1975), 1359.

CHAPITRE. II. LE SILICIUM POREUX

Introduction

Le silicium poreux a été découvert en 1956 par Uhlirs, lors d'une étude d'électropolissage du silicium dans une solution d'acide fluorhydrique (HF) [1]. Ce matériau constitué de silicium et du vide, a été utilisé pendant plusieurs années comme isolant dans les composants des circuits électriques [2, 3]. Mais grâce à la découverte de sa photoluminescence à température ambiante en 1990 par Canham ensuite par Lehman et Gösele, le silicium poreux attira l'attention du monde scientifique. La photoluminescence a été alors explorée dans toute la gamme du spectre visible [4]. L'étude des propriétés physiques de ce matériau par Vial et Derrien, a conduit à utiliser ce matériaux dans de nombreuses applications comme matériau photo luminescent [5, 6]. Il a servi aussi dans le domaine photovoltaïque pour la réalisation de couches anti-reflet [7] ou comme couches sacrificielles comme le proposent Bergman [8] et Tayanaka [9]. Ainsi, en raison de sa grande surface spécifique, sa bonne compatibilité avec les milieux biologiques, sa réactivité et sa capacité de transférer les électrons entre stimulus et partie sensible, le silicium poreux a constitué un candidat puissant pour la réalisation des capteurs optiques, chimiques et les capteurs biologiques connus couramment sous le nom de biocapteurs [10-12].

PARTIE. I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE
SUR LE SILICIUM POREUX

Dans cette première partie, nous commençons en premier lieu à décrire le mécanisme de formation du silicium poreux par anodisation électrochimique, ses principales propriétés et l'influence des conditions expérimentales sur ses caractéristiques. Ensuite, nous exposons une revue bibliographique sur les différentes applications du silicium poreux et particulièrement son application pour la réalisation des capteurs et des biocapteurs.

I. Formation de SiP par anodisation électrochimique

Les trois grandes méthodes d'élaboration du silicium poreux sont : la structuration surfacique par plasma pour la voie dite « sèche » ou « spark etching » [13], la dissolution chimique ou « stain etching » [14] et l'anodisation électrochimique [15, 16].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'anodisation électrochimique comme procédé d'élaboration du silicium poreux. Cette méthode contrairement aux deux premières, présente l'avantage d'obtenir des couches épaisses de silicium poreux et l'accès à un large éventail de morphologies.

Les nanostructures du silicium poreux se forment par dissolution électrochimique du silicium dans une solution à base d'acide fluorhydrique (HF). La dissolution peut être effectuée, soit à courant constant, soit à tension constante [17]. L'anodisation à courant constant est souvent préférée car elle permet de mieux contrôler la porosité et l'épaisseur de la couche et assure une meilleure reproductibilité de la morphologie des couches formées.

I. 1. Mécanisme de dissolution du silicium

A ce jour, le mécanisme de dissolution du silicium dans l'acide fluorhydrique reste un sujet de discussion. Plusieurs modèles ont été proposés. Le modèle le plus cité est celui présenté par Lehman et Gösele en 1991 [16]. Ce mécanisme de dissolution de silicium de type p est détaillé dans la figure (II-1).

La surface de silicium immergée dans l'acide fluorhydrique est initialement bien passivée par de l'hydrogène (Figure II-1-a). Les liaisons Si-H sont légèrement polarisées. La surface de Si reste inerte à l'attaque des ions fluor F^- en l'absence de courant. Si un trou injecté de l'anode atteint la surface (figure II-1-b), il polarise la liaison Si-H et rend possible la substitution de cette liaison fragilisée par une liaison Si-F. Cette liaison polarise à son tour la liaison Si-H adjacente et permet la création d'une seconde liaison Si-F avec libération de dihydrogène H_2 et d'un électron (figure II-1-c). Comme les liaisons Si-F sont plus fortement polarisées que

les liaisons Si-Si, une molécule SiF_4 se libère sous l'attaque du complexe par HF ou H_2O . (Figure II-1-d). La surface résultante est ensuite passivée de nouveau par des atomes d'hydrogène.

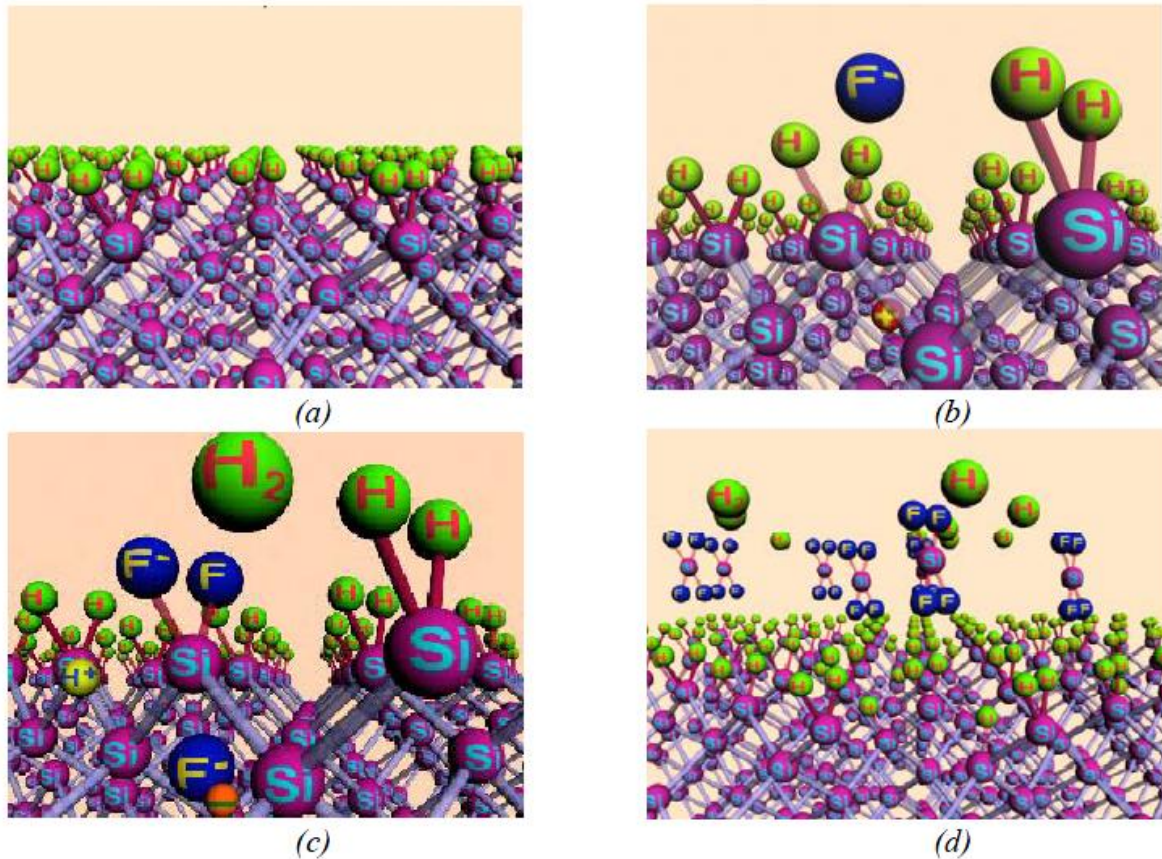


Figure. II. 1. Illustration du mécanisme de dissolution du Si de type p dans l'acide fluorhydrique [16]

I. 2. Les trois régimes d'anodisation électrochimiques

La caractéristique I-V de la jonction « semi-conducteur – électrolyte » dépend de la nature du substrat semi-conducteur ainsi que des espèces ioniques et moléculaires présentes dans l'électrolyte. La densité de courant dans une électrode semi-conductrice est limitée par la cinétique de réaction sur l'interface « semi-conducteur – électrolyte » ou par la diffusion des porteurs de charge dans l'électrolyte.

La caractéristique I-V typique de Si poreux est présentée sur la figure (II-2).

Il existe trois zones qui caractérisent le processus d'anodisation : la zone de porosification, la zone d'électro-polissage et la zone de transition.

La formation des pores a lieu pour les tensions $0 < V < V_{ps}$, V_{ps} étant la tension qui correspond au pic de densité de courant J_{ps} . Ce pic est aussi souvent appelé « le pic d'électropolissage ». La densité de courant J_{ps} dépend principalement de la composition de l'électrolyte et faiblement du substrat [18]. Pour les tensions $V > V_{ps}$ l'effet de l'électropolissage a lieu. On

remarque l'existence d'une zone de transition, qui résulte de la compétition entre la formation des pores et l'électropolissage.

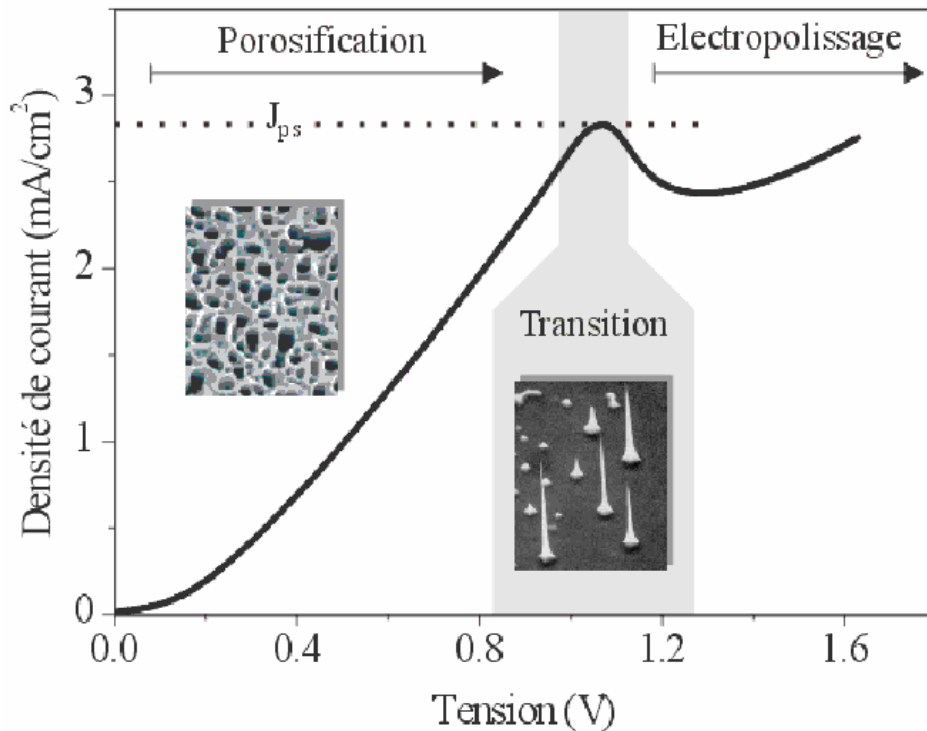


Figure. II. 2. Caractéristique I-V typique de l'anodisation électrochimique de Si

I. 3. Les paramètres d'anodisation électrochimique

Les caractéristiques morphologiques du silicium poreux telles que la porosité, la taille des pores et des cristallites ou encore l'épaisseur de la couche poreuse, sont contrôlées par les paramètres d'anodisation. La nature du substrat (type, niveau de dopage, orientation cristalline), la densité de courant, la composition de l'électrolyte ou encore l'illumination sont les principaux paramètres qui influencent la gravure électrochimique du silicium.

I. 3. 1. Nature du substrat et condition d'éclairement

Les différents types de morphologie du silicium poreux sont contrôlés et classifiés selon le type de dopage et la résistivité du substrat mais aussi selon les conditions d'illumination. L'anodisation du silicium dopé p, dont la résistivité est supérieure ou égale à $1\Omega.cm$, génère un réseau de nanocristallites interconnectées de manière aléatoire dont le diamètre est compris entre 1 et 5 nm. Les pores sont de taille comparable à celle des nanocristallites. On obtient ainsi du silicium nano-poreux [19].

Comme la taille des pores augmente avec le niveau de dopage, la microstructure du silicium poreux préparé à partir d'un substrat de type P⁺ (résistivité $\rho \sim 10^{-3} - 10^{-2} \Omega.cm$) est constitué

par un réseau de cristallites de tailles nanométriques ayant un diamètre moyen compris entre 10 et 100 nm, séparées par des pores de dimensions équivalentes. Les pores se propagent de manière anisotrope dans une direction privilégiée et présentent de multiples ramifications annexes. Le matériau obtenu est le silicium méso-poreux [20].

En ce qui concerne le substrat de type n ($\rho \sim 1 \Omega \cdot \text{cm}$), la morphologie du silicium poreux dépend fortement de l'éclairement au cours de l'anodisation.

En absence d'éclairement, l'interface silicium/ électrolyte est un contact Schottky polarisé en inverse. Un faible nombre de porteurs s'accumulent au fond des pores et une gravure fortement anisotrope perpendiculaire à la surface de silicium est amorcée. Un réseau de cristallites de dimensions comprises entre 0.1 et 1 μm est ainsi formé. Dans ce cas, on obtient des macro-pores de silicium. [21]

Si on éclaire une des faces de la plaquette de silicium, des paires électron/trou sont générées dans le substrat et affectent le caractère anisotrope de la gravure. Une couche de faible épaisseur de silicium nano-poreux est formé en surface. Au-delà de quelques centaines de nanomètres, des macro-pores se forment.

I. 3. 2. Densité de courant

La densité de courant d'anodisation du silicium est un paramètre essentiel pour le contrôle de la morphologie du silicium poreux. Pour une concentration, d'acide fluorhydrique, donnée, la porosité et la vitesse de gravure augmentent avec la densité de courant.

I. 3. 3 Temps d'anodisation

Le temps d'anodisation influe sur l'épaisseur de la couche poreuse. Cette dernière augmente linéairement avec le temps d'anodisation. En effet, l'épaisseur de la couche formée au cours d'une anodisation en mode galvanostatique (courant constant) est proportionnelle à la quantité de charge échangée et par conséquent à la durée du temps d'anodisation.

I. 3. 4. Composition de l'électrolyte

L'acide fluorhydrique composant l'électrolyte est initialement en dilution dans l'eau. Le silicium étant un matériau hydrophobe, le HF « pur » ne pénètre pas dans les pores initiés. Ainsi l'adjonction d'un agent mouillant est indispensable pour favoriser la pénétration de l'électrolyte dans le réseau de pores. L'éthanol est le plus couramment utilisé car il mouille

parfaitement la surface du silicium. Ceci est dû à la diminution de la tension superficielle du liquide en présence de l'éthanol, qui va permettre aux bulles d'hydrogène formées lors de l'anodisation électrochimique de quitter plus facilement la surface assurant une meilleure homogénéité de l'attaque.

Pour une même densité de courant, la porosité décroît lorsque la proportion de HF augmente dans l'électrolyte. Pour une faible concentration en HF, la quantité d'ions fluor participant à la gravure est limitée et induit ainsi une gravure lente favorisant une propagation latérale plutôt isotrope des pores et donc leur élargissement. Tandis que pour une concentration en HF forte, la gravure est rapide, ce qui favorise une croissance anisotrope des pores par une gravure au fond des pores. En termes de porosité, la couche constituée de pores filiformes est moins poreuse que celle ayant des pores « arrondis ».

I. 3. 5. Température

La température est un paramètre qui influe sur la valeur critique de la densité de courant pour laquelle la réaction évolue du mode de gravure du silicium pour l'obtention de silicium poreux au mode d'électropolissage. Cette valeur passe typiquement de 50 à 200 mA/cm² lorsque la température augmente de 17°C à 50°C.

Hormis cette limitation, pour une densité de courant donnée la température n'a que très peu d'influence sur la vitesse de croissance des couches de silicium poreux.

I. 4. Les caractéristiques des couches poreuses de silicium

I. 4. 1. La porosité

La porosité d'un échantillon de silicium poreux correspond à la fraction volumique d'air contenu dans sa couche poreuse. Des valeurs de porosité allant de 4 % (obtenue sur du silicium macroporeux) [22] à 95 % (obtenue sur du silicium mésoporeux) [23] ont pu être mesurées. Ce paramètre structural peut être déterminé par gravimétrie sur des couches de grandes épaisseurs [24]. La méthode gravimétrique est destructive. Elle est plus adaptée à des valeurs de porosités intermédiaires (de 30 à 70 %). Il s'agit de peser le substrat avant porosification (m_1), après la porosification (m_2) et après avoir supprimé la couche poreuse réalisée (m_3). La suppression complète du silicium poreux se fait aisément par dissolution chimique dans une solution de potasse. La porosité P s'obtient ensuite en appliquant la formule suivante :

$$P(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \quad (\text{II-1})$$

Pour des couches poreuses de faibles épaisseurs ($< 1 \mu\text{m}$) et/ou de porosités élevées (de 70 à 95 %) ainsi que pour des couches de faibles porosités (de 4 à 30 %), la détermination de ce paramètre peut se faire grâce à des techniques optiques exploitant la réflectométrie [25], l'ellipsométrie [26] et l'absorption des rayons X [27].

I. 4. 2. Surface spécifique

Une couche de silicium poreux est aussi caractérisée par sa surface spécifique. Ce paramètre correspond à la surface développée par les parois des pores de l'échantillon par unité de volume occupé par la couche poreuse (en m^2cm^{-3}). La détermination de ce paramètre est essentiellement assurée par la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller) d'adsorption de gaz [23]. Par cette technique, des surfaces spécifiques allant de 50 à 900 m^2cm^{-3} ont été mesurées sur des échantillons de silicium poreux [28]. La surface spécifique diminue quand la porosité augmente et elle peut passer de 900 m^2/cm^3 pour une porosité de 50% à environ 100 m^2/cm^3 pour une porosité de 95%.

La possibilité d'élaborer le silicium poreux avec une surface spécifique aussi importante constitue l'avantage principal de son exploitation dans la conception des biocapteurs. En effet, l'objectif d'utiliser une surface spécifique importante est d'une part de pouvoir immobiliser un excès de biorécepteurs favorisant la détection de l'analyte sur un intervalle large de concentrations et d'autre part d'amplifier la transduction afin d'améliorer les capacités de détection (limites de détection et de quantification) et donc la sensibilité de la méthode d'analyse.

I. 4. 3. Épaisseur des couches de silicium poreux

L'épaisseur de la couche formée au cours d'une anodisation en mode galvanostatique (courant constant) est proportionnelle à la quantité de charge échangée et par conséquent à la durée du temps d'anodisation. Le contrôle de l'épaisseur est fait en contrôlant le temps d'anodisation et il est donc a priorisimple et efficace. En effet l'épaisseur de la couche augmente linéairement avec le temps d'anodisation dans le cas des couches réalisées avec des substrats de type p et de type p+.

La détermination de l'épaisseur des échantillons se fait directement à l'aide d'un profilomètre qui détermine avec une pointe le dénivelé entre le sommet et le fond de la couche poreuse sur

des échantillons dont la moitié a été dissoute dans la soude, ou indirectement grâce à la simulation des spectres de réflectivité.

D'autres méthodes peuvent être utilisées, soit par la pesée de l'échantillon si sa porosité et ses dimensions latérales sont connues [29], soit par observation en coupe par microscopie électronique à balayage.

L'épaisseur e de la couche poreuse peut également être déterminée par la relation suivante [30] :

$$e = \frac{m_1 - m_3}{S \cdot \rho_{Si}} \quad (\text{II-2})$$

Où :

e : épaisseur de la couche poreuse

ρ_{Si} : est la densité du silicium massif ($\rho_{Si}=2.33\text{g.cm}^{-3}$)

S : la surface ayant été anodisée.

m_1 : masse de l'échantillon avant anodisation

m_3 : masse de l'échantillon après dissolution totale de la couche poreuse dans la soude.

I. 4. 4. Les différentes morphologies du silicium poreux

Par morphologie nous entendons principalement deux types de caractéristiques qui sont la taille et la forme des pores. La morphologie du SiP est usuellement classifiée en trois catégories suivant la taille des nanocristallites qui peut aller de quelques nanomètres à quelques micromètres. On parlera alors de :

- **Silicium nano-poreux** : la taille des cristallites est entre 1 et 5 nm, on observe une structure spongieuse avec une disposition aléatoire des cristallites les unes par rapport aux autres.
- **Silicium méso-poreux** : la taille des cristallites est entre 10 et 100 nm, le silicium méso-poreux présente une structure pseudo organisée pour la quelle il y a à la fois apparition d'une organisation colonnaire verticale et d'un reste d'interconnexions entre ces colonnes. C'est ce type de silicium poreux qui a été exploité dans ce travail. Ses propriétés feront ainsi l'objet d'une étude approfondie dans la deuxième partie de ce chapitre.
- **Silicium macroporeux** : la taille des cristallites est supérieure à 100nm. Les cristallites du silicium macroporeux, sont disposées de façon très organisée.

I. 5. Autres propriétés importantes du silicium poreux

I. 5. 1. Propriétés chimiques

La surface du silicium poreux fraîchement préparé est passivée avec de l'hydrogène d'où une présence prédominante des fonctions hydrogénosilanes (Si-H) sur cette surface [31]. Ces fonctions chimiques réagissent facilement par différents types de réactions telles que les réactions d'hydrosilylation (addition d'un composé organique insaturé) et d'oxydation. Il est alors possible de modifier chimiquement la surface du silicium poreux par greffage covalent de molécules organiques [32]. La fonctionnalisation chimique du silicium poreux est une étape cruciale dans sa préparation pour des applications en biodétection. En effet, la modification chimique de la surface du silicium poreux permet d'une part l'incorporation de l'élément de reconnaissance (biorécepteur) qui confère au capteur sa spécificité et d'autre part, elle permet de stabiliser chimiquement la surface du matériau et donc de le protéger (de la corrosion par exemple), ce qui est indispensable pour l'élaboration d'un biocapteur performant [33].

I. 5. 2. Biocompatibilité du silicium poreux

La biocompatibilité est la capacité d'un matériau à réagir avec une substance naturelle sans provoquer une réaction de défense. Le corps humain répond typiquement à un contact avec des matériaux synthétiques par dépôt de protéines et de cellules sur leurs surfaces. En effet ces matériaux ont été classés en trois grandes catégories en se basant sur le type de réaction entre le biomatériau et le tissu vivant :

Bio- inerte : tels que le Tantale, le titane, l'aluminium et les oxydes de zirconium. De tels matériaux sont liés au tissu vivant par une capsule fibreuse d'épaisseur variante.

Bioactif : comme l'hydroxyapatite dense, le phosphate tricalcique et certains bio-verres. Dans ce cas il y-a lieu d'une formation d'un lien biochimique direct avec la surface du matériau accompagné d'une croissance libre.

Biorésorbable : tels que le Phosphate tricalcique, l'hydroxyapatite poreuse, les sels de phosphate calcique, certain bio-verres et le polyuréthane. Ces matériaux subissent une dissolution graduelle du matériau par le biosystème de l'organisme sans toxicité ou rejet.

Toutefois, contrairement à une large gamme de métaux, céramiques et polymères, le silicium, n'a pas été considéré comme un biomatériau [34]. Par ailleurs, il a été démontré plus tard que le silicium sous forme poreuse constitue un matériau biocompatible. Il peut être soit un

matériau : bioactif, un bio-inerte ou un matériau résorbable, ceci est en fonction des caractéristiques de la couche poreuse et de l'environnement dans lequel il est insérée [23]. En effet le SiP se dissout complètement dans des solutions aqueuses, dans des conditions physiologiques simulées, montrant une biodégradabilité complète [35]. Cahnam et al [36] ont montré que la vitesse à laquelle le SiP est dégradé par le corps, est ajustable par la chimie de surface.

Il a été également prouvé que la modification de la surface de SiP par oxydation peut le transformer en un matériau inerte. Des études *in vitro* impliquant l'immersion de différents types de matériaux dans des liquides corporels simulés montrent que l'immersion du méso-et nano-poreux de silicium ayant une porosité appropriée, induit dans certains cas, la précipitation d'une forme d'hydroxyapatite sur sa surface, qui est la phase minérale de l'os. Ce même comportement apparaît *in vivo* [37]. La bio activité avec les systèmes cellulaires vivant a également été étudiée et, jusqu'à présent, aucun effet toxique du SiP n'a été observé [38].

Toutes ces épreuves affirment les potentialités du Si poreux pour devenir un biomatériau important et une interface souple entre le monde de l'électronique et biologique notamment pour la construction de dispositifs implantables *in vivo* et aussi pour la fabrication une variété de systèmes de bio-détection pour divers applications

I. 6. Les applications du silicium poreux

Grace à ses remarquables propriétés, les applications du silicium poreux sont nombreuses et variées.

I. 6. 1. Domaine de microélectronique :

La forte réactivité chimique du SiP, et plus particulièrement son oxydation rapide, ont été exploitées pour des applications en microélectronique. L'obtention de couches épaisses (en quelques minutes de préparation), rendues oxydées, fut la principale utilisation dans les techniques d'isolation. Le SiP a été aussi utilisé comme couche tampon dans les composantes hétérogènes à base de semi-conducteurs fabriqués par épitaxie. Le SiP a été d'un grand apport dans le domaine du photovoltaïque. La texturisation et la passivation de la surface des cellules photovoltaïques au silicium cristallin à partir d'un seul et unique procédé, sont des atouts qui pourraient imposer son introduction à grande échelle dans l'industrie photovoltaïque [39].

I. 6. 2. Domaine de l'optoélectronique :

La première diode électroluminescente basée sur le SiP fut réalisée par Richter [Richter (diode)]. Il s'agit d'une jonction de type Schottky avec un dépôt d'or sur une couche poreuse de type n. Une émission de lumière rouge est observée sous une tension de polarisation de 200V. Koschida [40] a obtenu de meilleurs résultats sur une couche de type p. La tension de polarisation fut abaissée jusqu'à 7V, mais le rendement de luminescence est resté faible, de l'ordre de 10-5 %.

D'un point de vue technologique, les diodes de type Métal/SiP sont facilement réalisables. Cependant, le rendement quantique externe de ces composants n'a jamais dépassé 0.01 % à cause de l'absorption de la lumière par la couche métallique et de la difficulté d'injecter des porteurs. Cette difficulté d'injection des porteurs a incité certains chercheurs à déposer un polymère conducteur en contact avec l'importante surface spécifique du SiP, permettant ainsi d'améliorer l'injection des porteurs du métal vers le SiP et vice-versa [41]. De même, la technique sol-gel a été utilisée pour remplir les pores du SiP par des oxydes transparents conducteurs mais le rendement reste toujours faible.

I. 6. 3. Les guides d'ondes

Le SiP dont l'indice de réfraction change avec sa porosité [42] est un bon candidat pour la technologie d'interconnexion optique. Beaucoup de résultats sur les propriétés optiques du SiP oxydé ou non oxydé ont été rapportés et des guides d'ondes optiques ont été fabriqués et caractérisés [42- 44]. Il est utilisé comme guide d'onde dans le visible et l'infrarouge [42, 45]. Evidemment, les propriétés les plus intéressantes des guides d'ondes à base du SiP est dans le domaine du visible où le silicium n'a pas de propriétés de guidage. Il est possible de réaliser différentes couches de SiP de porosités différentes sur le même substrat de silicium. En 1993, Bondarenko [46] a montré la faisabilité des guides optiques par oxydation thermique d'une seule couche de SiP. Le contrôle du courant d'anodisation a permis la réalisation des guides d'ondes avec deux ou trois couches de SiP [43].

I. 6. 4. Capteurs et biocapteurs

En raison de sa grande surface spécifique de contact (jusqu'à $900 \text{ m}^2\text{cm}^{-3}$) [28] ainsi que ses exceptionnelles propriétés optiques, le silicium poreux a été largement utilisé pour la réalisation de différents types de capteur de gaz [47, 48], d'humidité [49], de température et des vapeurs des composés organiques volatiles.

En plus de sa facilité d'élaboration, de ses propriétés optiques remarquables et de sa grande surface spécifique, le silicium poreux est caractérisé par son innocuité vis à vis des tissus biologiques (bio-compatibilité) [50]. Ces caractéristiques, ont progressé l'utilisation du SiP pour la réalisation de différents types de biocapteurs notamment les biocapteurs optiques et électrochimiques [51].

Néanmoins, un grand nombre de travaux ont montré que les méthodes de détection basées sur les propriétés optiques sont les plus robustes [52]. Ces méthodes sont capables de détecter des toxines, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des explosifs, de l'ADN, des protéines, avec, pour certaines d'entre eux, une limite de détection de quelques ppm (parties par milliard) [33]. Différentes propriétés optiques du silicium poreux sont utilisées comme moyen de transduction dans les capteurs, à savoir sa photoluminescence et sa réflectivité optique. Par exemple la trempe dans les spectres de photoluminescence après dépôt d'ADN a été utilisée pour étudier la transduction de l'hybridation d'ADN [53]. Dans ce cas, le comportement a été attribué à des processus de recombinaison non radiative [54].

Au cours des dernières années, une mise en œuvre réussie de ce type de biocapteur a été obtenu [54, 55-57].

Aussi il est connu que la lumière envoyée à la surface du SiP est réfléchi au niveau des deux interfaces air/silicium poreux et silicium poreux/substrat de silicium. L'interférence à la surface du matériau poreux des ondes réfléchies entraîne la formation de franges appelées "franges de Fabry-Pérot" [58]. En effet, tout changement dans la composition du milieu remplissant les pores, provoqué par exemple par la fixation de l'analyte à un biorécepteur spécifique préalablement immobilisé à la surface des pores, entraîne une variation de l'indice de réfraction du film poreux et un déplacement des franges de Fabry-Pérot. Dans cette optique un grand nombre de biocapteurs a été réalisé.

D'autre part, l'élaboration des biocapteurs électrochimiques à base de SiP reste encore limitée par rapport à celle des biocapteurs à transduction optique [52]. Deux principales difficultés limitent l'utilisation du silicium poreux pour la réalisation des biocapteurs électrochimiques. La première est sa faible conductivité, la solution proposée pour augmenter ce paramètre été de modifier la surface poreuse de Si par un matériau conducteur comme l'or [59], le platine [60], ou un polymère conducteur [61, 62]. La deuxième difficulté est sa grande surface de contact qui permet une capture efficace des analytes biologiques mais implique également une forte réactivité avec l'environnement notamment dans une solution aqueuse. Cela peut provoquer la dégradation du biocapteur. Pour cette raison, la stabilisation de la surface du SiP par une chimie de surface appropriée est une étape nécessaire à

l'obtention d'un biocapteur performant [63]. De plus l'affinité de liaison avec les analytes étudiés, doit être prise en compte [63, 64]. Les techniques courantes pour la fonctionnalisation du SiP comprennent: l'oxydation [65-67], la silanisation [54, 58,63, 68-71], l'hydrosilylation d'alcènes et d'alcyne [74, 75] [26, 27], les radiations [74] [28] et d'autres approches chimiques [63, 75]. Par conséquent dans ce cas, la fonction principale du SiP est d'agir comme un substrat de grande surface pour améliorer la sensibilité des biocapteurs.

D'autre part, il a été rapporté que des électrodes poreuses peuvent augmenter la sensibilité du capteur biologique en comparaison avec des électrodes planes. Song et al [76] ont mené une série d'expériences en utilisant une électrode plane et une électrode poreuse de silicium. La Cholestérol oxydase a été immobilisée de manière covalente sur chacune des électrodes par silanisation. Les résultats obtenus ont montré que, la surface effective et la sensibilité de l'électrode poreuse ont été environ trois (3) fois plus grandes que ceux de l'électrode plane. Il est à noter aussi que d'autres travaux réalisés par le même groupe ont été consacrés à développer un biocapteur électrochimique pour le diagnostic et le suivi des maladies du foie [60, 77].

Notons également que Tembe et ses collaborateurs, [78] ont réalisé un biocapteur électrochimique pour la détection du catéchol. Le principe de ce biocapteur repose sur la mesure de conductivité de l'enzyme piégée à l'intérieur de la matrice poreuse du silicium. En effet lorsque la tyrosinase interagit avec le catéchol, la variation de la caractéristique courant-tension est proportionnelle à la concentration d'analyte. Ainsi Thust et al [79] ont réalisé un biocapteur pour le contrôle de la pénicilline. Des molécules de pénicillase (enzyme sensible à la pénicilline) sont adsorbées dans une couche de silicium poreux oxydé. La variation de la caractéristique capacité-tension en présence de pénicilline permet de déterminer la concentration.

PATIE. II. LE SILICIUM POREUX
ÉLABORATION ET CARACTERISATION

Le SiP utilisé dans cette étude est le silicium méso-poreux avec une taille des pores qui varie de quelques à plusieurs dizaines de nanomètres. Ce type de silicium est évalué comme une solution intéressante pour la rétention de façon covalente d'une petite enzyme comme la HRP (Horse Radish Peroxidase) dont les dimensions sont celles d'un parallélépipède rectangle de 4.0 nm x 6.7 nm x 11.7 nm de rayon de giration de 2.65 nm [80].

Dans cette partie, nous détaillons le procédé expérimental utilisé pour la réalisation des échantillons de silicium poreux, ensuite nous abordons la caractérisation par différentes techniques (FTIR, angle de contact, MEB) des couches poreuses obtenues.

La formation des couches méso-poreuses de silicium adaptée à l'immobilisation de l'enzyme, sont obtenues par attaque anodique du silicium monocristallin de type (p⁺) dans une cellule contenant un électrolyte à base d'acide fluorhydrique (HF) et d'éthanol. Dans notre cas, la réaction a lieu à densité de courant constante.

I. Méthodes expérimentales

I. 1. Préparation des échantillons de silicium

La qualité et la reproductibilité des propriétés du SiP formé dépendent fortement de l'état de surface. Il est donc fondamental de disposer d'une surface chimiquement propre.

En effet avant l'utilisation des échantillons déjà découpés sous forme de carrée de dimension 1.5x1.5 cm², il est nécessaire de procéder à des opérations de nettoyage afin d'éliminer certaines couches d'oxydes et d'impuretés. Cette étape consiste en un dégraissage dont le processus est décrit ci-dessous et l'ordre dans lequel sont énumérés les solvants est très important :

- Trichloréthylène chauffé thermiquement pendant 15 minutes
- Acétone chauffé thermiquement pendant 10 minutes
- éthanol chauffé thermiquement pendant 5 minutes
- Séchage à l'azote.

Avant chaque anodisation et afin d'éliminer l'oxyde natif, les échantillons sont trempés dans HF (40%) pendant 1 min. Le contact ohmique est assuré sur la face arrière du wafer de silicium en déposant un mélange eutectique Indium-Gallium (In - Ga).

I. 2. Cellule électrochimique

La cellule électrochimique utilisée dans ce travail est représentée sur la figure (II-3). Elle consiste en une cuve en polytrifluorochloroéthylène (PTFCE ou Kel'F) qui résiste aux attaques de l'acide fluorhydrique ; elle est conçue pour pouvoir contenir le substrat de silicium, qui constitue l'anode, en position horizontale placé au fond de la cellule. La face arrière du substrat, par laquelle le contact électrique est pris, est plaquée contre un contact en cuivre (feuille mince). La face avant est exposée à l'électrolyte constitué d'un mélange HF/éthanol. L'étanchéité au niveau du substrat est garantie par un joint en Viton qui délimite une surface utile de $0,8 \text{ cm}^2$. La cathode est une électrode en platine (inattaquable par HF) sous forme de grille plongée dans l'électrolyte face au substrat de silicium. L'établissement d'un courant entre les deux électrodes déclenche le processus d'anodisation. Dans cette configuration, une bonne homogénéité de la densité de courant est assurée permettant d'obtenir des couches poreuses uniformes.

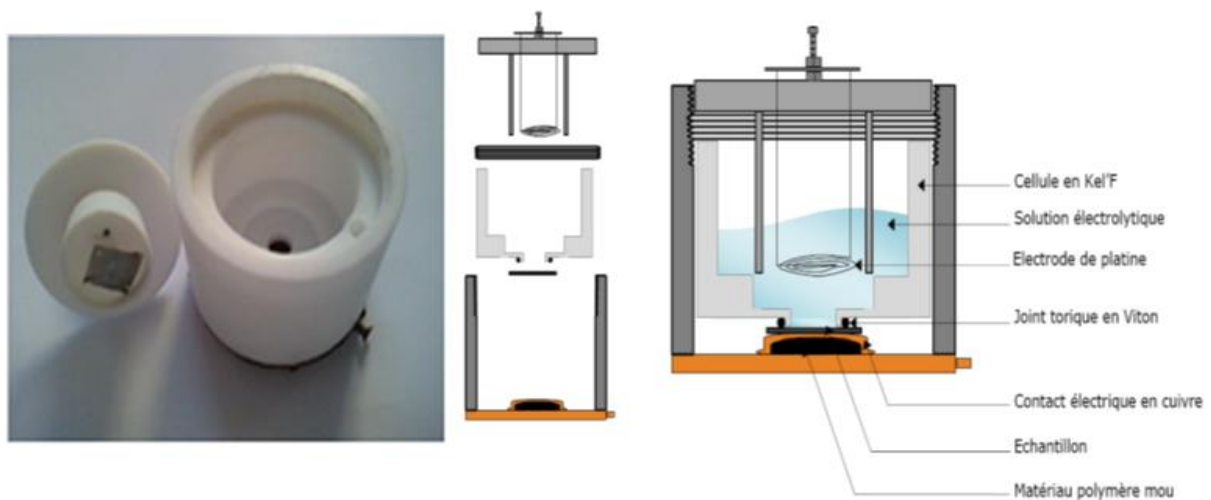


Figure. II. 3. Schéma de la cellule utilisée pour la formation de silicium poreux.

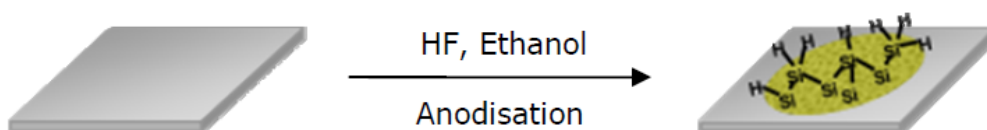


Figure. II. 4. Schéma de formation de silicium poreux par anodisation électrochimique.

I. 3. Sources de courant

L'anodisation électrochimique a été réalisée en utilisant un potentiostat de type (Princeton Applied Research, Model 362) relié à un système d'acquisition piloté par le logiciel (LabView) (figure II-5), qui permet de tracer les caractéristiques I(V), I(t), V(t).

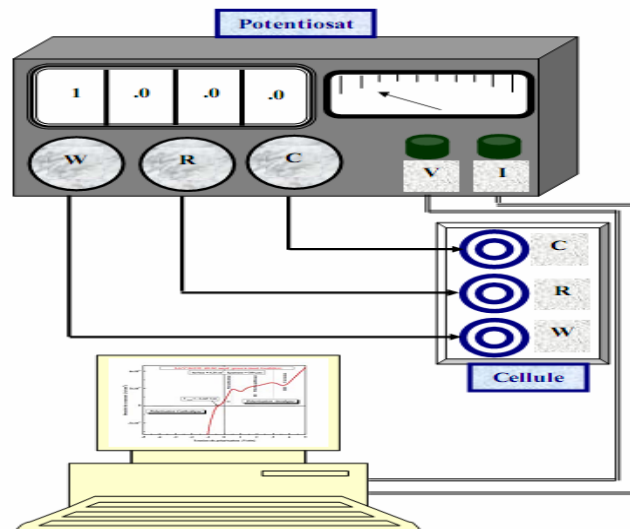


Figure. II. 5. Schéma du montage expérimental utilisé pour la dissolution anodique.

I. 4. Condition de formation de silicium méso-poreux

I. 4. 1. Type de substrats de silicium

Pour obtenir des couches de silicium poreux avec les caractéristiques physiques les plus adaptées à notre application de bio-détection (une surface spécifique élevée et des pores suffisamment ouverts pour introduire des enzymes de la taille de l'HRP, nous avons expérimenté un type de substrat de silicium (p^+) fortement dopé avec des atomes de bore (B), de résistivité comprise entre 0.08 et 0.12 Ω .cm, d'orientation $\langle 100 \rangle$ et de 500 μm d'épaisseur obtenus par une croissance cristalline de Czochralski (CZ).

I. 4. 2. Electrolytes d'anodisation

L'anodisation électrochimique du silicium est réalisée à température ambiante ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$). La solution électrolytique utilisée pour préparer les échantillons est un mélange de 48% d'acide fluorhydrique et d'éthanol absolu, avec une proportion volumique 1/1, La présence d'éthanol accroît la mouillabilité sur le silicium, tout en favorisant le dégagement de l'hydrogène gazeux généré par la réaction chimique.

I. 4. 3. Densité du courant et temps d'anodisation

La densité du courant est le rapport entre l'intensité du courant appliquée et la surface du substrat de silicium anodisée (en contact avec l'électrolyte d'anodisation). La densité du courant appliquée pour l'élaboration de nos échantillons de silicium poreux est égale à 80 mA/cm², pendant un temps d'anodisation de 30 sec.

II. Caractérisation des couches de silicium poreux

II. 1. Détermination de la porosité par gravimétrie

La porosité ρ est définie comme la fraction de volume inoccupé au sein de la couche de silicium poreux. Elle est déterminée par gravimétrie en utilisant la formule suivante :

$$\rho = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \quad (\text{II-3})$$

m_1 =: masse de l'échantillon avant anodisation,

m_2 =: masse de l'échantillon après anodisation,

m_3 =: masse de l'échantillon après dissolution totale de la couche poreuse dans la soude.

Pour $m_1=0.1772312$ g ; $m_2= 0.1769201$ g et $m_3=0.1767155$ g, la porosité est de $\rho = 60,32\%$

II. 2. Caractérisation par MEB

L'observation au microscope électronique à balayage montre que l'attaque du silicium de type p⁺ par une solution contenant un mélange HF et d'éthanol en proportions égales en appliquant une densité de courant de 80mA /cm² conduit à la formation du silicium mésoporeux.

La vue en surface (figure II-6-a) montre la formation de pores sous forme de labyrinthe, distribués de façon homogène avec une dimension moyenne de l'ordre 10-15 nm. La coupe transversale (figure II-6-b) montre des mésopores ramifiés et interconnectés. La couche poreuse est uniforme avec une épaisseur de $\sim 2,5$ μm . Cette vue d'ensemble de la couche poreuse montre que l'interface silicium poreux /silicium est très franche.

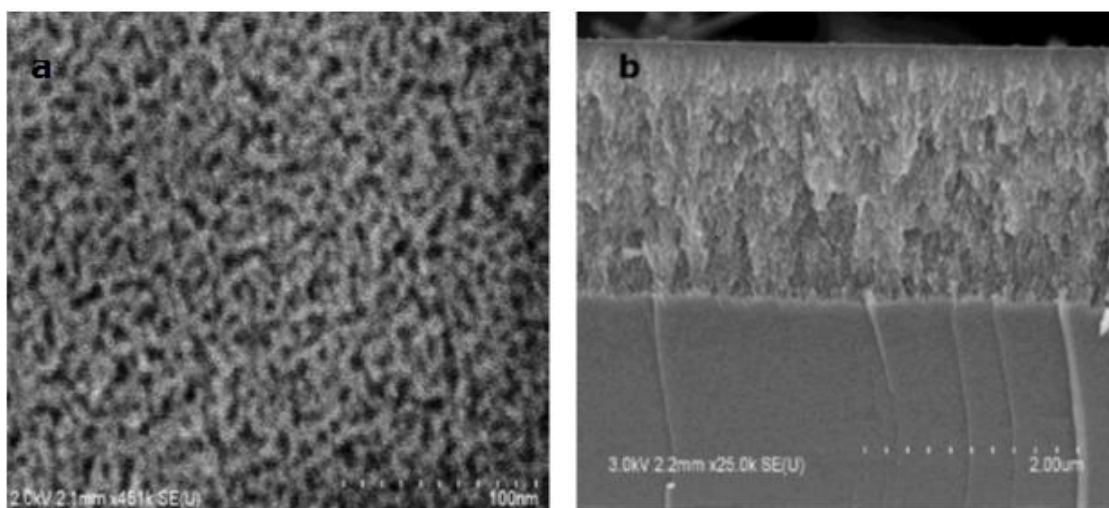


Figure. II. 6. Micrographies au MEB du silicium méso-poreux :

a) Vue en surface, b) Vue en clivage

II. 3. Caractérisation par angle de contact

La mouillabilité caractérise la facilité avec laquelle une goutte de liquide s'étale sur une surface solide. La mesure de l'angle de contact θ entre une surface et une goutte de liquide nous informe sur l'état de la mouillabilité d'un matériau. La variation de ce paramètre dans le cas du SiP est attribuée aux interactions entre la chimie de la surface et le liquide. En effet dans le cadre de cette thèse, cette mesure est réalisée dans le but de confirmer l'efficacité des réactions chimiques entreprises en surface à chaque étape de fonctionnalisation.

L'angle de contact a été mesuré en utilisant $1\mu\text{L}$ d'eau DI à une température de 20°C et un système de géométrie contrôlé (Visio drop), la mesure d'erreur est estimée à 2° . La première mesure en utilisant cette technique a été réalisée sur une surface poreuse du silicium fraîchement préparée. Le résultat obtenu (figure II-7 et tableau II-1), montre que la valeur de l'angle de contact est égale à 115° cette valeur étant supérieure à 90° , confirme l'hydrophobicité de ce matériau [81]. Ceci montre que la surface de SiP obtenue est totalement recouverte de liaisons hydrures (SiH_x) hydrophobes, et elle est exempte de toute oxydation de surface.

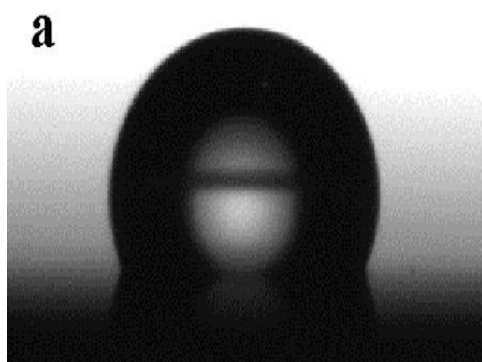


Figure. II. 7. Photographie de $1\mu\text{L}$ d'une goutte d'eau déposée à la surface du SiP

	angle gauche	angle droit	Moyenne	Cos	T ($^\circ\text{C}$)
Si Poreux	115	115	115	-0.423	20.0

Tableau. II. 1. Valeur de l'angle de contact déterminée après anodisation électrochimique du silicium.

Il est à noter que les liaisons hydrures sont des fonctions apolaires avec une énergie de surface très faible, tandis que l'eau ultra pure est un milieu très polaire avec une énergie de surface très élevée, ce qui conduit à la réduction de l'interface eaux/SiP qui se mesure par un angle de contact élevé.

II. 4. Caractérisation par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Le spectre FTIR présenté sur la figure (II-8) présente tous les modes de vibration caractéristiques des liaisons hydrures présentes à la surface du silicium poreux fraîchement préparé sans aucune autre impureté en surface. Il apparaît un triplet autour de 2085, 2115 et 2135 cm^{-1} attribué respectivement aux modes de vibration d'élongation des liaisons Si-H, Si-H₂ et Si-H₃, [82-85]. La bande correspondant au mode de vibration de déformation de la liaison Si-H₂ est enregistrée vers 910 cm^{-1} (mode de cisaillement) [86].

Aucune oxydation de surface n'a été détectée. Ceci est confirmé par l'absence d'une bande d'oxyde de silicium autour de 1000-1200 cm^{-1} [87]. Par ailleurs, les oscillations sinusoïdales de la ligne de base sont dues aux interférences dans la couche mince de silicium poreux de faible indice optique [88]. L'observation de telles oscillations révèle l'homogénéité de la couche poreuse obtenue [89].

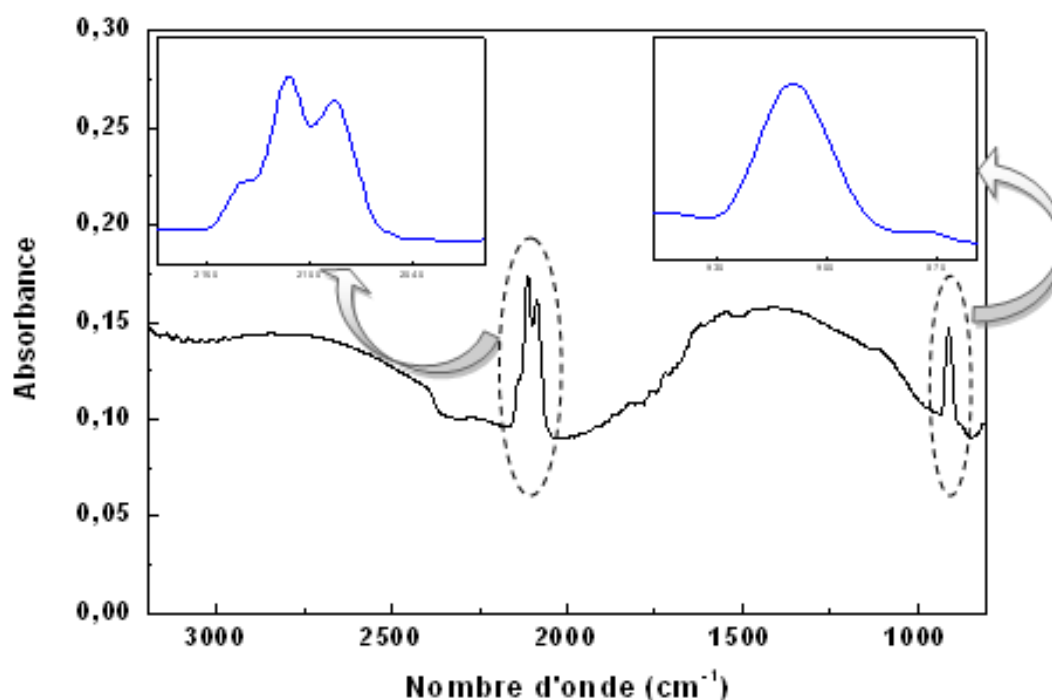


Figure. II. 8. Spectre FTIR en transmission de la couche de silicium méso-poreux

Conclusion

Ce chapitre de thèse a été consacré à l'étude de silicium poreux comme matériau de base pour la réalisation de nos échantillons.

La première partie a été réservée à l'étude bibliographique du SiP. Nous avons commencé par rappeler le principe de son élaboration par anodisation électrochimique ainsi que ses différentes propriétés. Puis, nous nous sommes intéressés aux principales applications du SiP et plus particulièrement son application en biodétection par voie électrochimique, méthode que nous avons choisi d'exploiter dans le cadre de cette thèse. Dans la deuxième partie nous avons présenté l'ensemble des conditions et des moyens d'élaboration utilisés pour la fabrication du SiP. Nous avons également présenté les résultats des différentes caractérisations effectuées sur les couches poreuses de silicium. En effet la valeur de la mesure de porosité par gravimétrie a été estimée à 60%. Aussi les analyses réalisées par MEB, FTIR et l'angle de contact, montrent la formation d'une couche méso-poreuse avec des terminaisons hydrures SiH_x sans oxydation de surface, qui confèrent un caractère hydrophobe aux couches poreuses formées.

Références

- [1] **A. Uhlir**, *Bell Syst. Tech. J.*, 35, (1956), 333.
- [2] **K. Barla, R. Herino, G. Bomchil**, *J. Appl. Phys.*, 59, (1986), 439.
- [3] **N. J. Thomas, J. R. Davis, J. M. Keen, J. G. Castledine, D. Brumhead, I. M. Sturland and J. M. Cole**, *IEEE Electron device lett.*, 10, (1989), 129.
- [4] **L. T. Canham**, *Appl. Phys. Lett.*, 57, (1990), 1046.
- [5] **J.C. Vial, J. Derrien**, les éditions de physique, (1995), 355.
- [6] **Q. Chen, J. Zhu, X. G. Li, C. G. Fan, Y. H. Zhang**, *Phys. Lett. A*, 220, (1996), 293.
- [7] **S. Strehlke, D. Sarti, A. Krotkus and al**, *Thin solid Film*, (1997), 291.
- [8] **R. B. Bergmann, T. J. Rinke, T. A. Wagner and al**. Thin film solar cells on glass based on the transfer of monocrystalline Si films.
- [9] **H. Tayanaka, K. Yamauchi, T. Matsushita**, Thin film crystalline silicon solar cells obtained by separation of a porous silicon sacrificial layer, Proc. of 2nd word conference
- [10] **R. L. Smith, D. C. Scott**, *IEEE Trans, Biomed. Ing.*, 33, (1989), 83.
- [11] **M. J. Sconing, A. Kurowski, M. Thust and al**, *Sensors and actuators B*, 64, (2000), 59.
- [12] **S. Perichon**, Technologie et propriétés de transport dans les couches épaisses de silicium poreux: applications aux microsystèmes thermiques. Thèse. Lyon, INSA, (2001), 195.
- [13] **R. E. Hummel, A. Morrone, S. S. Chang**, *J.Appl.phys.*, 63, (1993), 2771.
- [14] **D. Dimova-Malinovska, M. Sendova-Vassileva, N. Tzenov, M. Kamenova**, *Thin solid films*, 297, (1997), 9.
- [15] **R. L. Smith, S. D. Collins**, *J. Appl. Phys.*, 71, (1992), 8.
- [16] **V. Lehman and U. Gösele**, *Appl. Phys. Lett.*, 58, (1991), 856.
- [17] **H. Föll, M. Christophersen, J. Carstensen and al**, *Materials Science and Engineering*, 39, (2002), 93.
- [18] **J. N. Chazalviel, M. Etman, F. Ozanam**, *J. Electroanal. Chem*, 297, (1991), 533.
- [19] **G. Bombchil, A. Hallimaoui, I. Sagnes, I. Brebezier, P. Perret, B. Lambert, G. Vincent, L. Garchery, J. L. Regolini**, *Applied Surface Science*, 65-66, (1993), 394.
- [20] **A. Feyh, F. Lambert, S. Kronmuller, W. Mokwa**, *Phys. Stat. Sol*, 202, (2005), 1597.
- [21] **V. Lehman**, *Instrumentation, Science, Materials and Applications*, 277, (2002).
- [22] **A. G. Cullis, L. T. Canham and O. D. Dosser**, *Res. Soc. Symp. Proc*, vol. 256, (1992), 7.
- [23] **L. T. Canham**, *Biomedical applications of porous silicon, From: Properties of Porous Silicon*, Edited by L. Canham, Institute of Engineering and technology, (1997).
- [24] **D. Brumhead, L. T. Canham, D. M. Seekings and P. J. Tufton**, *Electrochimica Acta*, 38, (1993), 191.
- [25] **S. Lazarouk, P. Jaguiro, S. Katsouba, G. Maiello, S. La Monica, G. Masini, E. Proverbio, and A. Ferrari**, *Thin Solid Films*, 297, (1997), 97.
- [26] **C. Pickeringa, L. T. Canhama and D. Brumhead**, *Applied Surface Science*, 63, (1993), 22.
- [27] **V. V. Ratnikov**, *Phys. Solid State*, 39, (1997), 550.
- [28] **A. Halimaoui**, *Surface Science Letters*, 306, (1994), 550.
- [29] **A. Halimaoui**, *Porous silicon science and technology, lecture 3*, Les Editions de Physique-Springer, (1994), 33-50.

- [30] **B. Bessais, O. Ben Younes, H. Ezzaouia, N. Mliki, M.F. Boujmil, M. Oueslati, R. Bennaceur**, Journal of Luminescence 90, (2000), 109.
- [31] **J. L. Cantina, M. Schoisswohla, A. Grosmana, S. Lebiba, C. Ortega, H. J. von Berdelebena, É. Vázsonyib, G. Jalsovszkyc, and J. Erostyák**, Thin Solid Films, 276, (1996), 76.
- [32] **J. M. Buriak**, Chemical Reviews, 102, (2002), 1271.
- [33] **F. Cunin, J. M. Devoisselle and M. J. Sailor**, Technique de l'ingénieur, 49, (2006), 1.
- [34] **A. Klumpp, U. Schaber, H.L. Offereins, K. Kuhl, H. Sandmaier**, Sens. Actuators A, 41-42 (1994), 310.
- [35] **S.H.C. Anderson**, Phys. Stat. Sol. (a), 197, (2003), 331.
- [36] **L. T. Canham and al.** phys. stat. sol. (a), 182, (2000), 521.
- [37] **L. Jeffery, Coffey**, phys. stat. sol. (a) 197, (2003), 336.
- [38] **V. Chin and al.** Adv. Mater, 13, (2001), 1877.
- [39] **S. Aouida, M. Saadoun, M. F. Boujmil, M. Ben Rabha, B. Bessais**, Appl. Surf. Science, 238, (2004), 193.
- [40] **N. Koschida and H. Koyama**, Appl. Phys. Lett, 60, (1992), 347.
- [41] **L. Zhang**, J. Electrochem. Soc, 143, (1992), 42.
- [42] **G. Maiello, S. La Monica, A. Ferrari, G. Masini, V. P. Bondarenko, A. M. Dorofeev and N. M. Kazuchits**, Thin Solid Films, 297, (1997), 311.
- [43] **A. Loni, L. T. Canham, M. G. Berger, R. Arens-Fisher, H. Munder, H. Luth, H. F. Arrand and T. M. Benson**, Thin Solid Films, 276, (1996), 143.
- [44] **M. Araki, M. Takahashi, H. Koyama and N. Koshida**, Mater. Res. Soc. Symp. Proc, 486, (1998), 107.
- [45] **H. F. Arrand, T.M. Benson, P. Sewell, A. Loni, R.J. Bozeat, R. Arens-Fisher, M. K. Ruger and M. Th. Ronissen**, IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron, 4 (6), (1998), 975.
- [46] **V. P. Bondarenko, V. S. Varichenko, A. M. Dorofeev, N. M. Kazyuchits, V. A. Labunov and V. F. stei'makh**, Tech. Phys. Lett, 19 (7), (1993), 463.
- [47] **S. Belhousse, H. Cheraga, N. Gabouze, R. Outemzabet**, Sens. Actuators B, 100, (2004), 250.
- [48] **N. Gabouze, H. Cheraga, S. Belhousse, N. Ghellai, N. Zouadi, Y. Ouadah, N.-E. Chabane-Sari**, Phys. Stat. Sol, 204 (2007), 1412.
- [49] **J. J. Mares, J. Kristofik, E. Hulcius**, Thin solid films, 255, (1995), 272.
- [50] **A. Angelescu, I. Kleps, M. Mihaela, M. Simion, T. Neghina, S. Petrescu, N. Moldovan, C. Paduraru and A. Raducanu**, Rev. Adv. Mater. Sci, 5, (2003), 440.
- [51] **A. Jane, R. Dronov, A. Hodges, and N. H. Voelcker**, Trends in Biotechnology, 27(4), (2009), 230.
- [52] **M. B. de la Mora, M. Ocampo, R. Doti, J. E. Lugo and J. Faubert**, Porous Silicon Biosensors, chapter 06.
- [53] **Di. G. Francia, V. L. Ferrara, S. Manzo and S. Chiavarini**, Biosensors and Bioelectronics, 21, (2005), 661.
- [54] **A. Jane, R. Dronov, A. Hodges and N. H. Voelcker**, Trends in Biotechnology Review, 27, (2009), 230.
- [55] **P. M. Fauchet, L. Tsybeskov, C. Peng, S. P. Duttgupta, J. von Behren, Y. Kostoulas, J. M. V. Vandyshev and K. D. Hirschman**, IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 1, (1995), 1126.
- [56] **C. Steinem, A. Janshoff, V. S. Y. Lin, H. Volcker, Nicolas and M. R. Ghadiri**, mechanistic investigations and prospect for optical interferometric biosensing. Tetrahedron, 60, (2004), 11259.
- [57] **H. Ouyang, M. Archer and P. M. Fauchet**, Springer Series in Optical Sciences, (2007), 133.

- [58] V. S. Y. Lin, K. Motesharei, K. P. S. Dancil, M. J. Sailor and M. R. Ghadiri, *Science*, 278, (1997), 840.
- [59] A. Ressine, C. Vaz-Domínguez, V. M. Fernandez, A. L. De Lacey, T. Laurell, T. Ruzgas and S. Shleev, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, (2010), 1001.
- [60] M. J. Song, D. H. Yun, N. K. Min and S. I. Hong, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, (2007), 32.
- [61] J. H. Jin, E. Alocilja and D. Grooms, *Journal of Porous Materials*, 17, (2010), 169.
- [62] Z. Zhao and H. Jiang, *Biosensors*, P. A. Serra, InTech, (2010).
- [63] A. Kristopher, T. Kilian, J. Bocking and J. Gooding, The importance of surface chemistry in mesoporous materials: lessons from porous silicon biosensors. *Chemical Communications*, (2009), 630.
- [64] N. Chaniotakis and N. Sofikiti, *Analytica Chimica Acta*, 615, (2009), 1.
- [65] H. Chen, X. Hou, G. Li, F. Zhang, M. Yu and X. Wang, *Journal of Applied Physics*, 79, (1996), 3282.
- [66] L. Debarge, J. P. Stoquert, A. Slaoui, L. Stalmans and J. Poortmans, 1, (1998), 281-286.
- [67] R. J. Martin-Palma, J. M. Martinez-Duart, J. Salonen and V. Lehto-P, Effective passivation of porous silicon optical devices by thermal carbonization, 103, (2008), 083124.
- [68] C. Selena, Li. Yi, L. J. Rothberg, L. M. Benjamin and P. M. Fauchet, *Materials Science and Engineering C*, 15, (2001), 277.
- [69] S. D. Keiki-Pua, D. P. Greiner and M. J. Sailor, *Journal of American Chemical Society*, 121, (1999), 7925.
- [70] Li. Xuegeng, He. Yuanqing and T. S. Mark, *Langmuir*, 20, (2004), 4720.
- [71] M. J. Sweetman, C. J. Shearer, J. G. Shapter and N. H. Voelcker, *The ACS Journal Of Surfaces And Colloids*, 27, (2011), 9497.
- [72] M. R. Linford and C. E. D. Chidsey, *Journal of American Chemical Society*, 115, (1993), 12631.
- [73] J. M. Schmeltzer, J. Lon, A. Porter, M. P. Stewart and J. M. Buriak, *Langmuir*, 18, (2002), 2971.
- [74] R. Boukherroub, A. Petit, A. J. Loupy, N. Chazalviel and F. Ozanam, *Journal of Physica Chemical B*, 107, (2003), 13459.
- [75] L. M. Bimbo, Thesis: Biocompatibility and biofunctionalization of mesoporous silicon particles, Division of Pharmaceutical Technology Faculty of Pharmacy University of Helsinki Finland, (2012).
- [76] M. J. Song, D. H. Yun, J. H. Jin, N. K. Min and S. I. Hong, *Japanese Journal of Applied Physics*, 45, (2006), 7197.
- [77] M. J. Song, D. H. Yun and S. I. Hong, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73, (2009), 474.
- [78] S. Tembe, P. S. Chaudhari, S. V. Bhoraskar, S. F. D'Souza and M. S. Karve, *IEEE Sensors Journal*, 8, (2008), 1593.
- [79] M. Thust, M. J. Schoning, S. Frohnhoof, R. Arens-Fischer, P. Kordos, H. Luth, *Measurement Science and Technology*, Vol. 7, 29, (1996).
- [80] A. F. Naves, A. M. Carmona-Ribeiro and D.F.S. Petri, *Langmuir*, 23(4), (1981), 1987.
- [81] A. Kermad, S. Sam, N. Ghellai, K. Khaldi, N. Gabouze, *Materials Science and Engineering B*, 178, (2013), 1159.
- [82] P. Gupta, V. B. Colvin, S. M. George, *Phys. Rev. B*, 37, (1988), 8234.
- [83] V. A. Burrows, Y. J. Chabal, G. S. Higashi, K. Raghavachari, S. B. Christman, *Appl. Phys. Lett*, 53, (1988), 998.

- [84] **R. A. Venkateswara, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel.** *J. Electrochem. Soc.*, 138, (1991), 153.
- [85] **R. Dietrich, J. Grobe, H. Feld,** *J. Molec. Struc.*, 349, (1995), 109.
- [86] **W. J. Salcedo, F. J. R. Fernandez, E. Galeazzo, O. S. Dantas Michel,** *Brazilian journal of Physics*, 27, (1997), 158.
- [87] **C. DaFonseca, F. Ozanam, J. N. Chazalviel,** *Surface Science*, 365, (1995), 1.
- [88] **F. R. S. Clark, Moffatt, D. J,** *Applied Spectroscopy*, 32, (1978), 547.
- [89] **W. Theib,** *Surface Science Report*, 29, (1997), 91.

**CHAPITRE.III. FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE
DU SILICIUM POREUX ET IMMOBILISATION DE
L'ENZYME**

Introduction

Parmi les possibilités d'évolution des technologies basées sur le matériau silicium, la réalisation de dispositifs hybrides combinant les caractéristiques physiques du semi-conducteur et les améliorations apportées par la présence de molécules organiques en surface apportent de réelles promesses. L'intégration d'une monocouche organique greffée à la surface du semi-conducteur permet en effet d'accrocher diverses espèces autorisant l'utilisation de ces dispositifs dans des domaines variés allant de la microélectronique [1] aux capteurs chimiques ou biochimiques [2]. Parmi ces systèmes, le greffage d'espèces organiques sur des surfaces de silicium hydrogénées permet l'obtention de couches denses et ordonnées [3-5]. La liaison covalente Si-C assure à ces dispositifs une bonne stabilité chimique associée à des bonnes propriétés électroniques. Ainsi, les réactions chimiques à la surface de silicium poreux menant à la formation de la liaison Si-C requièrent une surface précurseur métastable; elle doit être assez stable à l'air en présence de vapeurs de solvants et autres contaminants, mais assez réactive pour que la réaction ait lieu. Les terminaisons hydrides (Si-H_x) à la surface de silicium poreux présentent une bonne surface de départ qui satisfait ces deux caractères [5-8].

Par ailleurs, les monocouches greffées peuvent servir de surfaces de départ pour d'autres fonctionnalisations supplémentaires à travers une série de procédés chimiques développés à la surface de silicium depuis quelques années seulement [3, 9]. L'existence de différentes molécules portant différents groupements fonctionnels compatibles avec cette chimie permet l'accrochage d'une multitude d'espèces chimiques et biologiques telles que les enzymes avec les propriétés désirées [10-15].

Dans notre travail pour l'accrochage de l'enzyme à la surface du SiP par des liaisons covalentes, on fait apparaître sur le support des fonctions chimiques réactives. Ces fonctions peuvent être créées par greffage d'un composé qui comporte une fonction capable de former une liaison covalent avec les fonctions portées par les acides aminés de l'enzyme. Ce composé permet de fixer l'enzyme à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat [16]. Pour arriver à cette fin, nous avons utilisé un procédé à plusieurs étapes pour fonctionnaliser la surface de SiP par l'enzyme. Nous avons procédé, en premier lieu, au greffage d'une monocouche d'acide à la surface hydride de SiP via la liaison covalente Si-C. Par la suite, l'accrochage de l'enzyme est réalisé en deux étapes : un ester réactif est généré à partir des groupements acides en surface, puis cette surface

activée est couplée avec les amines contenues dans l'enzyme par formation des liaisons amides.

**PARTIE. I. NOTIONS THEORIQUES SUR LES ETAPES DE
FONCTIONNALISATION DU SILICIUM POREUX**

Dans le cadre des biocapteurs, les surfaces terminées par des groupements carboxyles sont particulièrement intéressantes. Elles peuvent en effet être facilement activées pour accrocher à la surface une biomolécule de façon covalente via une réaction d'amidation en deux étapes [17- 18]. Il est possible d'obtenir par hydrosilylation des monocouches d'acides bien contrôlées et compactes, avec une densité de sondes connue [19].

Dans ce travail, nous avons privilégié l'hydrosilylation thermique comme méthode de greffage. Cette réaction consiste à insérer une liaison insaturée carbone-carbone (C=C) dans la liaison silicium-hydrogène (Si-H) pour former la liaison covalente silicium-carbone (Si-C). Pour obtenir des surfaces terminées par des fonctions acides (-COOH) en une seule étape, nous avons utilisé un précurseur acide ω -alcénoïque : l'acide undécylénique ($\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$).

Par ailleurs, l'accrochage des sondes biologiques sur des surfaces à terminaisons acides, nécessite une étape intermédiaire. Il s'agit de l'activation, cette dernière a pour objectif de baisser la barrière d'énergie entre les terminaisons amines des entités biologiques et les terminaisons acides de la surface greffée, permettant l'immobilisation des biomolécules telles que les enzymes pour la fabrication des biocapteurs.

Dans cette première partie de ce chapitre, nous nous intéressons à présenter un état de l'art des diverses méthodes mises en œuvre pour la réalisation de surfaces de silicium greffées par des monocouches organiques. Ensuite nous nous consacrons à une étude bibliographique sur les différentes étapes de fonctionnalisation utilisées dans ce travail à fin d'immobiliser l'enzyme.

I. Etat de l'art sur le greffage covalent de groupements organiques sur la surface de silicium

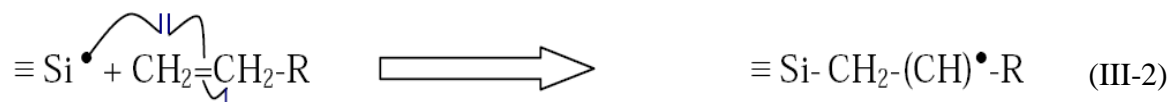
Depuis quelques années, une panoplie de réactions en phase liquide ont été développées, utilisant la surface hydrure de Si et de SiP comme support chimique à travers lequel des groupements organiques ont été greffés de manière covalente [3, 20]. La plus importante de ces réactions est l'hydrosilylation (inspirée de la chimie des silanes moléculaires [20]) qui consiste en l'insertion d'une liaison insaturée carbone-carbone dans la liaison silicium-hydrogène. Par la suite, d'autres méthodes (électrochimiques et autres) ont été développées.

I. 1. Hydrosilylation en présence d'un initiateur

C'est l'équipe de Chidsey qui a réalisé pour la première fois en 1993, un greffage covalent d'une monocouche organique par réaction d'hydrosilylation entre un alcène et une surface de silicium hydrogénée en présence d'un initiateur radicalaire le peroxyde de diacyle ($[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}]_2$), à 100°C pendant 1h [21]. Le mécanisme proposé pour cette réaction dite d'hydrosilylation est de type radicalaire. Les peroxydes sont en effet des espèces bien connues pour produire facilement des radicaux R^\bullet (après départ de CO_2) capables de capter le proton de la liaison Si-H pour donner le radical silyle Si^\bullet .



Le radical formé réagit ensuite rapidement sur la double liaison de l'alcène pour créer la liaison covalente Si-C, le radical se déplaçant sur le carbone de la liaison insaturée n'intervenant pas dans la liaison Si-C (carbone en β).



Le radical carbone va à son tour capter un proton. Le proton le plus proche se situe sur le silicium adjacent. De cette manière, un nouveau radical silyle Si^\bullet est formé et la réaction peut se propager de proche en proche.

I. 2. Hydrosilylation thermique

En poursuivant leurs travaux, Chidsey et son équipe ont montré que la réaction d'hydrosilylation peut avoir lieu sans initiateur [22]. La réaction serait alors initiée par une rupture homolytique de la liaison Si-H sous l'effet du chauffage ($>150^{\circ}\text{C}$), créant ainsi un radical silyle à la surface. Ce radical réagirait ensuite avec l'alcène pour former la liaison Si-C. Ce mécanisme radicalaire est schématisé sur la figure I-1. Différentes molécules ont pu être greffées par hydrosilylation thermique sur les surfaces de silicium [23, 24] et SiP [25-27]. Les surfaces greffées seraient très denses et présenteraient une très bonne stabilité chimique.

I. 3. Hydrosilylation photochimique

L'hydrosilylation peut également être obtenue par un procédé photochimique. En effet, l'irradiation de la liaison Si-H par des UV engendrerait un clivage homolytique de la liaison initiant ainsi l'hydrosilylation d'un composé insaturé. Le groupe de Chidsey a montré que l'irradiation UV (185 et 253,7 nm) d'une surface de silicium hydrogénée pendant 2h à température ambiante, en présence d'alcènes aliphatiques permet le greffage de chaînes alkyles [28] (figure III-1). Le mécanisme proposé est semblable à celui décrit précédemment. Par ailleurs, Stewart et al [29] et Sun et al [30] ont montré qu'une simple source de lumière blanche ($\lambda > 400 \text{ nm}$) à température ambiante suffit pour l'hydrosilylation des alcènes et des alcynes à la surface hydrogénée de SiP photoluminescent en quelques minutes. Dans ce cas le mécanisme n'est pas radicalaire car la lumière blanche n'est pas assez énergétique pour prétendre au clivage homolytique de la liaison Si-H. Les auteurs ont montré que la lumière favorise la formation d'un trou sur la surface qui pourrait réagir avec la liaison nucléophile de l'alcène pour former un β -carbocation qui réagirait ensuite avec un hydrure adjacent.

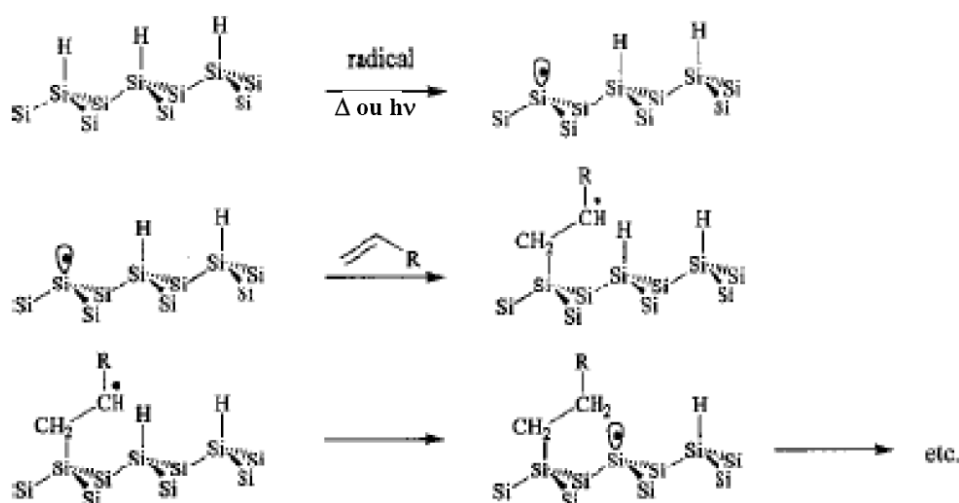


Figure. III. 1. Le mécanisme radicalaire proposé par Chidsey pour la réaction d'hydrosilylation des alcènes.

I. 4. Hydrosilylation induite par micro-ondes

L'utilisation de l'activation par micro-ondes est motivée par le grand impact des récents travaux sur la synthèse organique assistée par micro-ondes sur la réduction des temps de réaction, l'augmentation du rendement et la spécificité.

Boukherroub et al [31] ont développé une méthode de fonctionnalisation de la surface de silicium poreux avec un alcène fonctionnel sous irradiation micro-ondes pour former une monocouche organique attachée de manière covalente à la surface à travers la liaison Si-C. Ils ont montré que l'utilisation de micro-ondes comme source d'énergie mène à l'augmentation significative de la vitesse de la réaction d'hydrosilylation et de la compacité de la couche organique.

I. 5. Hydrosilylation catalysée par des acides de Lewis

D'autres réactions d'hydrosilylation non radicalaires ont été développées. Ces réactions sont catalysées par des acides de Lewis ou des métaux de transition. Buriak et al ont été les premiers à préparer des monocouches organiques par hydrosilylation de surfaces de SiP hydrogénées avec des alcènes, en présence de EtAlCl₂ comme catalyseur, à température ambiante [32, 33]. Par la suite, Boukherroub et al ont appliqué cette méthode aux surfaces de silicium hydrogénées atomiquement planes Si(111)-H [34].

I. 6. Réaction avec un organomagnésien ou un organolithien

Des méthodes, autres que l'hydrosilylation, ont été mises au point pour le greffage covalent de couches organiques à la surface du silicium. Bansal et al ont utilisé des réactifs de Grignard pour modifier une surface de silicium préalablement halogénée [35]. La surface de silicium hydrogénée est exposée au PCl_5 pendant 1h à 100°C . La surface chlorée obtenue réagit ensuite avec des composés R-Li ou RMgX pour former la surface alkyle $\text{Si}(111)\text{-R}$.

I. 7. Procédés électrochimiques

Des méthodes électrochimiques ont été également mises en œuvre. Parmi ces méthodes, le greffage par des réactifs de Grignard (l'équipe de Chazalviel) [36, 37], le greffage par réduction cathodique des sels de diazonium (Allongue et al) [38], le greffage par oxydation ou réduction d'alcynes (l'équipe de Buriak) [39, 40] et le greffage par réduction d'halogénoalcanes (l'équipe de Sailor) [41].

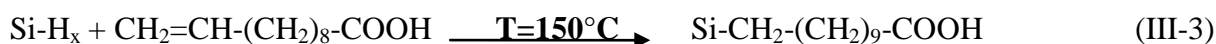
II. Greffage de la monocouche d'acide par Hydrosilylation thermique à la surface de silicium poreux

Les monocouches terminées par un groupement alkyle ou aryle sont inertes et assurent une bonne passivation de la surface de silicium. Cependant, elles ne permettent pas l'introduction de groupements fonctionnels en surface. Or, il est connu en chimie organique que les fonctions amines peuvent se condenser avec les acides carboxyliques par une réaction d'amidation. Par conséquent, une monocouche d'acides carboxyliques greffée serait la surface idéale de départ pour accrocher les enzymes par formation de liaisons amides, puisque ces molécules renferment des fonctions amines dans leurs structures. Dans ce travail, nous avons utilisé la méthode d'hydrosilylation thermique pour le greffage de la monocouche d'acide qui va servir comme surface de départ pour l'accrochage de l'enzyme.

Le choix de la réaction d'hydrosilylation par voie thermique revient principalement à sa facilité de mise en œuvre, à sa grande versatilité de plus la liaison Si-C, très robuste mène à la formation des surfaces greffées très denses et de bonne stabilité thermique.

Pour obtenir des surfaces terminées par des fonctions acides ($-\text{COOH}$) en une seule étape, nous avons utilisé un précurseur acide ω -alcénoïque : l'acide undécylénique ($\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$). Comme nous l'avons cité, l'hydrosilylation consiste à insérer une liaison

insaturée carbone-carbone (C=C) dans la liaison silicium-hydrogène (Si-H) dans ce cas la, le groupement terminal C=C-R-COOH réagirait avec Si-H_x selon la réaction suivante :



Cette réaction est schématisée sur la figure (III-2). Notons que l'échantillon de SiP fraîchement préparé réagit dans l'acide undécylénique chauffé à 150°C pendant 16h.

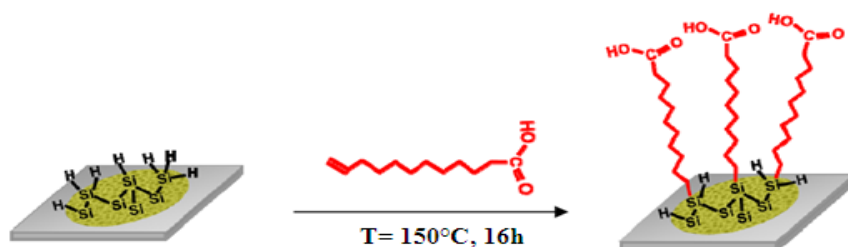


Figure. III. 2. Schéma de la réaction d'hydrosilylation d'acide undécylénique à la surface de silicium poreux.

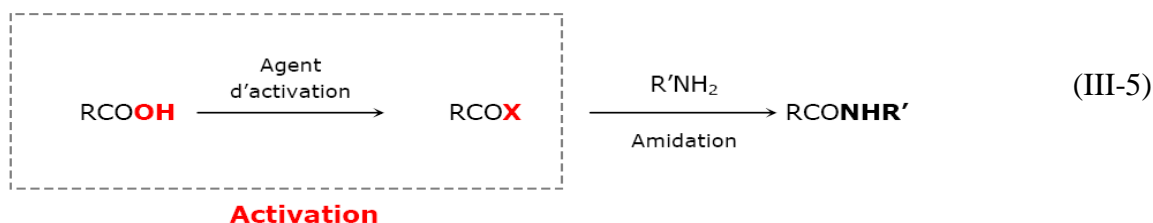
III. Activation des terminaisons acides

Comme il a été dit précédemment, les surfaces terminées par des monocouches d'acides vont servir de surface précurseur pour l'accrochage de l'enzyme par une réaction d'amidation entre les fonctions acides et les fonctions amines -NH₂ contenues dans l'enzyme. Cependant la condensation directe d'un acide carboxylique et d'un groupement amine est thermodynamiquement impossible. En effet, une réaction acido-basique prend place formant un sel stable et l'équilibre est déplacé vers l'hydrolyse plutôt que vers la synthèse comme le montre l'équilibre suivant [42] :



Afin de rendre la réaction d'amidation possible, une étape intermédiaire est nécessaire. Elle consiste à transformer la fonction acide carboxylique en un ester activé en remplaçant le groupement hydroxyle (-OH) de l'acide par un autre groupement plus labile qui part plus facilement sous l'attaque nucléophile de l'amine contenue dans l'enzyme.

Cette étape appelée 'Activation' est schématisée ci-dessous (réaction III-5)



Dans ce travail, nous avons transformé les terminaisons acides en ester de succinimidyle (Ester NHS) par une réaction de la surface acide avec un carbodiimide soluble dans l'eau, le N-éthyl-N'-3 (diméthylamino) propyl carbodiimide (EDC) en présence du N-hydroxysuccinimide (NHS). Cette étape d'activation a largement été utilisée pour mettre au point plusieurs protocoles d'accrochage covalent de biomolécules. Néanmoins, d'autres agents de couplage peptidique similaires peuvent être utilisés [43, 44].

Par ailleurs, afin d'accrocher des biomolécules de façon covalente dans des conditions douces, une autre stratégie consiste à greffer directement un alcène qui contient le groupement fonctionnel d'ester de succinimidyle à la surface du silicium hydrogéné [45-49].

Cependant, cette méthode nécessite une synthèse organique spécifique et coûteuse en temps.

La figure (III-3) montre le schéma de la réaction d'activation des terminaisons acides dans EDC/NHS. L'EDC réagit en premier pour former un intermédiaire très réactif (O-acylisourée) qui réagit à son tour avec le NHS pour donner la surface activée (l'ester de succinimidyle).

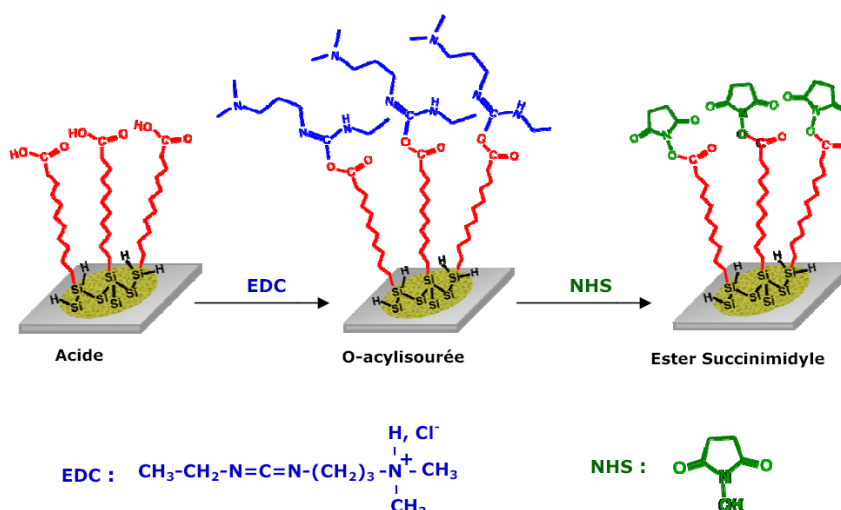


Figure. III. 3. Schéma de la réaction d'activation dans EDC/NHS des terminaisons acides à la surface de SiP.

Cependant, vu la grande réactivité de l'intermédiaire 'O-acylisourée', plusieurs chemins réactionnels sont envisageables, tel il est illustré sur la figure (III-4) [50]. Ce schéma réactionnel est inspiré des réactions établies en phase homogène [44]. Trois réactions rentrent en compétition :

- une attaque nucléophile par le NHS pour former l'ester succinimidyle (2),
- une réaction de l'O-acylisourée avec un groupement carboxylique voisin pour former un anhydride (3),
- un réarrangement irréversible par transfert d'acyl intramoléculaire pour former le N-acylurée (4).

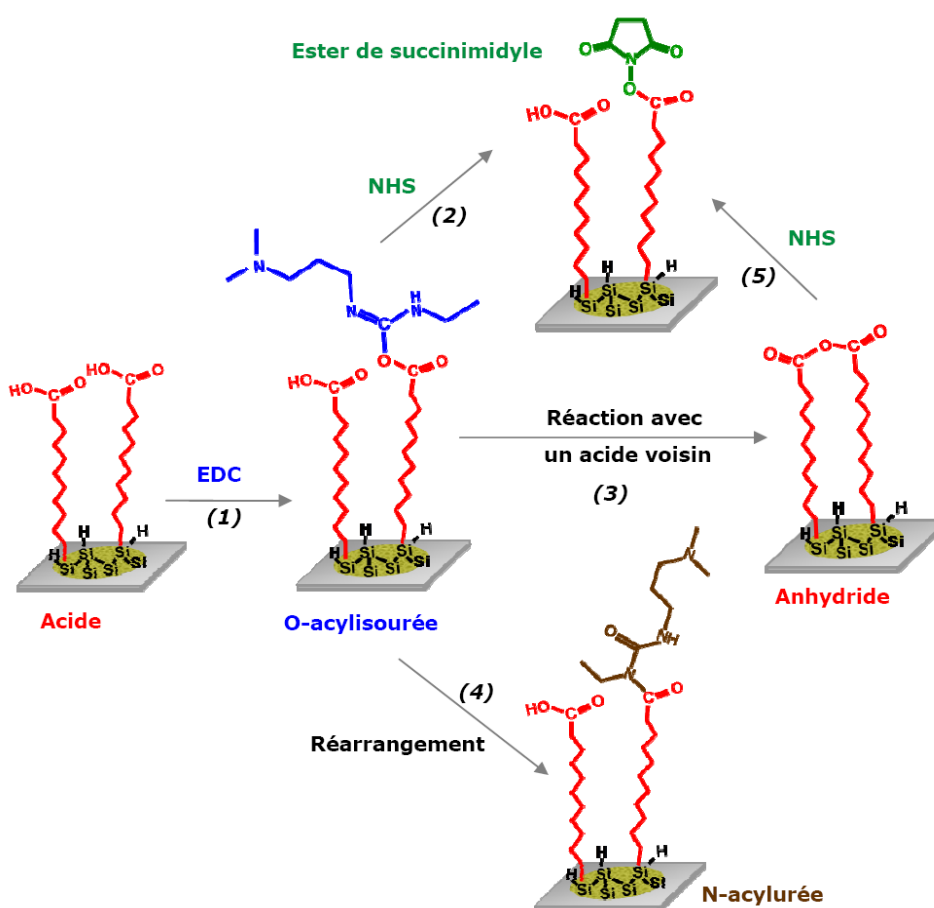


Figure. III. 4. Résumé du schéma réactionnel de formation des produits secondaires lors de l'activation (formation de l'ester succinimidyle) des surfaces acides dans EDC/NHS.

L'existence de ces différents chemins réactionnels provoque la formation de produits secondaires à la surface. Afin d'obtenir des surfaces parfaitement activées et exemptes de tous les produits indésirables, une étude approfondie a été menée par S.SAM et al [16] sur la transformation des terminaisons acides d'une monocouche moléculaire greffée à la surface de SiP en un ester de succinimidyle (surface activée) par le traitement EDC/NHS.

Les concentrations respectives en EDC et en NHS ont été rigoureusement déterminées afin de permettre une activation complète des chaînes acides et d'éviter la formation de produits secondaires indésirables à la surface. Il apparaît que les conditions optimales pour l'activation correspondent particulièrement à des concentrations équimolaires en EDC et NHS se trouvant comprises entre 5 et 10 Mm [16]. Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé d'adopter ce procédé expérimental qui permet une réaction d'activation totale sur le silicium poreux.

IV. Immobilisation de l'enzyme

Après l'étape d'activation qui consiste à transformer la fonction acide carboxylique en un ester activé, il reste la dernière étape qui consiste à accrocher l'enzyme à la surface du silicium poreux. L'immobilisation de l'enzyme se fait via une réaction d'amidation entre les terminaisons acides activées et les fonctions aminées NH_2 contenues dans l'enzyme [51] (figure III-5).

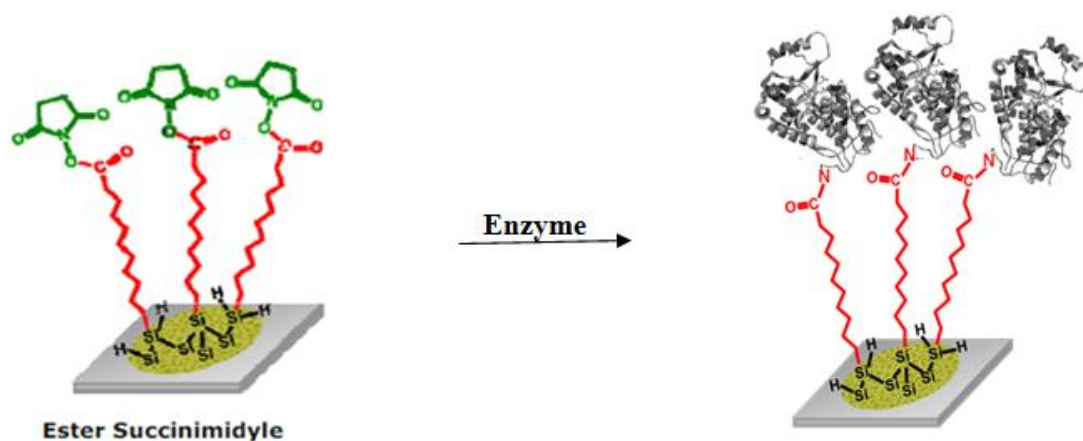


Figure. III. 5. Représentation schématique de l'accrochage de l'enzyme par amidation.

L'enzyme à immobiliser devra respecter un certain nombre de contraintes, particulières :

- Elle devra si possible être peu couteuse et bien documentée dans la littérature.
- Elle devra former sur cette surface une monocouche contrôlée en densité.
- Elle devra former une monocouche enzymatiquement active.
- Elle devra évidemment être stable dans le temps : pas de dénaturation thermique trop rapide à l'ambient, pas de sensibilité exacerbée au milieu extérieur, ou de besoin impérieux de milieu stérile.

Dans le cadre de cette thèse, afin de remplir au maximum les contraintes ci-dessus, nous avons décidé de travailler avec l'enzyme Horseradish Peroxidase. Elle est plus connue sous

l'appellation peroxydase de raifort. Cette enzyme est extraite à partir de la racine d'une plante, le raifort, *Armoracia rusticana*. Il s'agit d'une plante vivace cultivée dans les régions tempérées du monde, connue principalement pour les vertus culinaires de ses racines [52]. La peroxydase de raifort (HRP) (donneur d'hydrogène) appartient à la classe III de la superfamille des peroxydases qui comprennent les peroxydases d'origine bactérienne, fongique et végétale. Dans la littérature, le terme de « peroxydase de raifort » est générique. En effet, il existe dans la racine de cette plante 30 enzymes présentant des séquences d'acides aminés différentes mais catalysant la même réaction chimique. La HRP est une mono chaîne polypeptidique de 308 résidus d'acides aminés ainsi que deux types de centre métalliques : l'hème, un cofacteur se composant d'un atome de fer contenu dans le centre d'un grand noyau hétérocyclique organique et deux atomes de calcium qui sont essentiels pour la structure et les fonctions de l'enzyme (figure III-6). La perte de ces deux atomes de calcium se traduit par la diminution de l'activité et de la stabilité thermique de l'enzyme [52]. Son poids moléculaire est de 44kDa [53], le pH optimal d'activité est de 6 à 6.5, mais elle conserve 84% de son activité à pH 7.5 [54].

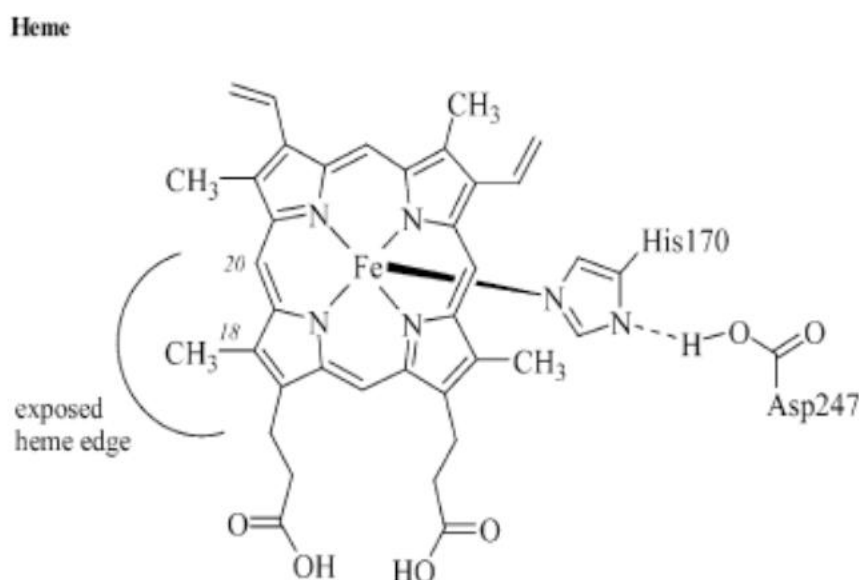


Figure. III. 6. Chaîne peptidique à la base de l'activité catalytique de la HRP

- La HRP est une enzyme peu connue et très bien documentée dans la littérature.
- Cette enzyme catalyse les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir un peroxyde (par exemple ROOR' ou H₂O₂) comme oxydant [55]. Le mécanisme réactionnel va être décrit en détail dans le premier chapitre de la quatrième partie de cette thèse.

- De plus, il s'agit d'une petite enzyme : son poids moléculaire est faible et ses dimensions sont celles d'un parallélépipède rectangle de 4.0 nm x 6.7 nm x 11.7 nm de rayon de giration de 2.65 nm [56]. Ceci facilitera une bonne densité de greffage. Des mesures ellipso-métriques et d'AFM [56] montrent que la densité à saturation de la monocouche « quasi dense » de HRP adsorbée sur du silicium est de $\Gamma = 3,4 \cdot 10^{12}$ molécules/cm², soit une aire par enzyme de 2.93 nm² en accord avec d'autres résultats expérimentaux montrant que les HRP se mettent sur leur « petit côté », c'est à dire la face de 4 nm x 6.7 nm adsorbée sur le substrat. Ces mesures permettent de mesurer la présence ou non des enzymes mais ne permettent pas de déterminer si elles sont enzymatiquement actives ou non. Des mesures complémentaires pour déterminer les taux d'activité et les vitesses de réactivité conduites à l'air par spectrophotométrie UV-visible ont conclu que 78% des HRP en surface sont actives (par greffage covalent) [57]. D'autres auteurs ont conclu que la HRP adsorbée en surface perd de 50% à 93% de son activité enzymatique [56, 58], ceci est dû aux réorganisations spatiales de sa chaîne dues à la proximité du substrat.
- Cette enzyme se trouve être assez pérenne puisque 81.5% de HRP adsorbée est encore active après 45 jours [57].

Il y a cependant quelques inconvénients à utiliser la HRP auxquels il faudra prendre garde lors de son utilisation :

- La HRP étant à la base du système de défense de nombreux organismes : elle oxyde, en présence de H₂O₂, les organismes ennemis, elle doit être manipulée préférentiellement en milieu relativement stérile sinon elle peut être lysée par les bactéries du milieu.
- De plus, elle catalyse la réaction d'oxydation de l'eau oxygénée mais elle peut être empoisonnée par cette dernière en quantités trop importantes.

**PARTIE. II. PRÉPARATION DES COUCHES FONCTIONNALISÉES
DU SILICIUM POREUX**

Afin d'initier l'étude électrochimique qui va être présentée dans le dernier chapitre de ce travail, un système redox simple qui est le ferrocène a été immobilisé à la surface plane de silicium monocristallin d'orientation (111).

Nous décrivons dans un premier temps les surfaces hydrogénées et les surfaces terminées par des monocouches acides, avant de nous intéresser à l'étape de couplage. La caractérisation chimique de l'interface sera obtenue grâce à l'utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR.

Nous allons par la suite présenter dans la deuxième partie, les techniques et les moyens expérimentaux exploités pour la fonctionnalisation des couches poreuses du silicium. L'étape finale menant à l'immobilisation de l'enzyme choisie, la HRP, via une réaction d'amidation à température ambiante est précédée par deux autres étapes qui consistent à greffer une monocouche d'acide par hydrosilylation thermique de l'acide undécylénique, suivie par l'activation des terminaisons acides à basse température en présence des agents de couplage EDC/NHS.

Pour chacune de ces trois étapes, des analyses par spectroscopie infrarouge et par mesure de l'angle de contact ont été réalisées dans le but de vérifier le succès des procédés expérimentaux menés.

Avant chaque utilisation la verrerie est soigneusement lavée au détergeant et aux solvants (acétone, éthanol) afin d'éliminer toute contamination organique. La verrerie est ensuite rincée à l'eau DI puis séchée pendant toute une nuit à l'étuve. Il faut travailler en absence totale d'eau et d'oxygène afin d'éviter toute oxydation de la surface. Pour l'ensemble des réactions effectuées, toutes les solutions ont été dégazées, sous azote dans un Schlenk.

I. Le couplage thermique des ferrocènes à la surface de H-Si(111)

L'étude présentée dans cette partie du travail se concentrera sur des substrats orientés selon la face (111). Le choix de cette face cristallographique s'appuie sur la possibilité d'obtenir, pour cette orientation, des surfaces planes à l'échelle atomique par dissolution anisotrope du silicium lors de l'hydrogénation de celles-ci en milieu alcalin. Ce type de substrat apparaît ainsi idéal pour la réalisation d'une chimie de surface contrôlée qualitativement et quantitativement permettant l'obtention de couches organiques compactes.

I. 1. Les surfaces de silicium (111) hydrogénées

I. 1. 1. Introduction

Depuis la fin des années 60, on sait qu'après un traitement désoxydant dans l'acide fluorhydrique HF, le silicium est passivé par une couche superficielle [59, 60]. De nombreuses équipes de recherche se sont ensuite intéressées à la caractérisation de ces couches, mettant en évidence la présence d'une monocouche de liaisons Si-H à la surface [61-67]. Beaucoup de travaux ont été réalisés pour comprendre le mécanisme de dissolution du silicium [65, 68-71]. En 1995, Allongue a mis en évidence la coexistence de deux voies réactionnelles de dissolution dans NH_4F [72]. Une réaction chimique avec une cinétique beaucoup plus rapide sur les sites de crans et de bords de marche que sur les terrasses. Cette réaction est très anisotrope et dépend peu du potentiel électrochimique. Elle consiste à oxyder le silicium par les molécules de H_2O qui réagissent préférentiellement sur les sites de crans et les bords de marche pour des raisons stériques. La seconde réaction, électrochimique, a en revanche lieu de façon presque aléatoire sur la surface et consiste en la rupture électrochimique de la liaison Si-H. L'hydrogène est alors remplacé par un groupement hydroxyle pour former une liaison Si-OH. Le fluor attaque ensuite la liaison Si-OH formée. Des molécules d'eau s'insèrent alors dans les liaisons arrières Si-Si, rendues réactives par la polarité de la liaison Si-F. Ainsi un atome de silicium est détaché de la surface et les liaisons Si-H se reforment à la surface. Afin de favoriser la réaction chimique le traitement doit se faire à des pH compris entre 8 et 9, favorisant ainsi la formation d'une surface atomiquement Plane [68-70]. Il a enfin été montré que l'oxygène dissous affecte notablement la topographie de surface en initiant la formation de piqûres sur les terrasses. L'ajout d'ions sulfites SO_3^{2-} dans la solution, réduisant l'oxygène dissous, permet de s'affranchir de ce problème [73].

I. 1. 2. Procédure expérimentale

L'étape d'hydrogénation du silicium est une étape critique, qui nécessite des substrats et des produits de grande qualité. Dans le cadre de cette étude, nous avons travaillé avec des échantillons de silicium Si(111) de type n, dopés au phosphore. Ce silicium présente une résistivité de 10 à 30 Ω cm et une épaisseur comprise entre 500 et 550 μ m.

Des échantillons de 13x18 mm² sont découpés à partir d'une plaquette de silicium à l'aide d'une pointe en diamant. Dans le cas des mesures FTIR, on utilise des cristaux de silicium purifiés par le procédé de zone fondue « Float Zone » (FZ), pour minimiser la quantité d'oxygène contenue dans le volume [74-77].

Ainsi, pour la caractérisation infrarouge en géométrie ATR, les échantillons sont façonnés en forme de prisme. La zone supérieure de l'échantillon est dépolie pour y privilégier l'attaque électrochimique et ainsi garder la planéité atomique lors de l'hydrogénation de la partie polie.

L'étape d'hydrogénation se fait en deux étapes :

- Une étape de nettoyage, durant laquelle l'échantillon et la verrerie sont nettoyés à 100°C dans une solution dite de Piranha, 1 : 3 H₂O₂ : H₂SO₄ (H₂O₂, 30% et H₂SO₄, 96% fournis par Carlo Erba). Cette étape permet de supprimer toutes les impuretés organiques et de former une couche d'oxyde à la surface. Le tout est soigneusement rincé à l'eau ultra pure (MilliQ, 18,2 M Ω cm à 25°C), afin d'éviter toute contamination organique pouvant limiter la dissolution du silicium.

Une étape de décapage, qui consiste ensuite à enlever la couche d'oxyde obtenue à la surface du silicium et à former la monocouche Si(111)-H par dissolution du silicium. L'attaque s'effectue dans une solution de fluorure d'ammonium NH₄F40% dans laquelle une faible quantité de sulfite d'ammonium a été dissoute est préalablement homogénéisée aux ultrasons pendant 10 mn, dans un bécher en polytétrafluoroéthylène (PTFE).

L'échantillon y est ensuite immergé 15 mn. Par la suite, la surface est rincée abondamment à l'eau ultra pure et séchée sous un flux d'azote. La surface Si-H obtenue est très hydrophobe.

I. 2. Hydrosilylation photochimique de l'acide undécylénique à la surface hydrogénée de silicium

Dans cette partie le greffage des groupements carboxyles $-\text{COOH}$ de l'acide undécylénique sur les surfaces hydrogénées de Si se fait par voie photochimique (irradiation par l'UV à $\lambda=312$ nm)

I. 2. 1. Procédure expérimentale

Comme pour les surfaces hydrogénées, afin d'éliminer toutes les contaminations organiques, la verrerie est soigneusement et successivement lavée à l'éthanol, à l'eau avec un dégraissant, à l'eau osmosée (15 M Ω cm) contenant du détergent TFD4 puis enfin abondamment rincée à l'eau MilliQ (ultrapure 18,2 M Ω cm). Il est important de travailler en milieu sec pour éviter la formation d'une couche d'oxyde sur la surface de silicium. Afin de prévenir la formation d'oxyde, l'ensemble de la verrerie et des solutions est dégazé à chaud sous argon.

La surface Si-H doit être préparée le plus tard possible pour éviter une éventuelle oxydation du silicium avant le début du greffage. L'hydrogénation du silicium est donc réalisée au dernier moment.

Dans un tube de Schlenk préalablement dégazé 5 minutes à 100°C, la solution d'acide undécylénique est introduite puis dégazée à son tour pendant 30 minutes. Le tube de Schlenk est ensuite refroidi à température ambiante pendant 15 minutes avant d'y introduire la surface hydrogénée fraîchement préparée. Une fois l'échantillon introduit, le dégazage continu quinze minutes avant de fermer le tube de Schlenk.

Pour réaliser un greffage photochimique, le Schlenk est placé pendant trois heures dans un réacteur UV (figure III-7). Celui-ci est constitué d'une chambre métallique contenant 8 tubes UV ($\lambda=312$ nm). La puissance d'irradiation fournie à l'échantillon est de 6 mWcm⁻². Après le temps imparti, le tube de Schlenk est refroidi à température ambiante. L'échantillon est ensuite rincé 2 fois pendant 15 mn à l'acide acétique chauffé à 75°C sous argon.

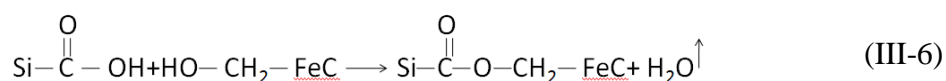


Figure. III. 7. Photographie du réacteur UV utilisé pour le greffage photochimique.
a) une vue d'intérieur b) une vue d'extérieur

I. 3. Le couplage des molécules de ferrocène sur les surfaces acides de silicium

I. 3. 1. Introduction

La réaction de couplage a été réalisée pendant 3h et 15h, sur les surfaces acides de silicium à une température de 100°C. Le couplage des molécules de ferrocène se fait par une réaction d'estérification entre les ferrocèneméthanol et les terminaisons acides selon la réaction suivante :



Le chauffage à 100°C permet de mener la réaction dans le sens de couplage et élimine par conséquent la formation du processus réversible de la réaction.

I. 3. 2. Procédure expérimentale

La solution de couplage a été préparée dans un volume de 30 ml de toluène, ou nous avons dissous 10mM de ferrocèneméthanol (Fec-MeOH) et 1mM de p-Toluène Sulfonic acidmonohydrate (TSOH).

La réaction de couplage a été réalisée également dans un schlenk, ce dernier est branché avec un réfrigérant afin de pouvoir condenser la solution de couplage évaporée.

La réaction de couplage des molécules de ferrocènes se fait en plusieurs étapes :

30 ml de solution de couplage est introduite dans un Schlenk sous barbotage d'argon. Après 15 min, on introduit la surface greffé et on laisse purger pendant 15 min à température ambiante. Sans fermer le Schlenk on le place dans un bain d'huile chauffé à une température de 100°C. Le dégazage du Schlenk continue durant toute la réaction de couplage.

Une fois la réaction terminée, le Schlenk est retiré du bain d'huile et laissé refroidir à température ambiante sous la hotte. La surface de Si couplée au ferrocène est retirée de la solution de couplage et rincée deux fois sous barbotage d'argon pendant 15min, dans l'acétonitrile à 70°C (bain Marie). La surface rincée est séchée sous un flux d'azote.

I. 4. Caractérisation IR en mode de réflexion totale (ATR)

Sur la figure (III-8) sont présentés les différents spectres infrarouge à transformée de Fourier, en géométrie ATR, correspondant à la surface acide de silicium après greffage photochimique des groupements carboxyliques (figure III-8-a) et à la surface de silicium modifiée par des ferrocènes après 3h et 15h de couplage (figure III-8-b et figure III-8-c). Ces spectres ont été enregistrés en polarisation p dans la zone 1000-3050 cm^{-1} . La référence étant la surface hydrogénée, le pic négatif à 2083 cm^{-1} indique la disparition des liaisons Si-H. L'encombrement stérique des molécules ne permet pas la substitution complète de ces liaisons. En effet, le diamètre des molécules que l'on souhaite greffer à la surface est environ égal à 4,3 Å, alors que la distance entre 2 liaisons Si-H est de 3,84 Å [78, 79]. Théoriquement 50% des groupements Si-H peuvent être substitués.

Le greffage de la surface (figure III-8-a) est confirmé par la présence des bandes associées aux vibrations des différentes liaisons du groupement $-\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{COOH}$. La bande intense à 1710 cm^{-1} est caractéristique du mode de vibration d'élongation de la liaison C=O, alors que les faibles bandes à 1290 et 1415 cm^{-1} sont associées aux vibrations du groupement fonctionnel C-OH. Les bandes situées à 2850 et 2920 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements CH_2 . La déformation de cette liaison dans le plan H-C-H δCH_2 est aussi visible à 1465 cm^{-1} . Dans la région située entre 1000 et 1200 cm^{-1} , on note la présence des bandes caractéristiques de l'oxyde de silicium.

A partir des deux spectres (b et c) de la figure (III-8), nous avons observé une décroissance significative de la bande caractéristique de la liaison C=O à 1710 cm^{-1} , en fonction du temps de couplage. Cette décroissance a été accompagnée par la formation d'un épaulement vers 1742 cm^{-1} . Ceci peut être une indication d'une transformation partielle des terminaisons

acides en ester. Cependant aucun signe clair indiquant l'accrochage des molécules de ferrocène n'a été illustré.

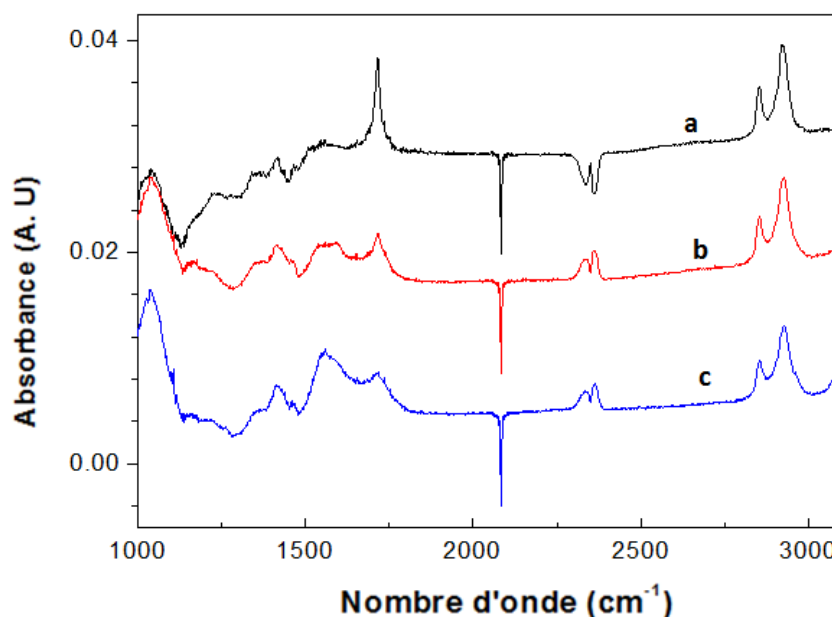


Figure. III. 8. Spectre infrarouge en géométrie ATR a) après greffage photochimique d'une monocouche d'acide, b) après 3h de couplage de ferrocène, c) après 15h de couplage de ferrocène.

II. Fonctionnalisation des couches poreuses de silicium

II. 1. Greffage de chaînes acides par hydrosilylation thermique

II.1. 1. Procédure expérimentale

Rappelons que dans cette partie, nous avons privilégié la méthode d'hydrosilylation thermique pour le greffage de la monocouche d'acide undécylénique ($\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$) qui va servir comme surface de départ pour l'accrochage de l'enzyme. Le mode opératoire pour le greffage de la monocouche d'acide est le suivant :

L'échantillon de SiP est préparé juste avant le greffage afin d'éviter toute oxydation de la surface à l'air. Dans un Schlenk (Figure III-9-a) préalablement dégazé sous azote pendant 5 min, on place 10 ml d'acide undécylénique qu'on laisse dégazer à son tour pendant 15 min. Par la suite, on introduit la surface de SiP fraîchement préparé dans l'acide undécylénique toujours sous barbotage d'azote à température ambiante pendant 15 min. Le Schlenk est fermé hermétiquement grâce à ses robinets en téflon, placé dans un bloc d'aluminium chauffé à

150°C et laissé réagir pendant 16h (figure III-9-b). Lorsque la réaction est terminée, le Schlenk est retiré du bloc d'aluminium et laissé refroidir à température ambiante sous la hotte.

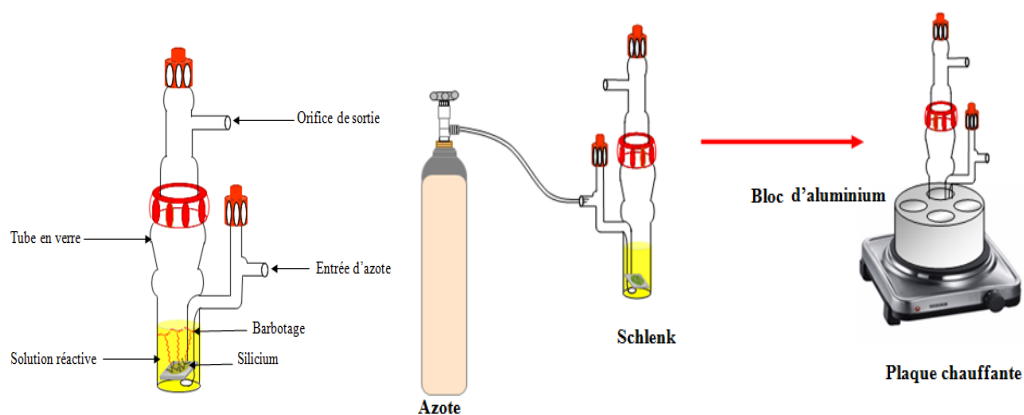


Figure. III. 9. a. Schéma du Schlenk utilisé pour le barbotage.

Figure. III. 9. b. Montage utilisé pour le greffage thermique.

La surface de SiP fonctionnalisée est retirée de la solution de greffage et rincée deux fois sous barbotage d'azote pendant 30 min, dans l'acide acétique à 75°C (bain Marie). L'acide acétique est préalablement dégazé à l'argon avant l'introduction de l'échantillon. La surface rincée est récupérée dans un bécher contenant l'acide acétique chaude puis elle est séchée sous un flux d'azote. L'étape de rinçage dans l'acide acétique est très importante, car il a été observé que des molécules d'acide undécylénique n'ayant pas réagi restent adsorbées à la surface acide greffée par de fortes liaisons hydrogènes, formant ainsi une bicouche en surface [19]. Le rinçage de la surface par les solvants usuels (THF, CH_2Cl_2) (figure III-10-a) s'est avéré inefficace. Seul l'acide acétique utilisé à chaud a permis, par substitution, de casser les liaisons hydrogènes, éliminant ainsi les molécules d'acide non greffées (figure III-10-b).

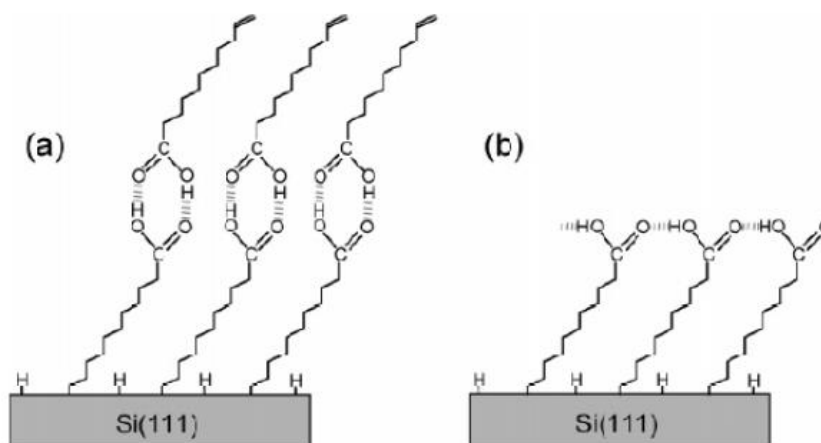


Figure. III. 10. Surface de silicium modifiée par un acide : a) Après un rinçage avec CH_2Cl_2 . b) Après un rinçage avec CH_3COOH [19].

II.1. 2. Caractérisation par angle de contact du SiP après greffage de l'acide

Après la réaction de la surface du SiP dans l'acide undécylénique, nous constatons une diminution de la valeur de l'angle de contact à 53° (Figure III-11, tableau III-1) par rapport à celle obtenue pour le SiP fraîchement préparé (115°). Ceci confirme la formation des liaisons avec des terminaisons polaires sur la surface du silicium poreux [53].



Figure. III. 11. Photographie de $1\mu\text{L}$ d'une goutte d'eau déposée sur la surface du SiP après greffage de l'acide.

Tableau. III. 1. Valeur de l'angle de contact déterminée après greffage de la monocouche acide.

II.1. 3. Caractéristiques FTIR du SiP après greffage de l'acide

Le spectre infrarouge d'une surface de silicium poreux modifié par l'acide undécylénique est représenté sur la figure (III-12-b). Par comparaison, le spectre de la figure (III-12-a) montre les bandes d'absorbance infrarouge du SiP avant fonctionnalisation. Nous pouvons voir que de nouvelles bandes apparaissent sur le spectre de la surface greffée (figure III-12-b).

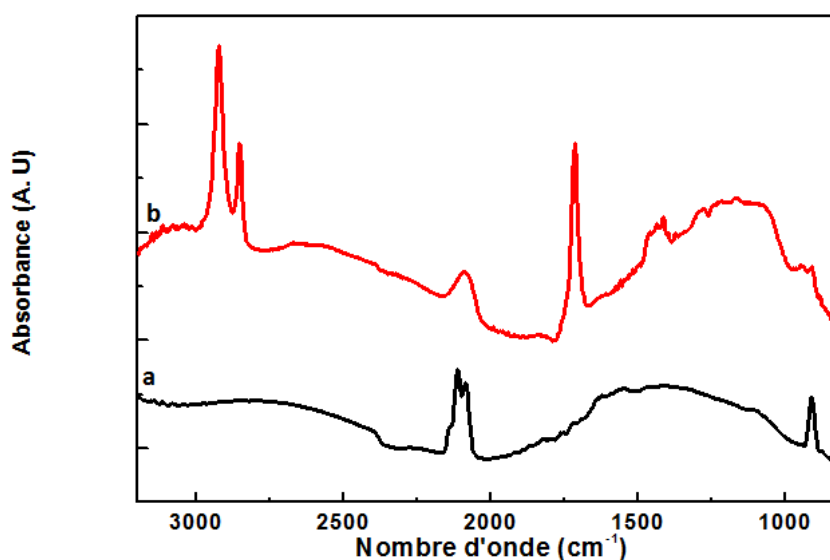


Figure. III. 12. Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique.

Les bandes à 2855 et 2925 cm^{-1} sont associées respectivement aux modes d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements méthylène des chaînes carbonées (CH_2) [19, 80]. Les modes de vibration de déformation correspondant, apparaissent vers 1460 cm^{-1} . La bande intense vers 1710 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison $\text{C}=\text{O}$ du groupe carboxylique [17, 80]. Ce qui prouve la présence d'acide sur la surface. Les bandes situées à 1280 et 1415 cm^{-1} , sont associées aux vibrations du groupement fonctionnel $\text{C}-\text{OH}$ [17, 19]. Ceci montre que les fonctions acides sont préservées lors du greffage, et que ce dernier s'opère bien par la double liaison $\text{C}=\text{C}$.

L'absence de bandes d'oxyde ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$) dans la région 1000-1200 cm^{-1} montre que le greffage de l'acide dans ces conditions n'est accompagné d'aucune oxydation de la surface de silicium [81, 82]. La surface est donc parfaitement préservée de toute dégradation au cours du processus de greffage par hydrosilylation thermique, ce qui montre la pertinence de cette méthode pour la préparation d'une monocouche d'acide à la surface de SiP.

Notons enfin la diminution significative de l'intensité des bandes correspondant aux vibrations des liaisons $\text{Si}-\text{Hx}$ à la surface de SiP (figure III-12-a). Ceci est dû à la consommation de celles-ci lors de la réaction d'hydrosilylation pour former les liaisons $\text{Si}-\text{C}$. Toutefois, ces bandes demeurent observables dans le spectre après la réaction de greffage, ce qui montre que seule une partie des liaisons $\text{Si}-\text{Hx}$ a réagi (figure III-12-b). L'encombrement stérique entre les longues chaînes acides greffées en surface limiterait la consommation totale de toutes les liaisons $\text{Si}-\text{Hx}$ présentes en surface [83].

II.2. Activation des terminaisons acides

II.2. 1. Procédure expérimentale

L'activation est l'étape intermédiaire avant de pouvoir accrocher l'enzyme aux terminaisons acides par formation de la liaison amide.

Dans ce travail, l'activation est réalisée en transformant les terminaisons acides en ester de succinimide en utilisant le N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de l'agent de couplage N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) dans une solution aqueuse. L'EDC est un produit instable qui se dégrade rapidement par hydrolyse. Il est conservé sous atmosphère d'azote à -20°C . Par conséquent, les solutions d'EDC et de NHS sont préparées dans de l'eau froide juste avant la réaction afin de ralentir l'hydrolyse de l'EDC. Un mélange d'EDC et de NHS avec les concentrations appropriées (tableau III-2) est dégazé sous azote

pendant 15 min dans un Schlenk placé dans un bain marie à 15°C. La surface fraîchement greffée par des terminaisons acides est introduite dans le Schlenk et laissée réagir sous un barbotage continu d'azote à 15°C (Figure III-13). Après 90 min de réaction, la surface activée est retirée du Schlenk, rincée abondamment à l'eau DI et séchée sous un flux d'azote.

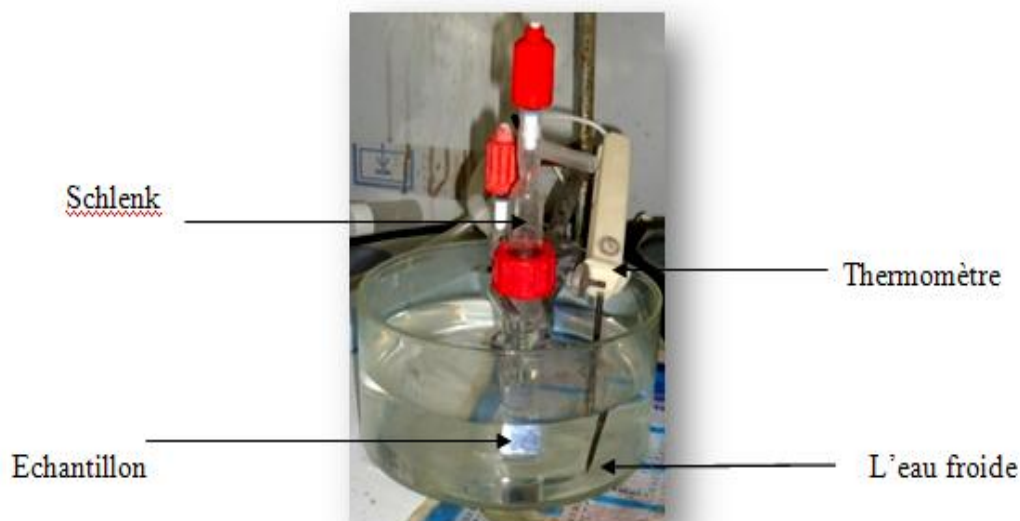


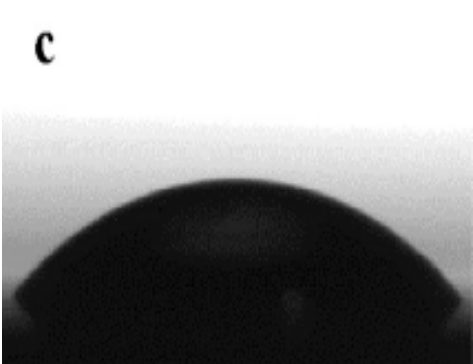
Figure. III. 13. Montage utilisé pour l'activation.

Produits	Masse molaire (g/mol)	Concentration molaire des solutions préparées (Mol/l)	Masses utilisées (g) pour 10 mL
(NHS) N-hydroxysuccinimide $C_4H_5NO_3$ (97%)	115.9	10^{-2}	0.01185
(EDC)-N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (98%)	191.7	10^{-2}	0.01917

Tableau. III. 2. Les concentrations molaires et les masses correspondantes lors de l'activation

II.2. 2. Caractérisation par angle de contact des surfaces activées

De même, l'activation des terminaisons acides après traitement de la surface dans EDC/NHS est confirmée par la diminution de l'angle de contact (45°) (Figure III-14, tableau III-3) attestant de la transformation des acides en ester de succinimidyle, plus polaire [53].



	angle gauche	angle droit	Moyenne	Cos	T (°C)
PSi-activé	45	45	45	0.707	20.0

Figure. III. 14. Photographie de 1 μ L d'une goutte d'eau déposée sur la surface de SiP après la réaction d'activation.

Tableau. III. 3. Valeur de l'angle de contact déterminée après activation des terminaisons acides.

II.2. 3. Caractéristiques FTIR des surfaces activées

La formation de l'ester de succinimide après activation de la surface acide dans EDC/NHS est évidente par l'apparition d'un triplet caractéristique dans la région du spectre qui correspond aux vibrations d'élongation des carbonyles (C=O) (figure III-15-c). La bande la plus intense de ce triplet, vers 1745 cm^{-1} est attribuée au mode antisymétrique des deux carbonyles du cycle NHS, et la bande vers 1785 cm^{-1} est attribuée au mode symétrique correspondant. La bande la moins intense vers 1818 cm^{-1} correspond au mode de vibration d'élongation du carbonyle de l'ester [16]. La forte atténuation de la bande caractéristique de l'acide vers 1710 cm^{-1} (figure III-15-b), montre que la majorité des groupements acides ont été transformés en ester de succinimide [16].

D'autres bandes caractéristiques apparaissent vers les faibles énergies, comprenant les modes de vibration d'élongation antisymétrique et symétrique du groupement C-N-C du cycle NHS vers 1205 et 1371 cm^{-1} et le mode de vibration d'élongation du groupement C-ON vers 1080 cm^{-1} [16].

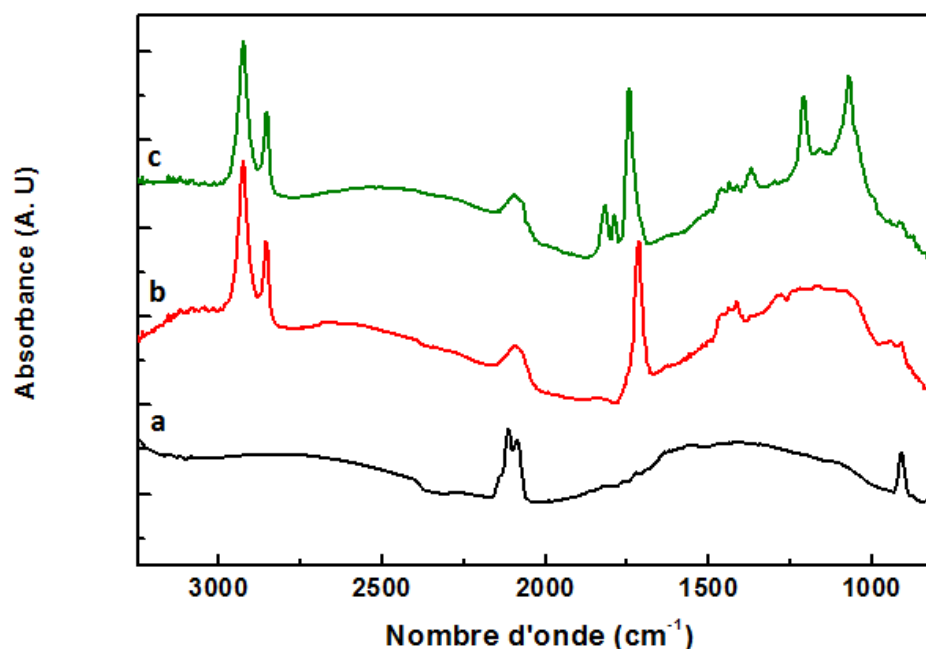


Figure. III. 15. Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique. c) après activation des terminaisons acides.

II.3. Immobilisation de la HRP

II.3. 1. Procédure expérimentale

Cette partie présente la dernière étape de cette série de réactions chimiques et consiste à immobiliser la HRP via une réaction d'amidation entre les terminaisons acides activées (l'ester de succinimidyle) et le groupement amine primaire contenu dans l'enzyme.

La solution de la HRP a été préparée dans une solution tampon de PBS de 0,06 M (phosphate buffer solution) à un pH = 7. L'immobilisation de la HRP a été réalisée par immersion de la couche de SiP activée dans le PBS contenant la HRP à une concentration de 5mg/ml, pendant une nuit à température ambiante. L'électrode à enzyme immobilisée est ensuite lavée avec le PBS et stockée dans le même tampon à une température de 4°C entre les utilisations. La figure (III-16) résume les différentes étapes de fonctionnalisation du silicium poreux pour l'immobilisation de la HRP.

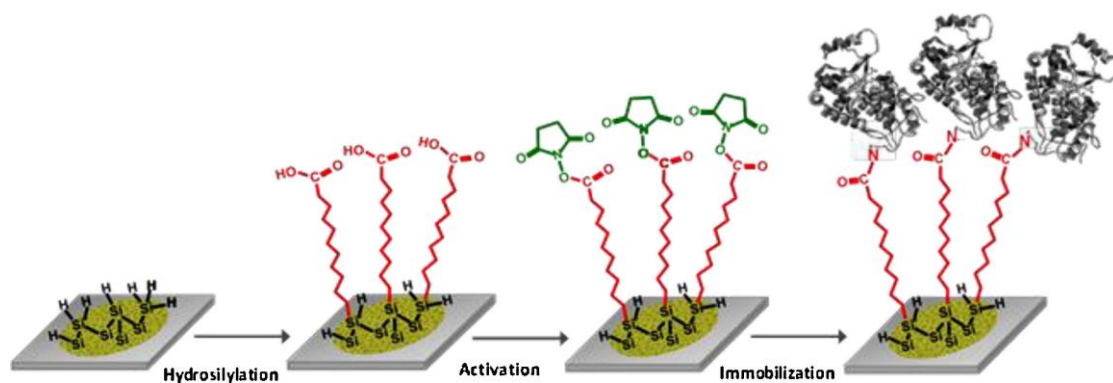


Figure. III. 16. Schéma des différentes étapes de l'immobilisation de la HRP sur SiP.

II.3. 2. Caractérisation par MEB des surfaces immobilisées avec HRP

Sur la figure (III-17) sont présentées, les photos MEB de la surface de silicium mésoporeux fraîchement préparée (figure III-17-a) et la surface de SiP après immobilisation de la HRP (figure III-17-b). La figure III-17-b révèle une modification significative de la surface du SiP. Nous pouvons clairement constater l'immobilisation des enzymes à la surface du silicium poreux de manière très homogène sur toute la surface. De plus la structure poreuse est conservée; l'entrée des pores n'a pas été obstruée. Les spots de contraste plus clair sont probablement dus à des enzymes qui n'ont été greffé mais qui sont restées adsorbées à la surface même après rinçages.

Par ailleurs, il faut noter que les modifications de surface survenues après greffage des groupements carboxyliques, et après activation de ces terminaisons acides (non illustré), n'ont pas pu être observées par les analyses MEB. Ceci est dû, contrairement aux enzymes, aux petites dimensions de ces molécules qui ne peuvent pas être discernées par le grossissement du MEB utilisé.

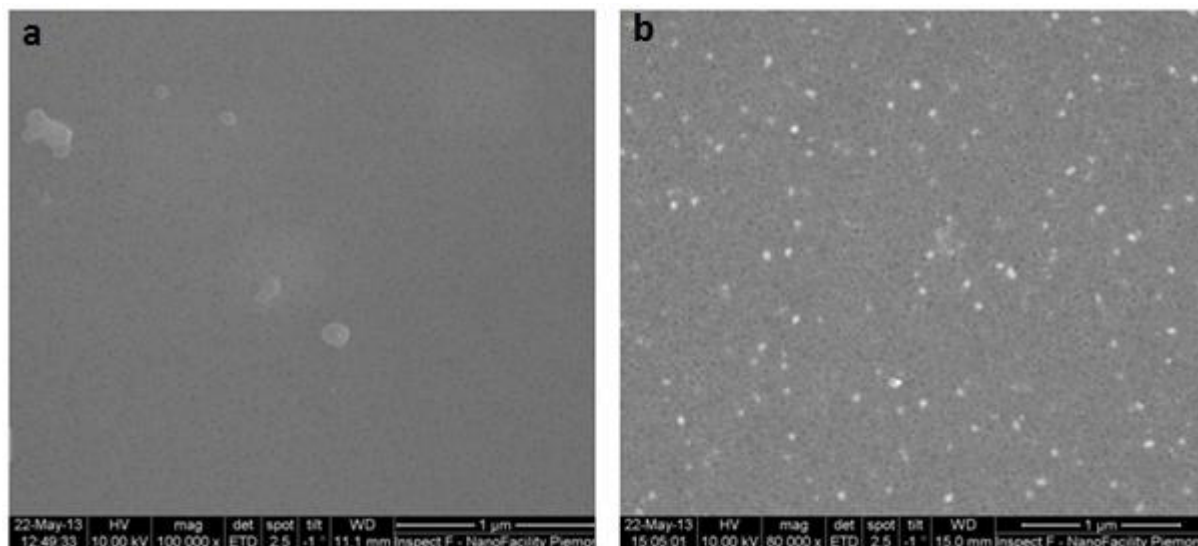


Figure. III. 17. Micrographies au MEB du silicium méso-poreux :
a) fraîchement préparé, b) après immobilisation avec HRP.

II.3. 3. Caractérisation par mesure de l'angle de contact des surfaces immobilisées avec HRP

L'accrochage de l'enzyme qui contient une multitude de fonctions polaires, est évident par la faible valeur de l'angle de contact enregistrée (23°) [53] (Figure III-18, tableau III-4).



Figure. III. 18. Photographie de $1\mu\text{L}$ d'une goutte d'eau déposée sur la surface du SiP immobilisée par l'enzyme.

Tableau. III. 4. Valeur de l'angle de contact déterminée après immobilisation de la HRP à la surface activée du SiP.

II.3. 4. Caractérisation par FTIR des surfaces immobilisées avec HRP

La figure (III-19) montre les spectres FTIR pour les différentes étapes de greffage de la HRP. Après la réaction d'amidation de la HRP avec la surface du SiP activé, le spectre FTIR correspondant (Figure III-19-d), montre la disparition du triplet caractéristique de l'ester de succinimidyle et l'apparition de deux bandes vers 1665 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} . Ces bandes appelées respectivement amide I et amide II sont caractéristiques de la fonction amide [84].

Elles correspondent aux modes de vibration d'élongation de la liaison C=O et de déformation de la liaison N-H respectivement.

La position de ces bandes est pratiquement la même que celle rapportée par Wang et al pour la HRP non immobilisée ($1642,12\text{ cm}^{-1}$ et $1531,85\text{ cm}^{-1}$) [85].

Cette similitude suggère que la HRP conserve les caractéristiques essentielles de sa structure secondaire native sur la nanostructure de SiP fonctionnalisée.

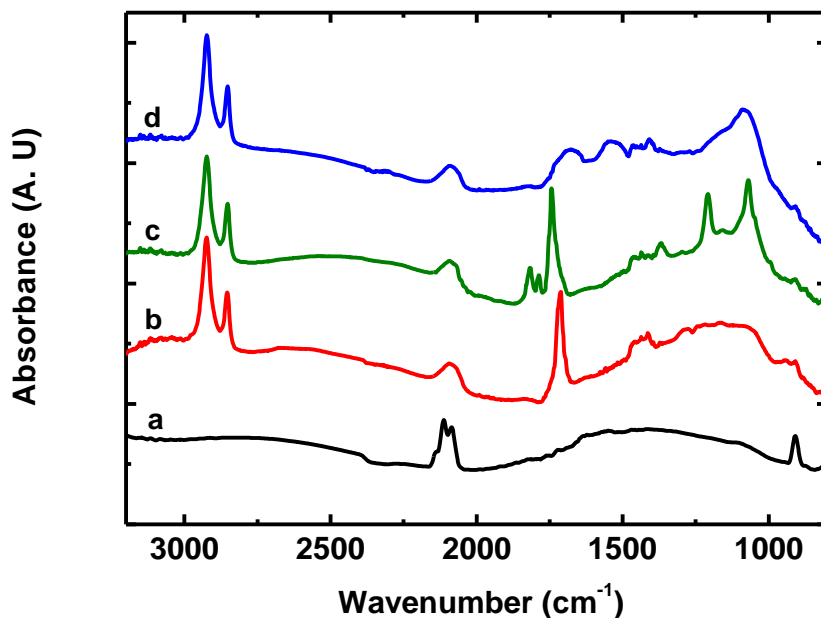


Figure. III. 19. Spectre FTIR d'une surface de silicium poreux a) avant modification. b) après greffage thermique d'acide undécylénique. c) après activation des terminaisons acides. d) après immobilisation de la HRP.

Conclusion

Nous avons montré dans un premier temps, les étapes suivies pour l'accrochage des molécules de ferrocène sur la surface acide de silicium. La caractérisation infrarouge en géométrie ATR des surfaces modifiées n'a dévoilé aucun signe clair indiquant l'accrochage des molécules de ferrocène. En revanche, afin de confirmer le couplage covalent de ces molécules, nous avons envisagé d'étudier dans le chapitre suivant, le comportement électrochimique de ces surfaces couplées de Si.

Par ailleurs, la modification de la surface de SiP par HRP a été réalisée dans la deuxième partie de ce chapitre. Il est à noter, qu'un procédé à plusieurs étapes a été utilisé. En premier lieu l'acide undécylénique a été greffé à la surface hydrogénée de SiP par hydrosilylation thermique, ce qui assure un greffage covalent à la surface via la liaison SiC. L'étude des spectres infrarouges a montré que les surfaces acides ne sont ni oxydées ni greffées par le groupement fonctionnel. Aussi, la diminution de l'angle de contact indique la formation de nouveaux groupements polaires rendant la surface SiP-acide plus hydrophobe.

Dans la deuxième étape, les terminaisons acides ont été activées dans EDC/NHS afin de former l'ester de succinimidyle. L'obtention d'une activation totale des terminaisons acides a été démontrée par l'absence de produits indésirables à la surface. La caractérisation par l'angle de contact dévoile encore la diminution de l'angle de contact, attestant de la transformation des acides en ester de succinimidyle, plus polaire.

Enfin, cette surface activée a réagi avec les fonctions amines NH_2 contenus dans la HRP via une réaction d'amidation qui a permis l'accrochage covalent de l'enzyme. Les liaisons amides formées au cours de cette dernière étape ont été confirmées sur les spectres infrarouges et la faible valeur de l'angle de contact enregistrée.

La robustesse de la liaison covalente Si-C servant d'accrochage aux molécules d'acides a conféré au système une très grande stabilité chimique. Ainsi, aucune oxydation de surface n'est observée au cours des différentes étapes de fonctionnalisation.

Références

- [1] International Technology Roadmap for Semiconductors, (2007).
- [2] **P. Wagner, S. Nock, J. A. Spudich, W. D. Volkmuth, S. Chu, R. L. Cicero, C. P. Wade, M. R. Linford, and C. E. D. Chidsey**, *Journal of Structural Biology*, 119 (2), (1997), 189.
- [3] **J. M. Buriak**, *Chem. Rev.*, 102, (2002), 1271.
- [4] **D. D. M. Wayner, and R. A. Wolkow**, *Journal of the Chemical Society- Perkin Transactions*, 2, (2002), 23.
- [5] **R. Boukherroub**. *Curr. Opin. Solid State Sci.*, 9, (2005), 66.
- [6] **A. Lehner, G. Steinhoff, M. S. Brandt, M. Eickhoff, M. J. Stutzmann**. *Appl. Phys.* 94, (2003), 2289.
- [7] **J. A. Streifer, H. Kim, B. M. Nichols, R. Hamers**, *J. Nanotechnology*, 20, (2005), 10630.
- [8] **Z. R. Scheibal, W. Xu, J. F. Audiffred, J. C. Flake**, *Electrochem. Solid-State Lett.*, 11, (2008), 81.
- [9] **D. D. M. Wayner, R. A. Wolkow**, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, (2002), 23.
- [10] **L. C. P. de Smet, G. A. Geert, H. F. Hurenkamp, Q.-Y. Sun, H. Topal, P. J. E. Vronen, A. Sievel, A. Wright, G. M. Visser, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter**, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, (2003), 13916.
- [11] **D. Wang, J. M. Buriak**, *Langmuir*, 22, (2006), 6214.
- [12] **B. R. Hart, S. E. Létant, S. R. Kane, M. Z. Hadi, S. J. Shields, J. G. Reynolds**, *Chem. Commun.*, (2003), 322.
- [13] **D. J. Guo, S. J. Xiao, B. Xia, S. Wei, J. Pei, Y. Pan, X. Z. You, Z. Z. Gu, Z. Lu**. *J. Phys. Chem. B*, 109, (2005), 20620.
- [14] **T. Bocking, K. A. Kilian, T. Hanley, S. Ilyas, K. Gaus, M. Gal, J. J. Gooding**, *Langmuir*, 21, (2005), 10522.
- [15] **S. E. Létant, B. R. Hart, S. R. Kane, M. Z. Hadi, S. J. Shieldss**, *Adv. Mater.*, 16, (2004), 689.
- [16] **S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.N. Chazalviel, A.C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, S.Djebbar**, *Langmuir* 26, (2010), 809.
- [17] **A. Moraillon, A. C. Gouget. Laemmel, F. Ozanam, J. N. Chazalviel**, *Journal of Physical Chemistry C*, 112, (2008), 7158.
- [18] **R. Voicu, R. Boukherroub, V. Bartzoka, T. Ward, J. T. C. Wojtyk, D. D. M. Wayner**, *Langmuir*, 20, (2004), 11713.
- [19] **A. Fauchaux, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, R. Boukherroub, F. Ozanam, P. Allongue, J. N. Chazalviel**, *Langmuir*, 22, (2006), 153.
- [20] **M. P. Stewart, J. M. Buriak**, *Comments Inorg. Chem.*, 23, (2002), 179.
- [21] **M. R. Linford, C. E. D. Chidsey**, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, (1993), 12631.
- [22] **M. R. Linford, P. Fenter, P. M. Eisenberger, C. E. D chidsey**, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, (1995), 3145.
- [23] **A. B. Sieval, A. L. Demirel, J. W. M. Nissink, M. R. Linford, J. H. V. D. Maas, W. H. D. Jeu, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter**. *Langmuir*, 14, (1998), 1759.
- [24] **W. Feng, B. Miller**, *Langmuir*, 15, (1999), 3152.
- [25] **J. E. Bateman, R. D. Eagling, D. R. Worrall, B. Horrocks, A. Houlton**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, (1998), 2683.

- [26] **R. Boukherroub, D. D. M. Wayner, D. J. Lockwood, L. T. Canham.** *J. Electrochem. Soc.*, 148, (2001), 91.
- [27] **R. Boukherroub, D. D. M. Wayner, G. I. Spoule, D. J. Lockwood, L. T. Canham,** *Nano Lett.*, 1, (2001), 713.
- [28] **R. L. Cicero, M. R. Linford, C. E. D. Chidsey,** *Langmuir*, 16, (2000), 5688.
- [29] **M. P. Stewart, J. M. Buriak,** *J. Am. Chem. Soc.*, 123, (2001), 7821.
- [30] **Q. Y. Sun, L. C. P. M. de Smet, B. van Lagen, A. Wright, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter,** *Angew. Chem. Int.*, 43, (2004), 1352.
- [31] **R. Boukherroub, A. Petit, A. Loupy, J.-N. Chazalviel, F. Ozanam,** *J. Phys. Chem. B.*, 107, (2003), 13459.
- [32] **J. M. Buriak, M. J. Allen.** *J. Am. Chem. Soc.*, 120, (1998), 1339.
- [33] **R. Boukherroub, S. Morin, F. Bensebaa, D. D. Wayner,** *Langmuir*, 15, (1999), 3831.
- [34] **A. Bansal, X. L. Li, I. Lauermaun, N. S. Lewis, S. I. Yi, H. W. Weinberg,** *J. Am. Chem. Soc.*, 118, (1996), 7225.
- [35] **A. Teyssot, A. Fidélis, S. Fellah, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel,** *Electrochem. Acta*, 47, (2002), 2565.
- [36] **C. Vieillard, M. Warntjes, F. Ozanam, J. N. Chazalviel,** *Electrochem. Soc. Proc.*, 95, (1996), 250.
- [37] **T. Dubois, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel,** *Electrochem. Soc. Proc.*, 97, (1997), 296.
- [38] **P. Allongue, C. H. de Villeneuve, J. Pinson, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel, X. Wallart,** *Electrochim. Acta*, 43, (1998), 2791.[14]
- [39] **E. G. Robins, M. P. Stewart, J. M. Buriak,** *Chem. Commun.*, (1999), 2479.
- [40] **P. T. Hurley, A. E. Ribbe, J. Buriak,** *J. Am. Chem. Soc.*, 125, (2003), 11334.
- [41] **C. Gurtner, A. W. Wun, M. J. Sailor,** *Angew. Chem. Int.*, 38, (1999), 1966.
- [42] **C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque,** *Tetrahedron*, 61, (2005), 10827.
- [43] **E. Valeur, M. Bradley,** *Chemical Society Reviews*, 38, (2009), 606.
- [44] **J. V. Staros, R. W. Wright, D. M. Swingle,** *Analytical Biochemistry*, 156, (1986), 220.
- [45] **T. Bocking, M. James, H. G. L. Coster, T. C. Chilcott, K. D. Barrow,** *Langmuir*, 20, (2004), 9227.
- [46] **B. Dordi, H. Schonherr, G. J. Vancso,** *Langmuir*, 19, (2003), 5780.
- [47] **O. Taratula, E. Galoppini, R. Mendelsohn, P. I. Reyes, Z. Zhang, Z. Duan, J. Zhong, Y. Lu,** *Langmuir*, 25, (2009), 2107.
- [48] **J. T. C. Wojtyk, K. A. Morin, R. Boukherroub, D. D. M. Wayner,** *Langmuir*, 18, (2002), 6081.
- [49] **M. Yang, R. L. M. Teeuwen, M. Giesbers, J. Baggerman, A. Arafat, de F. A. Wolf, J. C. M. van Hest, H. Zuilhof,** *Langmuir*, 24, (2008), 7931.
- [50] **L. Touahir, S. Sam, A. Moraillon, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel, P. Allongue, C. Henry de Villeneuve, N. Gabouze, S. Djebbar, A. C. Gouget-Laemmel,** *Sensor Letters*, 8, (2010), 447.
- [51] **A. Kermad, S. Sam, N. Ghellai, K. Khaldi, N. Gabouze,** *Materials Science and Engineering B*, 178, (2013), 1159.
- [52] **N. C. Veitch,** *Phytochemistry*, 65, (2004), 249.
- [53] **K.G. Welinder,** *Eur. J. Biochem*, 96, (1978).
- [54] **D. Stephan D. Schomberg, M. Salzmann,** *Enzyme Handbook*, 7, (1993).

- [55] **J. N. Rodriguez-Lopez, D. J. Lowe, J. Hernandez-Ruiz, A. N. P. Hiner, F. Garcia Canovas, R. N. F. Thorneley, J. Amer. Chem. Soc**, 123, (2001), 11838.
- [56] **A. F. Naves, A. M. Carmona-Ribeiro and D. F. S. Petri**, *Langmuir*, 23(4), (2007), 1981.
- [57] **E. Gomez, J. Bastida, A. M. Hidalgo, M. Gomez, J. L. Gomez, A. Bodalo**, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, (2006).
- [58] **V. C. B. Martins, J. M. S. Cabral, T.D. Gibson, L.P. Fonseca, V. Vojinoy, A. M. Azevedo**, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (2004).
- [59] **K. H. Beckmann**, *Surface Science*, 3, (1965), 314.
- [60] **N. J. Harrick, K. H. Beckmann**, éd. par P.F. Kane et G. R. Larrabee (1974), 242.
- [61] **V. A. Burrows, Y. J. Chabal, G. S. Higashi, K. Raghavachari, S. B. Christman**, *Applied Physics Letters*, 53, (1988), 998.
- [62] **Y. J. Chabal**, *Surface Science*, 168, (1986), 594.
- [63] **Y. J. Chabal, G. S. Higashi, K. Raghavachari; V. A. Burrows**, *Journal of Vacuum Science & Technology a*, 7, (1989), 2104.
- [64] **A. Tardella, J.-N. Chazalviel**, *Applied Physics Letters*, 47, (1985), 334.
- [65] **H. Ubara, T. Imura, A. Hiraki**, *Solid State Communications*, 50, (1984), 673.
- [66] **E. Yablonovitch, D. L. Allara, C. C. Chang, T. Gmitter, T. B. Bright**, *Physical Review Letters*, 57, (1986), 249.
- [67] **B. R. Weinberger, G. G. Peterson, T. C. Eschrich; H. A. Krasinski**, *Journal of Applied Physics*, 60, (1986), 3232.
- [68] **G. S. Higashi, Y. J. Chabal, G. W. Trucks, K. Raghavachari**, *Applied Physics Letters*, 56, (1990), 656.
- [69] **P. Jakob, Y. J. Chabal**, *Journal of Chemical Physics*, 95, (1991), 2897.
- [70] **P. Jakob, Y. J. Chabal; K. Raghavachari, R. S. Becker, A. J. Becker**, *Surface Science*, 275, (1992), 407.
- [71] **G. W. Trucks, K. Raghavachari, G. S. Higashi, Y. J. Chabal**, *Physical Review Letters*, 65, (1990), 504.
- [72] **P. Allongue, V. Kieling, H. Gerischer**, *Electrochimica Acta*, 40, (1995), 1353.
- [73] **H. Fukidome, M. Matsumura**, *Applied Surface Science*, 130, (1998), 146.
- [74] **D. Aureau**, Thèse (PMC, Ecole Polytechnique), (2008), <http://pastel.paristech.org/>.
- [75] **C. Douarce**, Thèse (IRI, Université de Lille 1), (2007).
- [76] **D. Dusciac**, Thèse (PMC, Ecole Polytechnique), (2008), <http://pastel.paristech.org/>.
- [77] **A. Faucheux**, Thèse (PMC, Ecole Polytechnique), (2005).
- [78] **A. B. Sieval, R. Linke, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter**, *Advanced Materials*, 12, (2000), 1457.
- [79] **A. B. Sieval, B. van den Hout, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter**, *Langmuir*, 16, (2000), 2987.
- [80] **R. Boukherroub, J. T. C. Wojtyk, D. D. Wayner, D. J. Lockwood**, *J. Electrochem. Soc*, 149, (2002), 59.
- [81] **C. da Fonseca, F. Ozanam, J. N. Chazalviel**, *Surf. Sci*, 365, (1995), 1.
- [82] **M. A. Hory, R. Hérino, M. Ligeon, F. Muller, F. Gasard, I. Mihalcescu, J. C. Vial**, *Thin Solid Films*, 255, (1995), 200.
- [83] **R. Boukherroub, S. Morin, D. D. M. Wayner, F. Bensbaa, G. I. Sproule, J.-M. Baribeau, D. J. Lockwood**, *Chem. Mater*, 13, (2001), 2002.

[84]S. Sam, J.N. Chazalviel, A.C. Gouget-Laemmel, F. Ozanam, A. Etcheberry, N.Gabouze, *Nanoscale Research Letters*, 6, (2011), 412.

[85]S.F. Wang, F. Xie, G.D. Liu, *Talanta*, 77, (2009), 1343.

**CHAPITRE. IV. APPLICATION DES COUCHES MODIFIÉES
DU SILICIUM POREUX PAR LA HRP POUR LA DÉTECTION
DU PHÉNOL**

Introduction

Le phénol et ses dérivés constituent une classe importante de polluants rencontrés dans l'eau. Ils proviennent essentiellement des rejets des industries du bois, du charbon ou du pétrole. Mais également des activités domestiques puisque certains d'entre eux sont utilisés comme désinfectants. Le phénol est aussi un composé très toxique et possède une action destructive sur les cellules de l'épiderme avec laquelle il entre en contact. Il tue la faune aquatique à des concentrations de 1ppm. Dès 1938, ces dérivés, très toxiques, étaient déjà reconnus comme une des causes possibles de maladies professionnelles. Pour ces raisons. La législation impose, pour les eaux destinées à la consommation humaine, que les phénols ne soient pas détectables organoleptiquement après l'ajout de chlore. Ainsi en Europe, la concentration totale maximale en composés phénoliques a été fixée à 0,5 µg/l (chaque composé phénolique ne doit pas dépasser 0,1 µg/l) dans les environnements aquatiques [1-4].

Par conséquent, la détection de tels composés constitue l'une des premières priorités des chercheurs, vu l'effet de ces polluants sur l'environnement et sur l'être humain [5,6]. Depuis plusieurs années le contrôle et la surveillance des dérivés phénoliques été réalisée par des instruments d'analyses lents, couteux et volumineux [7,8].

Dans le but de résoudre ce problème et d'améliorer les procédés de détection, différents types d'électrodes modifiées avec différentes entités biologiques appelées aussi biocapteurs ont été élaborées et développées [9].

Les biocapteurs ampérométrique à base d'enzymes, ont fait l'objet d'une intense activité de recherche au cours de ces dernières années. Toutefois, la troisième génération de biocapteurs ampérométriques présente l'avantage de transférer les électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode et ceci sans faire appel à des agents médiateurs [9]. La Peroxydase de Raifort (HRP) fait partie des enzymes les plus fréquemment utilisées pour élaborer cette catégorie de capteur [10]. Cette enzyme oxydoréductase est capable grâce à son hème ferrique qui constitue son site actif, et en présence du peroxyde d'hydrogène, à oxyder un grand nombre de composés organiques à savoir les phénols [11].

Dans le cadre de cette thèse la HRP été immobilisée sur la surface fonctionnalisée du silicium poreux afin de détecter le phénol par voie électrochimique. Vue la nature des réactions que catalyse la HRP entant qu'enzyme de la classe des oxydoréductases, la voltampérométrie

cyclique est considérée comme la technique la plus commode pour l'étude du transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode.

PARTIE. I. ASPECTS THÉORIQUES

Dans cette partie, nous nous intéressons dans un premier temps à donner un aperçu sur l'origine, la définition, la toxicité et l'oxydation des composés phénoliques. Par la suite, nous décrivons le principe de détection des phénols par une électrode modifiée par la HRP. Enfin, nous donnons un rappel sur les théories régissant la technique utilisée, la voltampérométrie cyclique, pour l'étude du comportement électrochimique de la HRP immobilisée sur le SiP en présence du phénol.

I. Généralités sur les phénols

I. 1. Définition et structure

On appelle phénols les dérivés hydroxylés du benzène et des hydrocarbures aromatiques, dans lesquels le groupe OH est lié à un atome de carbone du cycle benzénique.

Les dérivés polyhydroxylés sont appelés polyphénols.

I. 2. Nomenclature

Ils sont nommés comme des phénols substitués. Le numéro le plus petit est affecté à l'atome de carbone porteur du groupe –OH.

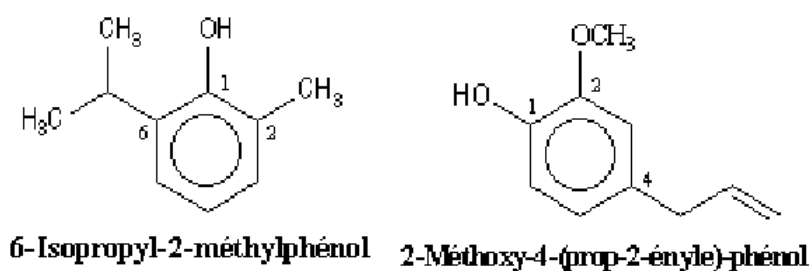


Figure. IV. 1. Exemple de composés phénoliques

Certains dérivés sont connus sous un nom d'usage. Le 6-isopropyl-2-méthylphénol est le thymol. Le 2-méthoxy-4-(prop-2-ényle)-phénol est l'eugénol. Les phénols dérivés du toluène sont appelés crésols.

I. 3. Origine

Ce sont des alcools aromatiques qui proviennent des végétaux. Les phénols simples, déchets du métabolisme végétal, sont assemblés en polyphénols comme la lignine. Les composés phénoliques définissent un ensemble de substances que l'on a appelées pendant longtemps « matières tanniques » d'une façon générale et imprécise parce qu'on ne connaissait pas,

avec suffisamment de précision, la nature de ces substances. Il y a quatre principales familles de composés phénoliques : les acides-phénols, les flavones, les anthocyanes, les tanins.

I. 4. Toxicité

La toxicité des phénols peut se manifester localement, principalement à l'occasion de leur utilisation comme antiseptique, ou de façon générale après ingestion, inhalation, ou contact cutané prolongé.

- Toxicité locale : dermatose puis gangrène.
- Toxicité générale : les phénols induisent des troubles nerveux (convulsions puis coma) et des œdèmes pulmonaires.

En plus de leur toxicité, certains composés phénoliques causent des problèmes de mauvais goût de l'eau potable, surtout lorsque celle-ci a été chlorée. Ces composés sont présents dans les effluents de nombreux procédés industriels [12]. Dans l'industrie de pulpation, les effluents produits au moment du blanchiment par chloration provoquent la pollution de l'eau parce qu'ils contiennent des lignines fortement modifiées et des chlorolignines, ainsi que des phénols et des chlorophénols [13].

I. 5. Propriétés chimiques des composés phénoliques

- Propriétés réductrices

Le potentiel d'ionisation est l'énergie minimale qu'il faudrait fournir à une espèce chimique pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué à un groupement donneur d'électrons, plus son potentiel d'ionisation est faible et son caractère réducteur est grand, il peut aussi subir une oxydation non électronique qui conduit à un radical cation. Dans le cas du phénol, le radical cation formé est un acide fort qui se déprotone pour donner un radical phénoxy.

- Polarisabilité

Les molécules possédant de gros atomes présentent des bandes d'absorption dans le domaine de l'UV proche et du visible. Ils sont hautement polarisables, c'est le cas des composés aromatiques. Les phénols les plus polarisables présentent des bandes d'absorption dans l'UV

aux longueurs d'ondes $\lambda_{\max} > 300$ nm (flavonols et hydroxycinnamique), voir 500 nm dans le cas des pigments anthocyanes.

- Liaison hydrogène

Les phénols sont le siège d'association intermoléculaire par liaison hydrogène. Dans le cas des composés phénoliques complexes, il peut y avoir des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les diverses propriétés de ces liaisons hydrogènes sont :

- Les liaisons hydrogène modifient de nombreuses propriétés physiques : le point de fusion et d'ébullition, la solubilité, les spectres d'absorption dans les domaines de l'ultraviolet et de l'infrarouge.
- La présence de liaisons hydrogène diminue la réactivité des groupements phénoliques (solubilité en milieu alcalin, leur aptitude à la formation d'esters et d'éthers-oxyde).
- Les liaisons hydrogène sont plus fortes lorsqu'elles conduisent à la formation d'un cycle à 6 chaînes qu'un cycle à 5 chaînes.
- Les liaisons intermoléculaires diminuent le point de fusion et la solubilité des composés phénoliques ce qui peut rendre leur purification difficile par formation des structures hexagonales (6 groupes phénoliques unis par des liaisons hydrogènes).

- Caractère acide de la fonction phénol

La déprotonation de la liaison OH des phénols entraîne la formation des ions phénolates, leur forte solvatation (formation de liaison H avec l'eau) permet d'expliquer les propriétés acides faibles des phénols dans l'eau (pKa situé entre 8 et 10).

- Formation de complexes avec les métaux

La formation de complexe par chélation avec les métaux (en général le fer et l'aluminium) est exploitée pour la révélation des chromatogrammes, pour le dosage de ces substances et la réalisation des spectres d'adsorption. Dans la nature cette complexation intervient dans la coloration des plantes.

- Formation d'esters et d'éthers-oxyde

La fonction ester provient de la réaction d'un acide avec un OH alcoolique ou phénolique. La fonction éther-oxyde provient de la déshydratation intermoléculaire des alcools, des phénols, ou des réactions d'alcool et d'aldéhyde.

Dans la nature, la formation des esters à partir des composés phénoliques fait intervenir la fonction acide d'un phénol et la fonction alcool d'une autre molécule. (Les composés phénoliques n'interviennent pas par leur fonction phénol).

La formation d'éthers-oxyde est très fréquente dans la nature et particulièrement la formation d'éthers-oxyde mixtes entre une fonction phénol et l'alcool méthylique.

- L'oxydation

L'oxydation du phénol peut avoir lieu sous l'action de très nombreux oxydants : Fe^{3+} , O_2 , etc. symbolisés par [O]. Elle conduit à la formation de radical phénoxye relativement stable avec un atome d'oxygène simplement lié, mais possédant un électron célibataire (figure IV-2).

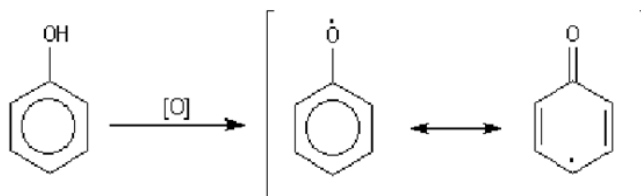


Figure. IV. 2. Oxydation du phénol

Généralement un tel radical est très instable et réagit rapidement, éventuellement après isomérisation sous forme de radical contenant, en position ortho ou para de l'atome d'oxygène, un atome de carbone trivalent mais possédant un électron impair. Le radical ainsi formé peut se dimériser, ou réagir avec un autre radical, en formant, par ordre d'importance, des liaisons C-C, C-O ou O-O. Dans le cas des monophénols ou les diphenols, une oxydation se faisant sur des molécules complexes à noyau catéchol, peut conduire à un produit polymérisé de coloration brun-noir.

L'oxydation des phénols peut se produire par le système enzymatique contenant les polyphenoloxydases (PPO), les laccases et les peroxydases avec ou sans H_2O_2 et aussi par l'alcalinisation, notamment en présence d'ions métalliques.

II. Principe d'une électrode immobilisée avec HRP pour la détection des phénols

Les électrodes modifiées par la HRP permettent la détection des dérivés phénoliques. Leur champ d'applications potentielles concerne essentiellement le domaine biomédical (dosage de neuromédiateurs, catécholamine) et celui de l'environnement (détection de polluants phénoliques et pesticides). Ces applications nécessitent des capteurs capables de détecter des concentrations nanomolaires de la molécule cible, ce qui constitue le premier objectif à atteindre.

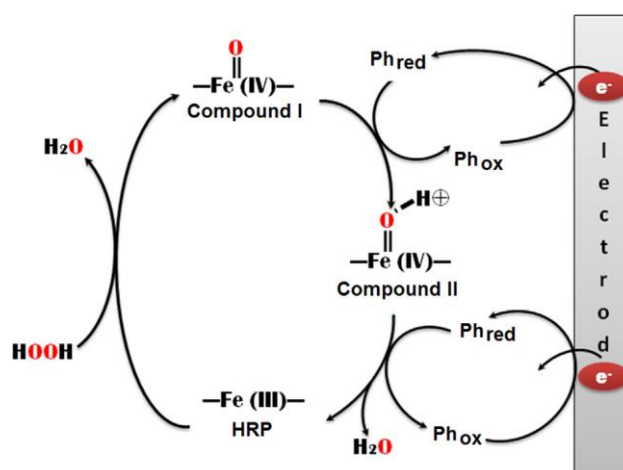


Figure. IV. 3. Illustration schématique du système de détection des phénols par la peroxydase de Raifort HRP [14].

Le principe de détection est montré sur la figure (IV-3). Les molécules phénoliques sont principalement transformées en quinones et/ou en radicaux libres [5], qui sont des espèces électro-actives et peuvent être réduites électrochimiquement pour revenir à leur forme initiale sur la surface de l'électrode. Le fonctionnement de telle électrode est basé sur la mesure du courant de réduction des radicaux libres générés par la réaction enzymatique. La réponse ampérométrique de l'électrode est directement liée à la concentration du phénol dans la solution [15].

I. La voltampérométrie cyclique:

III.1. Principe de la méthode

La voltampérométrie cyclique est l'une des méthodes les plus utilisées pour étudier les processus d'électrode comme les réactions de réduction et d'oxydation ou l'adsorption

d'espèces chimiques. Cette méthode consiste à varier linéairement le potentiel de l'électrode de travail au cours du temps et à mesurer le courant résultant. La programmation en potentiel est triangulaire, c.-à-d. le potentiel varie linéairement, à une vitesse de balayage v bien définie, à partir d'un potentiel initial E_1 jusqu'à un potentiel E_2 où le sens de balayage est inversé comme montré sur la figure (IV-4).

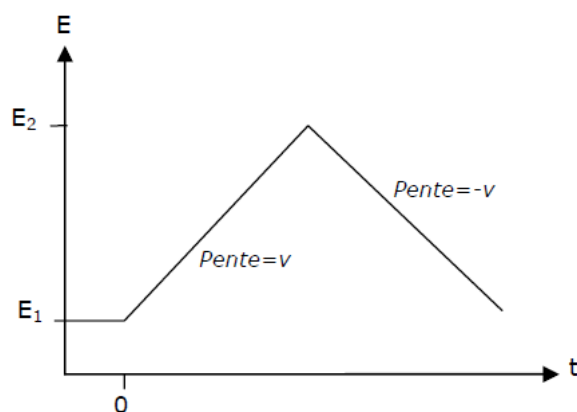


Figure. IV. 4. Profil de potentiel appliqué en fonction du temps.

Le courant mesuré en voltampérométrie cyclique est la somme de deux contributions de nature différente :

$$I_{mes} = I_F + I_c = \frac{dQ_F}{dt} + Cv \quad (IV-1)$$

Le courant faradique I_F , obéissant à la loi de Faraday, est lié à des réactions d'oxydoréduction. Sa forme analytique dépend du système étudié. Le second terme I_c est le courant capacitif qui est lié à la présence d'une double couche électrique à l'interface électrode-solution et est directement proportionnel à la vitesse de balayage v . Q_F représente la charge faradique et C est la capacité de double couche. La vitesse de balayage est un paramètre très important.

III.2. Espèces redox en solution

- Système réversible :

Pour un système redox réversible en solution où les espèces arrivent par diffusion à l'interface électrochimique, l'allure du voltampérogramme cyclique est représentée sur la figure (IV-5).

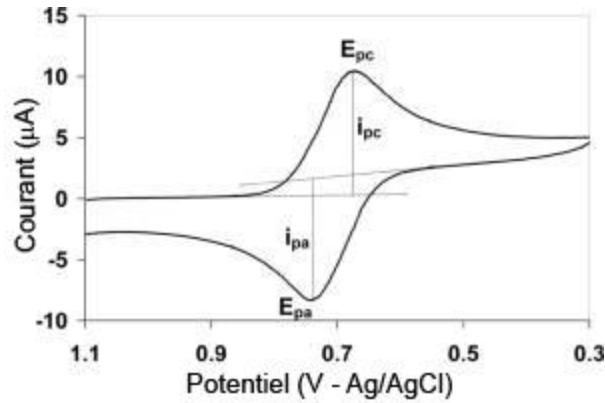


Figure. IV. 5. Exemple de diagramme de voltampérométrie cyclique.

Pour un système redox infiniment réversible, le courant de pic est donné par la relation suivante à 25°C: [16]

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c_\infty \cdot v^{1/2} \quad (\text{IV-2})$$

Avec I_p le courant de pic (A), n le nombre d'électrons transférés, A la surface de l'électrode (cm^2), D le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive (cm^2/s), c_∞ sa concentration (mol/cm^3) et v la vitesse de balayage (V/s).

- *Système irréversible :*

Pour un système irréversible, le courant de pic à 25°C est donné par la relation IV-3: [16]

$$I_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot \alpha^{1/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c_\infty \cdot v^{1/2} \quad (\text{IV-3})$$

Avec α le coefficient de transfert de charge.

III.3. Espèces redox greffées en surface

Les équations utilisées pour décrire les processus électrochimiques des surfaces modifiées sont inspirées de la théorie des espèces adsorbées développée par Laviron [17-19], puisque cette théorie est élaborée en supposant que les concentrations en solution tendent vers zéro.

- *Cas où la réaction de transfert de charge est rapide*

On suppose que dans le domaine du potentiel considéré, les concentrations surfaciques sont indépendantes du potentiel, avec initialement (à $t=0$) $\Gamma_{Ox} = \Gamma_{Ox}^*$ et $\Gamma_{Red} = 0$. Ainsi, on a :

$$\frac{j}{nF} = + \frac{\partial \Gamma_{Ox}(t)}{\partial t} = - \frac{\partial \Gamma_{Red}(t)}{\partial t} \quad (\text{IV-4})$$

Où, j est la densité de courant, n est le nombre d'électrons échangé, F est la constante de Faraday,

Γ_{Ox} et Γ_{Red} sont les concentrations surfaciques.

Dans le cas d'un système rapide, les concentrations surfaciques obéissent à l'équation de Nernst :

$$\frac{\Gamma_{Ox}(t)}{\Gamma_{Red}(t)} = \exp\left(\frac{nF}{RT} (E - E^{o'})\right) \quad (IV-5)$$

Où, $E^{o'}$ est le potentiel standard des espèces greffées en surface, R la constante des gaz parfaits, T la température.

En combinant les équations (IV-4) et (IV-5) avec l'égalité $\Gamma_{Ox}(t) + \Gamma_{Red}(t) = \Gamma_{Ox}^*$ on obtient l'expression de $j = f(E)$, en balayage linéaire de potentiel, de la forme :

$$j = \frac{n^2 F^2 v \Gamma_{Ox}^*}{RT} \left(\frac{\exp\left(\frac{nF}{RT} (E - E^{o'})\right)}{\left(1 + \exp\left(\frac{nF}{RT} (E - E^{o'})\right)\right)^2} \right) \quad (IV-6)$$

Avec v la vitesse de balayage du potentiel.

Le voltampérogramme cyclique typique correspondant à cette équation est représenté sur la figure (IV-6). Il ressort aussi de cette expression que la densité de courant de pic j_p , est donnée par la relation :

$$j_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v \Gamma_{Ox}^* \quad (IV-7)$$

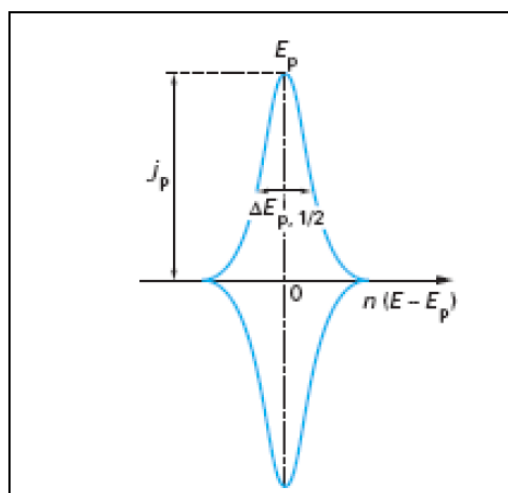


Figure. IV. 6. Voltampérogramme cyclique d'une espèce Ox adsorbée à la surface de l'électrode.

Le potentiel $E^{\circ'}$ est défini comme étant le potentiel d'équilibre du système redox immobilisé à la surface [20, 21]. Murray a montré à partir de plusieurs exemples que $E^{\circ'}$ est généralement égal au potentiel conditionnel apparent du même processus en solution. [21]

Les propriétés caractéristiques qui distinguent un tel processus rapide en surface sont les suivantes : [22]

- La variation de la densité de courant de pic est proportionnelle à la vitesse de balayage de potentiel ν (et non pas à $\nu^{1/2}$, comme cela est le cas pour un système rapide en solution [16]).
- Le pic anodique retour est l'image miroir du pic cathodique aller. $E_{pa} = E_{pc}$ ($\Delta E_p = 0$ et indépendant de ν).
- Dans le cas idéal, la largeur du pic de courant (en oxydation ou en réduction) à mi-hauteur, $\Delta E_{p,1/2} = 3,53 RT/nF = 90,6/n$ (en mV à 25°C).
- L'aire sous le pic de réduction du voltampérogramme cyclique représente la charge électrique développée au cours de la réduction de l'espèce oxydée liée en surface.

Elle est donnée par l'équation :

$$Q = nFA\Gamma_{ox}^* \quad (\text{IV-8})$$

Avec A la surface de l'électrode. Q est indépendant de ν .

Exemples : La figure (IV-7) montre l'évolution, en fonction de la vitesse de balayage, d'un voltampérogramme cyclique correspondant au couple redox Co(II)/Co(III) du complexe cobalt phtalocyanine adsorbé à la surface d'une électrode de carbone ($\nu=200$ (c), 500 (b) et 1000 (a) mVs^{-1}). Electrolyte=solution aqueuse de H_2SO_4 à 0,05M).

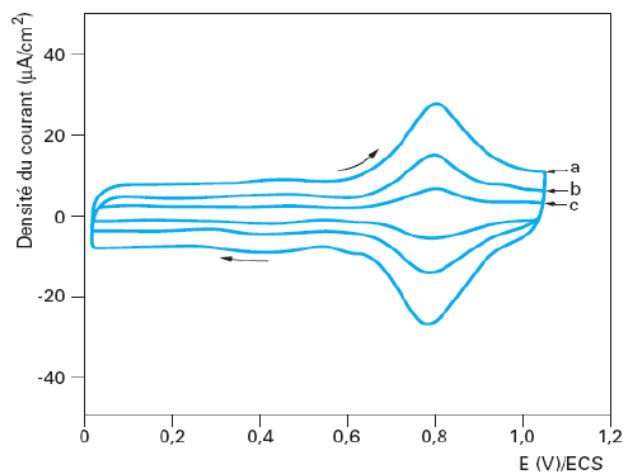


Figure. IV. 7. Voltampérogramme cyclique du couple Co(II)/Co(III) du complexe cobalt phtalocyanine adsorbé à la surface d'une électrode de carbone ($\nu=200$ (c), 500 (b) et 1000 (a) mVs^{-1}). Electrolyte=solution aqueuse de H_2SO_4 à 0,05M).

Cette figure montre qu'en pratique l'allure des voltampérogrammes est différente de celle prévue théoriquement, du fait de la présence d'un fort courant capacitif et de complications cinétiques et/ou organisationnelles à la surface des électrodes.

En effet, les résultats expérimentaux décrits dans la littérature montrent quelques limites de ce modèle théorique. Les valeurs expérimentales des deux paramètres les plus significatifs, ΔE_p et $\Delta E_{p,1/2}$ sont généralement différentes de celles prévues théoriquement [19, 23] ($\Delta E_p \neq 0$ et varie avec v , $\Delta E_{p,1/2} \neq 90,6/n$ pour un système rapide).

Laviron a montré que cet écart à l'idéalité est dû à deux facteurs : [18]

-- Interaction entre les molécules à la surface de l'électrode dans le cas où la concentration des espèces greffées est élevée. Afin de tenir compte de cet effet, il a fait introduire dans les équations établies des constantes d'interaction entre les espèces Ox et Red. Il a montré par simulations mathématiques l'influence de ces paramètres d'interaction sur l'allure des voltampérogrammes obtenus. La figure montre un élargissement des pics anodique et cathodique selon l'intensité des interactions, mais la symétrie des pics est préservée dans le cas d'un processus réversible.

- Inhomogénéité des électrodes solides qui mène à une distribution non équivalente des sites redox qui entraînerait une légère différence du potentiel redox d'un site à un autre. Cet effet provoque également un élargissement des pics anodique et cathodique.

- *Cas d'un système lent* : [16]

Si l'espèce Ox immobilisée en surface est réduite selon une réaction de transfert de charge lente et irréversible, il faut considérer la relation :

$$\frac{j}{nF} = k_f \Gamma_o(t) \quad (\text{IV-9})$$

Avec k_f , la constante de vitesse

Les paramètres caractéristiques suivants doivent permettre d'identifier une telle situation :

$$j_p = \left(\frac{\alpha n^2 F^2}{2,718 RT} \right) v \Gamma_{ox}^* \quad (\text{IV-10})$$

$$E_p = E^\circ + \frac{RT}{\alpha n F} \ln \left(\frac{RT}{\alpha n F} \left(\frac{k^\circ}{v} \right) \right) \quad (\text{IV-11})$$

$$\Delta E_{p,1/2} = 2,44 \frac{RT}{\alpha n F} = \frac{62,5}{\alpha n} \text{ (mV, à } 25^\circ\text{C)} \quad (\text{IV-12})$$

Avec α le coefficient de transfert de charge et k° la constante de vitesse standard.

On retrouve de nouveau une variation de la densité de courant de pic proportionnelle à la vitesse de balayage de potentiel (et non pas à sa racine carrée).

La vague voltampérométrique est déformée par rapport à l'allure parabolique symétrique d'un système rapide. Le pic cathodique est déplacé vers les potentiels négatifs, et le pic anodique vers les potentiels positifs (augmentation de ΔE_p) [19].

Laviron [18] a montré que dans le cas d'une électrode solide où des inhomogénéités de surface apparaissent, ou lorsque la concentration des espèces greffées est élevée induisant de fortes interactions entre les molécules, les voltampérogrammes obtenus sont fortement déformés. En plus de l'élargissement des pics anodique et cathodique, leur forme devient différente (avec l'un qui peut être plus large que l'autre).

Enfin, plus le système est irréversible, plus ΔE_p augmente.

Il a été également montré qu'un système réversible en solution peut devenir irréversible lorsque le couple redox est immobilisé en surface. Cet effet est probablement dû aux propriétés de la surface où l'échange d'électrons avec l'électrode est lent [24].

En conclusion, l'observation d'une forte dissymétrie entre les pics anodique et cathodique révèle l'existence d'interactions entre les molécules immobilisées, aussi bien que la non réversibilité de la réaction électrochimique.

**PARTIE. II. ÉTUDE DU COMPORTEMENT ÉLECTROCHIMIQUE DE
LA HRP IMMOBILISÉE SUR LE SILICIUM POREUX**

Nous tenons à rappeler que cette partie débutera dans son premier volet, par l'étude du comportement électrochimique des molécules de ferrocène couplées à une monocouche acide greffée à la surface du silicium plat. Cette partie a pour objectif d'initier l'étude du comportement électrochimique de la HRP, par l'étude d'un système redox simple du ferrocène-méthanol contenant un site ferrique électrochimiquement actif.

Le deuxième volet est consacré à l'étude du comportement électrochimique par voltampérométrie cyclique des surfaces de silicium poreux modifiées par l'immobilisation de la HRP. Dans un premier temps nous nous intéressons à l'étude électrochimique de la HRP immobilisée sur les surfaces modifiées du SiP en absence du phénol et du H_2O_2 , ensuite nous traitons la détection électrochimique du phénol par la HRP immobilisée en présence de H_2O_2 .

I. Etude du comportement électrochimique des ferrocènes couplées à la surface acide de silicium plat

Les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un potentiostat Autolab (Eco Chemie) à température ambiante (figure IV-8-b). La cellule électrochimique d'un volume de 500 μ L utilisée comprend trois électrodes : une contre électrode en platine, la surface du silicium modifiée comme électrode de travail et une électrode au calomel saturé (ECS) comme référence (figure IV-8-a). Les voltampérogrammes cycliques sont enregistrés à des vitesses de balayage allant de 20 à 1000 mVs^{-1} dans une solution d'acétonitrile contenant 0.1M de Perchlorate de Tetrabutyl d'ammonium (TBAAClO₄), ce sel est rajouté pour augmenter la conductivité ionique dans la solution.



Figure. IV. 8. Dispositifs utilisés pour l'étude électrochimique
a) Micro cellule électrochimique, b) Potentiostat Autolab (Eco Chemie).

Les voltammogrammes des surfaces de silicium modifiées avec les ferrocènes, montrés sur la figure (IV-9), ont été obtenus pour des vitesses de balayage comprises entre 20 et 1000 mVs⁻¹ et sont enregistrés dans une gamme de tension allant de -0.5 à 0.7 V/ECS, montrent un pic anodique à 0.4 V/ECS et un pic cathodique à 0.25 V/ESC. Ces deux pics sont attribués aux pics d'oxydation et de réduction du couple redox Fe⁺³/Fe⁺². Cette oxydoréduction est monoélectronique et se produit selon la réaction suivante [25, 26] :

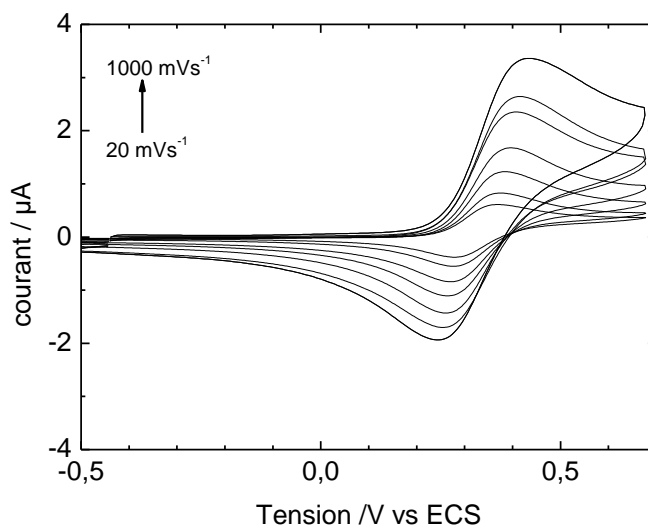
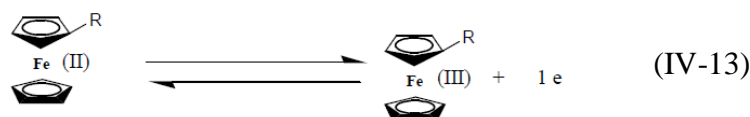


Figure. IV. 9. Voltampérométrie cyclique des surfaces modifiées de Si dans une solution d'acétonitrile contenant 0.1M de TBuAcIO₄

Sur la figure (IV-9), nous observons que l'oxydation des ferrocènes s'effectue à un potentiel égal à 0,4V. Qui correspond au même potentiel d'oxydation du ferrocène en solution sur une électrode en platine (0.41 V) [25, 26]. De plus, l'allure des voltammogrammes ne correspond pas aux voltammogrammes d'espèces immobilisées en surface, où les pics anodiques et cathodiques sont symétriques [16].

La figure (IV-10) montre la variation de l'intensité des pics anodique et cathodique (I_{pa}) et (I_{pc}) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage. Selon la théorie, dans le cas des molécules adsorbées, la variation des pics de courant (anodiques et /ou cathodiques) est linéaire avec la vitesse de balayage. D'autre part, dans le cas des molécules en solution, la variation des pics de courant est linéaire en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage [16, 27]. Dans notre cas, une relation linéaire a été obtenue du courant anodique et

du courant cathodique avec la racine carrée de la vitesse de balayage (figure IV-10). Ce résultat montre que le processus électrochimique observé est provoqué par des espèces dissoutes en solution et non pas par des molécules attachées à la surface de silicium.

Par conséquent, nous pouvons conclure que les ferrocènes couplés à la surface acide de silicium se sont désorbés dans la solution, indiquant l'instabilité de l'immobilisation des ferrocènemethanols par une réaction d'estérification avec les terminaisons acides.

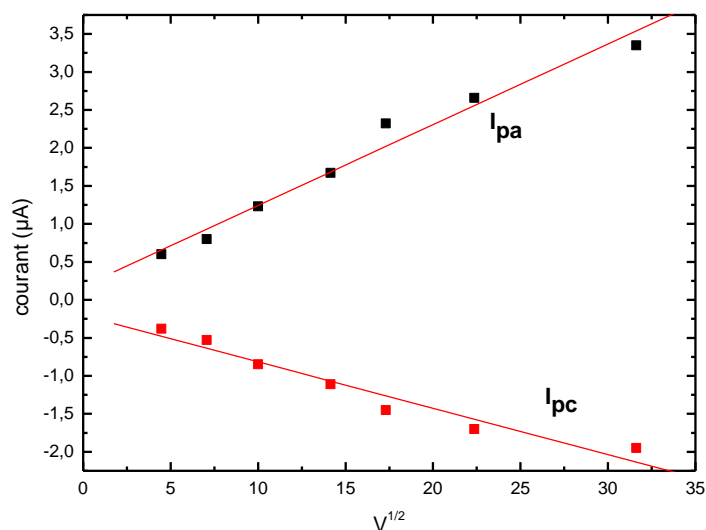


Figure. IV. 10. Evolution de l'intensité des pics anodiques et cathodiques en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage.

II. Etude électrochimique de la HRP immobilisée sur le SiP

II. 1. Etude électrochimique directe de la HRP immobilisée sur le SiP

Afin de mettre en évidence le comportement électrochimique de la HRP immobilisée à la surface du SiP, un voltampérogramme cyclique du SiP modifié par la HRP a été enregistré (figure IV-11-a). Le voltampérogramme d'une surface de SiP modifiée par des terminaisons acides a été également enregistré (figure IV-11-b) à titre de comparaison.

Les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un potentiostat programmable (Princeton Applied Research, modèle 362) à température ambiante. La cellule à trois électrodes utilisée comprend une contre électrode en platine (sous forme d'une grille fine), la surface du silicium modifiée comme électrode de travail, et une électrode au calomel saturé (ECS) comme référence. Les voltampérogrammes cycliques sont enregistrés à des vitesses de balayage allant de 20 à 500 mVs^{-1} dans 0,06 M d'une solution tampon de phosphate PBS à pH=7.

Sur la figure correspondante (figure IV-11-b), nous remarquons un seul pic autour de -0.4 V. Ce pic anodique qui est également présent dans le voltampérogramme cyclique du silicium poreux modifié par la HRP (figure IV-11-a) est dû à l'oxydation du silicium [28]. Ce pic d'oxydation est observé dans tous les voltampérogrammes présentés dans cette étude. Par ailleurs, aucun autre processus d'oxydoréduction n'a été observé sur la surface de SiP modifiée par des terminaisons acides.

Par ailleurs, l'électrochimie de la surface du silicium poreux modifiée par la HRP dans 0,06 M de PBS, pH = 7 montre une paire de pics d'oxydoréduction à 0,15 V et 0 V correspondant au couple redox Fe (II)/ Fe (III) dans le centre électroactif de la HRP immobilisée [29, 30]. Ceci montre qu'il y a eu un transfert d'électrons direct entre la HRP immobilisée et l'électrode de SiP sans aucun médiateur [10, 32]. Il a été reporté dans la littérature que la HRP subit une réaction d'oxydoréduction qui met en jeu un électron couplé avec un proton, selon la réaction suivante: [29, 30]:

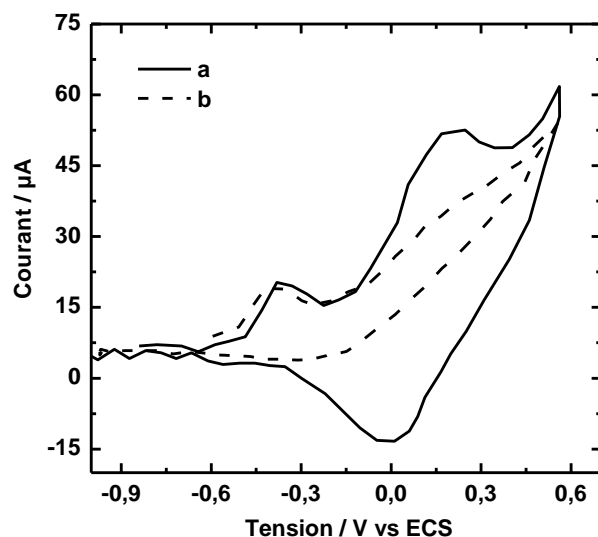
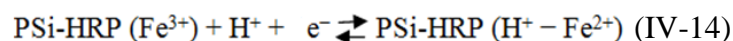


Figure. IV. 11. Voltampérogrammes cycliques des surfaces modifiées de SiP dans 0.06 M de PBS, pH=7
a) Avec HRP immobilisée, b) Avec des terminaisons acides. Vitesse de balayage = 500mVs^{-1}

Ce résultat confirme la préservation de l'activité enzymatique de la HRP après immobilisation.

Le potentiel formel $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc}) / 2$ est d'environ 0,075 V. Il est proche de la valeur de 0,08 V par rapport à une référence ECS, obtenue en immobilisant la HRP sur des nanoparticules d'or électrodéposées sur une électrode d'oxyde d'indium-étain [33] et il est plus positif que la valeur obtenue pour la HRP en solution [34], la HRP fixée sur des nanotubes de TiO_2 [35] et sur d'autre substrat [36, 37]. Ceci signifie que la HRP immobilisée sur une

surface fonctionnalisée de SiP peut avoir besoin de moins d'énergie d'activation pour effectuer un transfert direct d'électrons avec l'électrode. Cela peut être attribué au microenvironnement favorable du SiP fonctionnalisé pour l'immobilisation des protéines.

La Figure (IV-12) représente les voltampérogrammes cycliques de l'électrode du SiP immobilisée avec HRP dans 0,06 M de PBS à pH=7 enregistrés à différentes vitesses de balayage (20-500 mVs⁻¹).

Ces voltampérogrammes présentent les caractéristiques des processus d'oxydoréduction quasi-irréversible d'espèces immobilisées [19]. Les pics d'oxydation et de réduction ne sont pas symétriques, la séparation de pic ($E_p = E_{pa} - E_{pc}$) n'est pas nulle et augmente avec l'augmentation de la vitesse de balayage du potentiel, révélant un transfert de charge lent entre le centre actif de la HRP immobilisée et l'électrode. Cela est probablement dû à la résistivité de la couche de SiP qui est fortement dépletée. En effet, il a été rapporté que l'irréversibilité de certains systèmes immobilisés est due aux propriétés de surface [24, 29, 38- 40].

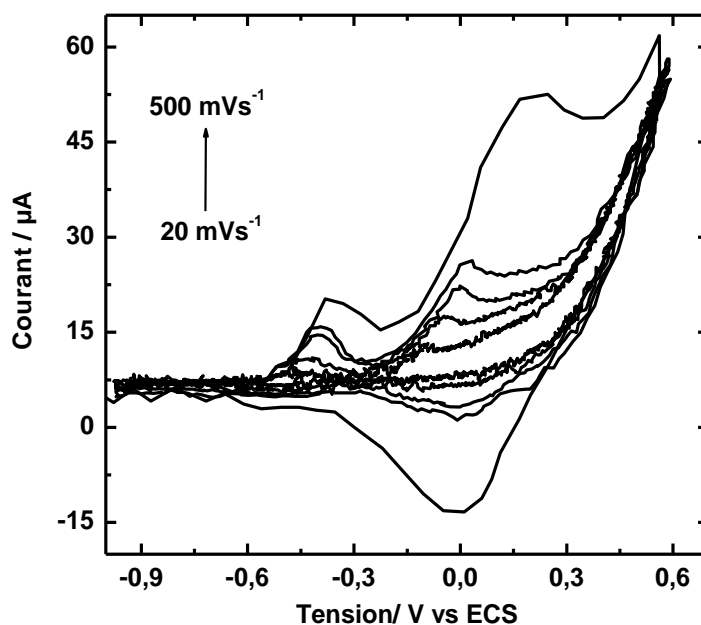


Figure. IV. 12. Voltampérogrammes cycliques de la surface du SiP immobilisée avec la HRP dans 0.06 M de PBS, pH=7 à différentes vitesses de balayage, $V = (20, 50, 100, 250 \text{ and } 500 \text{ mVs}^{-1})$.

La figure (IV-13) montre une variation linéaire de l'intensité des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage du potentiel de la surface du SiP immobilisée avec la HRP. Ceci indique que le processus détecté correspond, effectivement à l'enzyme immobilisée à la surface de SiP [29]. Contrairement au cas d'un processus

électrochimique en solution (contrôlé par la diffusion de l'espèce à l'électrode), où le courant des pics est proportionnel à $v^{1/2}$.

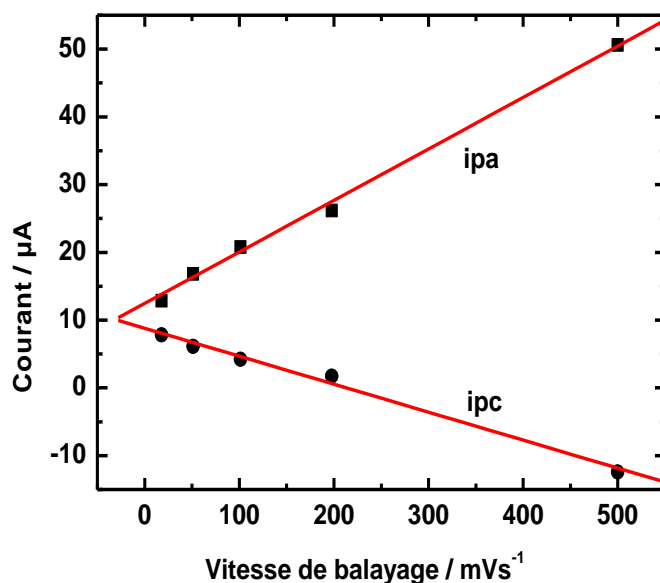


Figure. IV. 13. Tracé de l'évolution du courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage.

II.2. Etude électrochimique de la HRP immobilisée sur le SiP en présence de H₂O₂

Le comportement électrochimique de la HRP immobilisée à la surface de SiP en présence de H₂O₂ est illustré sur la figure (IV-14-b). Par comparaison, la figure (IV-14-a) montre le voltampérogramme d'oxydoréduction de la HRP immobilisée à la surface du SiP dans 0,06 M de PBS à pH=7 en absence de H₂O₂.

Lorsque le H₂O₂ avec une concentration de $20 \cdot 10^{-6}$ M est injecté dans la solution mère (PBS, pH=7), nous observons la disparition du pic anodique à 0,15 V relatif à l'oxydation directe de la HRP, cependant nous avons remarqué la présence du pic correspondant à la réduction du site électroactif de la HRP.

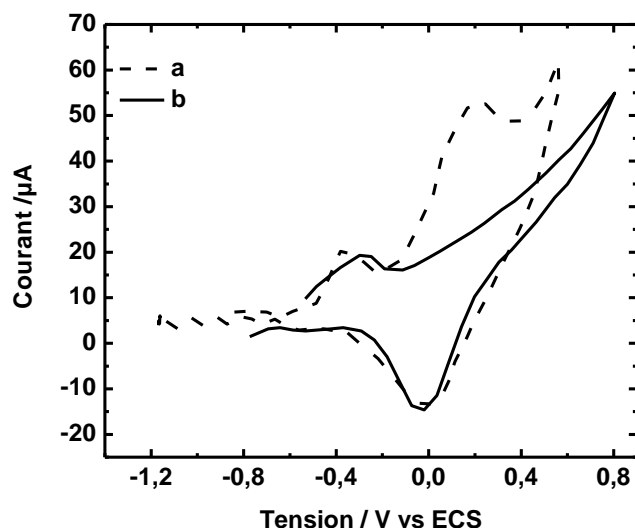
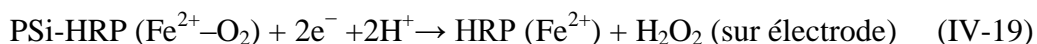
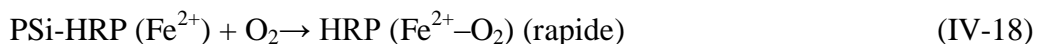
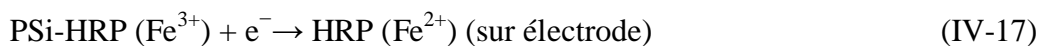
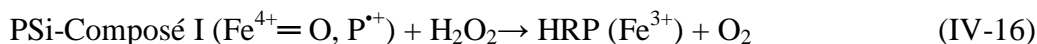
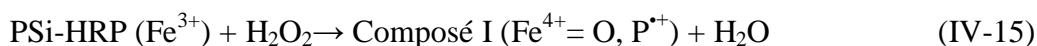


Figure. IV. 14. Voltampérogrammes cycliques des surfaces modifiées de SiP avec HRP dans 0.06 M de PBS pH=7, a) 0 M H₂O₂, b) 20.10⁻⁶ M H₂O₂. Vitesse de balayage = 500mVs⁻¹

En s'appuyant sur les travaux de Ghamouss et al et Yin et al, le mécanisme de la réduction électrocatalytique de H₂O₂ dans ce travail peut être exprimé comme suit [41, 42]:



Dans les réactions (IV-15) et (IV-16), le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ agit comme un oxydant et un réducteur, respectivement. La HRP (Fe³⁺) est oxydée en premier lieu, par H₂O₂ pour produire le composé intermédiaire I (Fe⁴⁺ = O, P^{•+}), puis le composé I est réduit par le H₂O₂ par le transfert de deux électrons et il en résulte la HRP native (Fe³⁺) et O₂. Après avoir accepté un électron de l'électrode, la HRP (Fe³⁺) se réduit pour former la HRP (Fe²⁺) (réaction IV-17). Dans la réaction (IV-18), la HRP (Fe²⁺) réagit très rapidement avec O₂ en solution produisant la HRP (Fe²⁺-O₂). Ce dernier subit une réduction électrochimique sur l'électrode au même potentiel de réduction de la HRP (Fe³⁺), produisant ainsi le H₂O₂ et la HRP (Fe²⁺) (réaction IV-19).

La figure (IV-15-a) montre les voltampérogrammes cycliques enregistrés à différentes vitesses de balayage, dans 0,06 M de PBS à pH=7 contenant $20 \cdot 10^{-6}$ M de H_2O_2 d'une surface de SiP immobilisée avec HRP. Les vitesses de balayage ont été variées de 50 à 500 mVs^{-1} .

La proportionnalité de l'intensité du pic à la vitesse de balayage (figure IV-15-b) révèle qu'il s'agit effectivement d'un processus redox en surface [16].

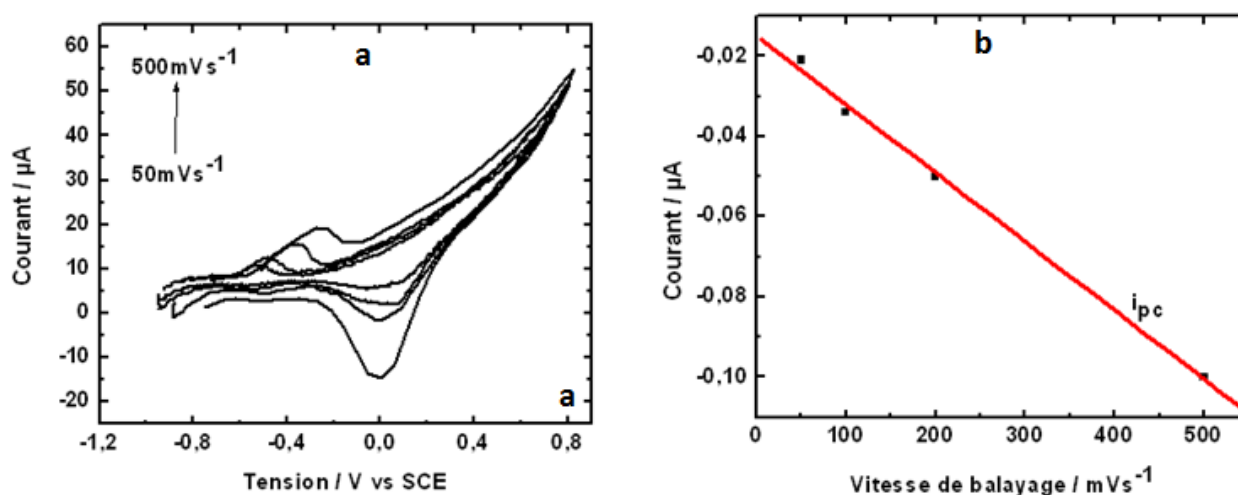


Figure. IV. 15. a) Voltampérogrammes cycliques de la surface du SiP immobilisée avec HRP dans 0.06 M de PBS pH=7 en présence de $20 \cdot 10^{-6}$ M H_2O_2 , à différentes vitesses de balayage, $V = (50, 100, 250 \text{ and } 500 \text{ mVs}^{-1})$, b) Tracé de l'évolution du courant du pic cathodiques en fonction de la vitesse de balayage.

II.3. Etude électrochimique de la HRP immobilisée sur le SiP en présence du phénol

La réaction enzymatique des peroxydases pour la détection des composés organiques requière la présence du peroxide d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier oxyde l'enzyme et l'enzyme oxydée, revient à sa forme initiale en deux étapes (par des réactions de réduction) au cours des quelles le phénol est oxydé en espèces actives qui vont être par la suite réduites à la surface de l'électrode. L'intensité du courant de réduction est proportionnelle à la concentration du composé organique en solution, et ce, tant que la concentration de H_2O_2 n'est pas limitante [15].

Le chemin réactionnel présente un mécanisme où deux enzymes intermédiaires cinétiquement distinctes (communément notées composé I et composé II) sont formés [15]

Le mécanisme réactionnel est présenté par les réactions suivantes :



La première réaction permet l'oxydation à deux électrons du site actif (Fe^{3+}) de l'enzyme HRP par H_2O_2 pour former le premier intermédiaire « composé I » (degré d'oxydation 5+), qui contient un ion oxyferryl et un cation radicalaire π de porphyrine HRP ($\text{Fe}^{2+}=\text{O}$, $\text{P}^{\bullet+}$) (réaction IV-20). Dans la réaction suivante (réaction IV-21), le composé I extrait un électron à partir d'une molécule de phénol pour former le second intermédiaire « composé II » (état d'oxydation 4+) qui contient également un groupe oxyferryl HRP ($\text{Fe}^{2+}=\text{O}$) qui est formée par la réduction du cation radicalaire de porphyrine. Par la suite, le composé II reçoit un électron supplémentaire par une seconde molécule de phénol (réaction IV-22) permettant à l'enzyme de retourner à sa forme initiale HRP (Fe^{3+}). Lors de leurs oxydation selon les réactions (IV-21) et (IV-22), les molécules phénoliques sont principalement transformées en quinones et / ou des radicaux libres [5], qui sont des espèces électro-actives et peuvent être réduites électrochimiquement pour retourner à leur forme initiale sur la surface de l'électrode (réaction IV-23).

Sur la figure (IV-16-b) est illustré le voltampérogramme cyclique de du SiP modifié avec la HRP en présence de quantités appropriées de H_2O_2 et de phénol. A titre de comparaison, le voltampérogramme cyclique du SiP immobilisé avec HRP dans 0,06 M de PBS précédemment indiqué ci-dessus, est également affiché (figure IV-16-a).

En présence de H_2O_2 , la HRP immobilisée subit une oxydation par le peroxyde d'hydrogène selon la réaction (IV-20), ainsi le processus d'oxydoréduction correspondant à l'électrochimie directe de la HRP immobilisée ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$) sur la surface de l'électrode tel il a été montré sur la figure (IV-16-a), n'est pas observée dans la (figure IV-16-b). Cependant, outre le pic d'oxydation du SiP, la figure (IV-16-b) présente un pic de réduction à -0,22 V. Ce pic est probablement attribué à la réduction électrochimique sur l'électrode de travail (réaction (IV-23)), des quinones et / ou des radicaux phénoxy formés lors de l'oxydation du composé phénolique par l'enzyme conformément à la réaction (IV-22).

Orozco et al ont trouvé le même courant catalytique à -0,1 V par rapport à une référence de Ag / AgCl, correspondant à la réduction du catéchol en présence de H_2O_2 sur une ultra-microélectrode d'Or immobilisée avec la HRP [43]. Ce pic de réduction peut être quantifié et devrait être proportionnelle à la concentration du phénol dans la solution.

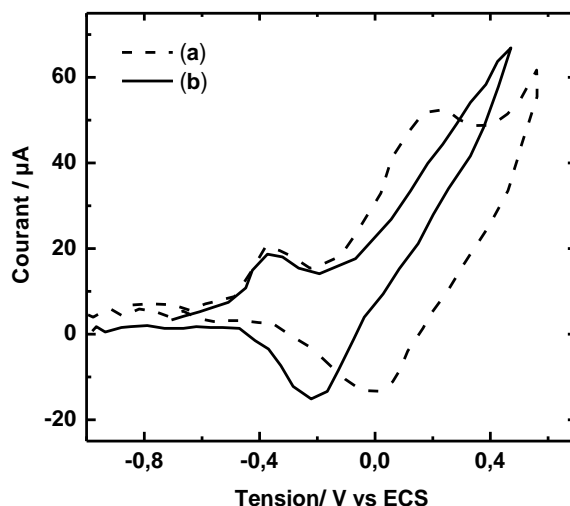


Figure. IV. 16. Voltampérogrammes cycliques de la surface de SiP immobilisée avec HRP dans 0.06 M de PBS, pH=7 a) 0 M phénol et 0 M H₂O₂, b) 48.10⁻⁶ M phénol et 20.10⁻⁶ M H₂O₂. Vitesse de balayage = 500 mVs⁻¹.

II.3. 1. Etude de l'effet de la concentration du phénol sur la réponse de la HRP immobilisée

La figure (IV-17) représente les réponses voltamétriques du SiP immobilisé avec HRP pour différentes concentrations de phénol (48.10⁻⁶, 25.10⁻⁷ et 30.10⁻⁸M) dans 0,06 M de PBS (pH = 7) contenant 2.10⁻⁵M de H₂O₂. Nous constatons que l'intensité du pic cathodique augmente avec l'augmentation de la concentration du phénol dans la solution.

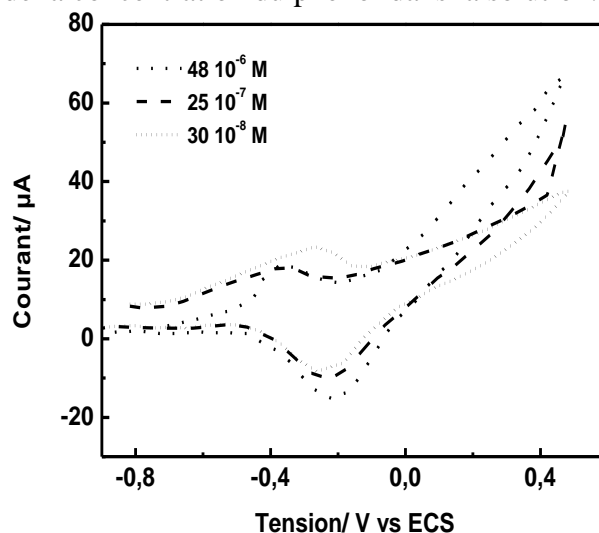


Figure. IV. 17. Réponses voltamétriques de la HRP immobilisée sur la surface fonctionnalisée du SiP pour différentes concentrations de phénol (48.10⁻⁶, 25.10⁻⁷ et 30.10⁻⁸ M) dans 0.06 M de PBS (pH=7) en présence de 2.10⁻⁵ M de H₂O₂.

La courbe de calibration montrée sur la figure (IV-18) montre que l'intensité du pic de courant cathodique augmente de manière linéaire avec la concentration du phénol, avec une

pende de 3,24 et R^2 de 0,98. On note que la linéarité est obtenue pour des faibles concentrations, ce qui rend ces structures utiles pour les applications réelles.

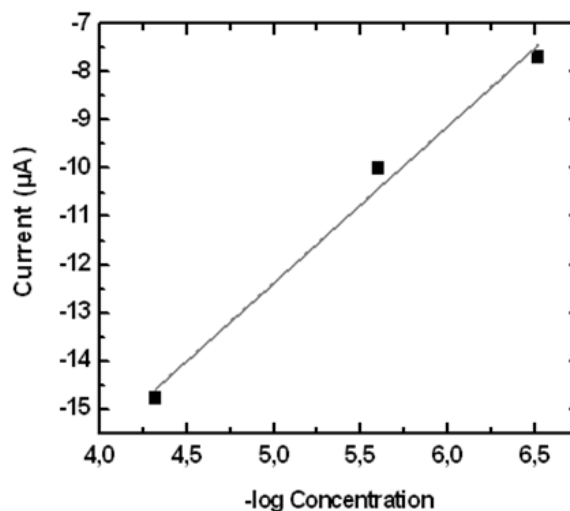


Figure. IV. 18. Courbe de calibration du phénol dans 0.06 M PBS (pH=7) et 2.10^{-5} M H_2O_2 , sur l'électrode du SiP modifié avec la HRP.

II.3. 2. Stabilité de la réponse électrochimique de la HRP immobilisée

La reproductibilité et la stabilité de la réponse de l'enzyme HRP immobilisée sur la surface fonctionnalisée du SiP au phénol ont été vérifiées en effectuant plusieurs voltampérogrammes cycliques avec la même vitesse de balayage (500 mVs^{-1}) à des intervalles de temps différents (figure IV-19). Cette figure montre que les voltampérogrammes conservent la même apparence sur plusieurs cycles. De plus, aucune perte significative de l'intensité du courant n'a été observée.

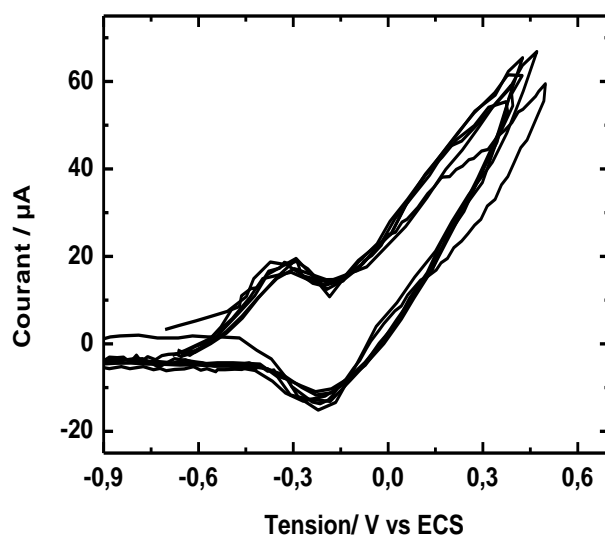


Figure. IV. 19. Stabilité de la réponse voltampérométrique de la HRP immobilisée sur la surface fonctionnalisée du SiP pour 48.10^{-6} M de phénol dans 0.06 M PBS (pH=7) en présence de 2.10^{-5} M H_2O_2 .

Conclusion

Au cours de la première partie de ce chapitre, nous avons utilisé la voltampérométrie cyclique pour l'étude électrochimique des ferrocènes couplés à la surface acide du silicium. Il a été démontré que la réaction d'oxydoréduction détectée, correspond au couple redox Fe^{3+}/Fe^{2+} dissout en solution (processus redox régi par la diffusion) et non pas à des espèces immobilisées en surface. Ce résultat indique que les ferrocènes se sont désorbés en solution dû à l'instabilité du couplage par une réaction d'estérification des ferrocènméthanol.

D'autre part, nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie de ce chapitre, à l'étude par voltampérométrie cyclique, du comportement électrochimique de la HRP immobilisée à la surface du SiP. Il a été montré qu'en absence de H_2O_2 , le transfert d'électrons entre l'électrode et le centre électroactif de la HRP immobilisée, se fait de manière directe sans médiateurs, attestant que l'activité enzymatique de la HRP immobilisée a été préservée. Cependant, l'étude électrochimique en présence de H_2O_2 a prouvé la capacité de la HRP immobilisée à la surface de SiP à détecter ce composé.

La réponse de la surface du SiP modifiée par la HRP au phénol en présence de H_2O_2 a été démontrée par l'observation d'un pic cathodique correspondant à la réduction des espèces phénoliques préalablement oxydées par l'enzyme. De plus, la réponse linéaire de la surface modifiée du SiP par la HRP au phénol démontre que la structure peut être utilisée pour le développement de capteurs de composés phénoliques.

Références

- [1] **G. Busca, S. Berardinelli, C. Resini, L. Arrighi**, Journal of Hazardous Materials, 160 (2008), 265.
- [2] **T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumiya, T. Hanaoka, F. Mizukami, M. Ono**, Sensors and Actuators B, 153, (2011), 361.
- [3] **R. D. C. Silva Luz, F. S. Damos, A. B. de Oliveira, J. Beck, L. T. Kubota**, Sensors and Actuators B, 117, (2006), 274.
- [4] **S. M. Yang, Y. M. Li, X. M. Jiang, Z.C. Chen, X. F. Lin**, Sensors and Actuators B, 114, (2006), 774.
- [5] **S. S. Rosatto, L. T. Kubota, G. de Oliveira Neto**, Analytica Chimica Acta, 390, (1999), 65.
- [6] **A. Jaafar, A. Musa, Y. H. Lee, K. Nadarajah, S. Hamidah**, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386, (2006), 1285.
- [7] **B. F. Simón, J. Pérez-Illarbe, T. Hernández, C. Gómez-Cordovés, I. Estrella**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, (1992), 1531.
- [8] **L. Dao, M. Friedman**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, (1992), 2152.
- [9] **T. Ruzgas, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga**, Analytica Chimica Acta, 311, (1995), 245.
- [10] **L. Gorton, G. Jönsson-Petersson, E. Csöregi, K. Johansson, E. Domínguez, G. Marko-Varga**, Analyst, 117, (1992), 1235.
- [11] **G. Marko-Varga, J. Emneus, L. Gorton, T. Ruzgas**, Trends in Analytical Chemistry, 14, (1995), 319.
- [12] **Anonyme**, Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse. Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd. New Delhi, (1979).
- [13] **K. E. L. Eriksson, R. A. Blanchette and P. Ander**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, (1990).
- [14] **L. Fernandez, I. Ledezma, C. Borrás, L. A. Martínez, H. Carrero**, Sensors and Actuators B, 182, (2013), 625.
- [15] **T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga**, Analytica Chimica Acta, 330, (1996), 123.
- [16] **A. J. Bard, L. R. Faulkner**, Electrochimie: Principes, méthodes et application. Ed. Masson : Paris, (1983).
- [17] **E. Laviron**, J. Electroanal. Chem, 101, (1979), 19.
- [18] **E. Laviron, L. Roullier**, J. Electroanal. Chem, 115, (1980), 65.
- [19] **E. Laviron**, Journal of Electroanalytical Chemistry, 100, (1979), 263.
- [20] **R. W. Murray**, Acc. Chem. Res, 13, (1980), 135.
- [21] **J. R. Lenhard, R. Rocklin, H. Abruna, K. Willman, K. Kuo, R. Nowak, R. W. Murray**, J. Am. Chem. Soc, 100, (1978), 5213.
- [22] **A. T. Hubbard, F. C. Anson**, Anal. Chem, 38, (1966), 58.
- [23] **M. S. Wrighton, M. C. Palazzotto, A. B. Bocarsly, J. M. Bolts, A. B. Fischer, L. Nadjo**, J. Am. Chem. Soc, 100, (1978), 7264.
- [24] **P. R. Moses, R. W. Murray**, Journal of Electroanalytical Chemistry, 77, (1977), 393.
- [25] **L. S. Hernández-Muñoz, M. A. González-Fuentes, B. R. Díaz-Sánchez, R. Frago-Soriano, C. Vázquez-López, F. J. González**, Electrochimica Acta, 63, (2012) 287.

- [26] E. I. Rogers, D. S. Silvester, D. L. Poole, L. Aldous, C. Hardacre, R. G. Compton, *J. Phys. Chem. C*, 112, (2008), 2729.
- [27] G. Riveros, G. González, B. Chornik, *J. Braz. Chem. Soc.*, 21, (2010), 25.
- [28] A. B. Bocarsly, E. G. Walton, M. G. Bradley, M. S. Wrighton, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 100, (1979), 283.
- [29] Y. J. Teng, S. H. Zuo, M. B. Lan, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, (2009), 1353.
- [30] R. W. Murray, in: A. J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, (1984), 191.
- [31] J. G. Zhao, R. W. Henkens, J. Stonehuerner, J. P. O'Daly, A. L. Crumbliss, *J. Electroanal. Chem.*, 327, (1992), 109.
- [32] H. Yin, S. Ai, W. Shi, L. Zhu, *Sensors and Actuators B*, 137, (2009), 747.
- [33] J. W. Wang, L. P. Wang, J. W. Di, Y. F. Tu, *Talanta*, 77, (2009), 1454.
- [34] H. A. Harbury, *The Journal of Biological Chemistry*, 225, (1957), 1009.
- [35] F. H. Wu, J. J. Xu, Y. Tian, Z. C. Hu, L. W. Wang, Y. Z. Xian, L. T. Jin, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, (2008), 198.
- [36] X. J. Zhao, Z. B. Mai, X. H. Kang, X. Y. Zou, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, (2008), 1032.
- [37] F. Li, Y. Feng, Z. Wang, L. M. Yang, L. H. Zhuo, B. Tang, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, (2010), 2244.
- [38] X. Chen, C. Fu, Y. Wang, W. Yang, D. G. Evans, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, (2008), 356.
- [39] X. Chen, C. Ruan, J. Kong, J. Deng, *Anal. Chim. Acta*, 412, (2000), 89.
- [40] J. Castillo, E. Ferapontova, D. I. Hushpulia, F. Tasca, V. Tishkov, T. Chubar, I. Gazaryan, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.*, 588, (2006), 112.
- [41] F. Ghamouss, S. Ledru, N. Ruille, F. Lantier, M. Boujtita, *Anal. Chim. Acta*, 570, (2006), 158.
- [42] H. S. Yin, S. Y. Ai, W. J. Shi, L. S. Zhu, *Sens. Actuators B: Chem.*, 137, (2009), 747.
- [43] J. Orozco, C. Fernandez-Sanchez, C. Jimenez-Jorquera, *Procedia Chemistry*, 1, (2009), 666.

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse a été partagé sur deux volets.

Nous nous sommes intéressés dans le premier volet à l'immobilisation d'une enzyme de la famille des oxydoréductases, la Horse Radish Peroxydase (HRP) sur une surface fonctionnalisée du silicium méso-poreux. Le deuxième volet de ce travail a été consacré à l'étude du comportement électrochimique des surfaces immobilisées du SiP afin de détecter le phénol.

Le substrat de SiP a été élaboré par voie électrochimique dans une solution de HF. La mesure par gravimétrie a révélé une porosité de 60% pour le SiP formé et l'analyse réalisée par MEB a montré la formation d'une couche méso-poreuse avec un diamètre moyen des pores de 10-15nm.

La modification de la surface de SiP par l'enzyme a été réalisée en suivant un procédé à multi-étapes compatible avec les conditions requises pour l'accrochage de cette molécule biologique tout en préservant son activité catalytique.

Dans un premier temps une monocouche organique portant des groupements acide en bout de chaîne a été greffée par une réaction d'hydrosilylation thermique entre l'acide undécylénique et la surface hydrure de SiP. La réaction prend place par la double liaison C=C de l'acide undécylénique et mène à la formation d'une monocouche organique greffée de manière covalente à la surface à travers les liaisons Si-C. Le choix d'une monocouche d'acide comme surface de départ a été fait dans le but d'accrocher l'enzyme par une réaction d'amidation entre l'amine contenue dans ces molécules et les terminaisons acides en surface. Or, l'activation de ces terminaisons acides a été nécessaire pour que la réaction d'amidation ait lieu. Cette activation a été réalisée en utilisant le N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de l'agent de couplage N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) afin de transformer les terminaisons acides en ester de succinimidyle. Enfin, l'accrochage covalent de l'enzyme (à travers la formation d'une liaison amide) a été réalisé par une réaction d'amidation entre l'amine primaire contenue dans ces molécules et la surface activée (l'ester de succinimidyle).

Les surfaces de silicium méso-poreux après chaque étape de fonctionnalisation ont été caractérisées par des mesures de l'angle de contact et par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Les résultats ont montré l'efficacité du greffage covalent de la HRP et sans aucune oxydation de surface.

Les mesures électrochimiques par voltampérométrie cyclique sur des surfaces de HRP-SiP dans une solution tampon de PBS de pH=7, ont prouvé que le transfert d'électrons entre l'électrode et le centre électro-actif de la HRP immobilisée se fait de manière directe sans médiateurs, attestant de la préservation de l'activité enzymatique de la HRP immobilisée.

Par ailleurs, les résultats relatifs à la détection électrochimique du phénol par la surface du SiP modifiée par la HRP, en présence d'une concentration appropriée de H₂O₂, montrent la présence d'un pic cathodique correspondant à la réduction des espèces phénoliques préalablement oxydées par l'enzyme. De plus, ce pic de réduction est proportionnel à la concentration du phénol en solution.

Ainsi, la réponse linéaire de la surface du SiP modifiée par HRP aux différentes concentrations du phénol, démontre d'une part la capacité de tels dispositifs à détecter des composés organiques et d'autre part, la possibilité de leur utilisation pour des applications réelles.

A l'issue de ces résultats intéressants, une étude analytique complète (sélectivité, sensibilité, limite de détection) sera menée en perspective sur les électrodes de SiP modifiées avec HRP afin de valider ces systèmes pour la détection des composés organiques in-situ. Il serait également intéressant de poursuivre l'étude sur l'immobilisation d'autres enzymes (telle que la tyrosinase) sur le SiP fonctionnalisé à fin d'élargir l'intervalle des polluants à détecter.

ANNEXES : TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION

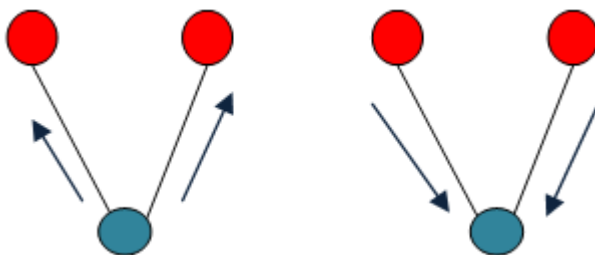
ANNEXE I : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Afin de suivre l'évolution de la surface de silicium avant et durant les différentes phases de l'attaque chimique, nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge.

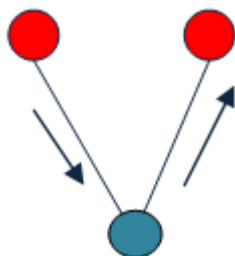
1. Principe de la spectroscopie infrarouge vibrationnelle

Il existe de nombreuses interactions entre un rayonnement infrarouge (IR) incident et une molécule. Un phénomène de résonance peut intervenir lorsqu'un faisceau IR traverse la molécule ou s'y réfléchit. Si la fréquence de résonance du rayonnement est différente de celle des vibrations moléculaires rencontrées ; la radiation n'est pas absorbée. Dans le cas contraire, la radiation perd une partie de son énergie : la molécule (ou une partie de la molécule) dont les atomes sont animés d'un mouvement de fréquence identique, absorbe cette énergie. Les mouvements moléculaires sont classés en différentes catégories.

Dans une molécule on peut avoir différents modes de vibration de liaison et une liaison peut avoir différents modes de vibration. Ces modes sont :

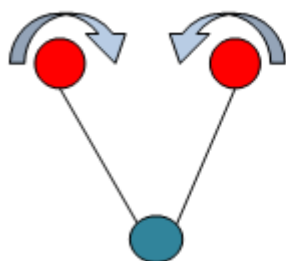
➤ Modes d'élongation

Le mode d'élongation symétrique

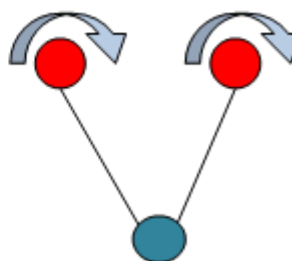


Le mode d'élongation antisymétrique

➤ Modes de déformation

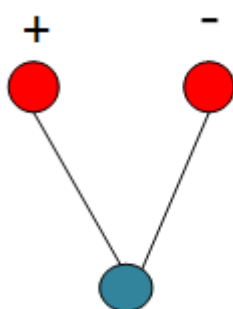


Cisaillement

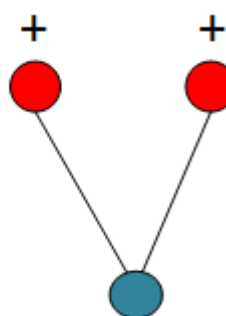


Rotation

Déformations dans le plan



Torsion



Balancement

Déformations hors plan

+ Signifie que le groupe se déplace vers l'avant.

– Signifie que le groupe se déplace vers l'arrière.

2. Principe de fonctionnement du spectromètre FTIR

Le spectromètre FTIR est constitué de deux compartiments interconnectés : le banc optique et le compartiment de l'ordinateur.

Le banc optique contient une source qui émet une radiation infrarouge, un interféromètre de Michelson et un détecteur. La figure 1 décrit le schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier.

Le rayon infrarouge produit par la source est dirigé vers l'interféromètre. A l'intérieur de ce dernier, le faisceau est immédiatement dévié en deux moitiés par la séparatrice. Une partie de la lumière est délivrée sur un miroir fixe et l'autre sur un miroir mobile, ce dernier a un mouvement de va et vient. Les deux rayonnements qui ont été réfléchis par les deux miroirs se recombinaient au niveau de la séparatrice pour continuer et atteindre l'échantillon. Après

avoir traversé l'échantillon, le faisceau atteint un détecteur qui enregistre l'interférogramme qui représente l'intensité du signal en fonction de la différence de marche produit par les différentes positions du miroir mobile de l'interféromètre. La transformée de Fourier de ce signal fournit le spectre infrarouge en fonction du nombre d'onde.

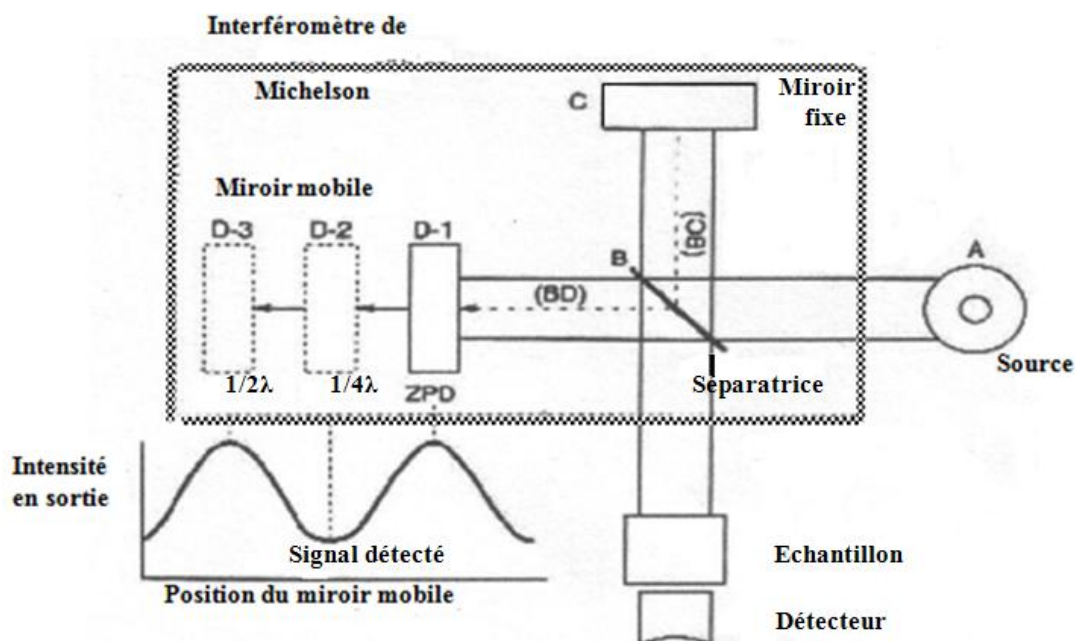


Figure. 1. Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

3. Mesures infrarouges en transmission

Les mesures infrarouges en transmission effectuées sur les échantillons de silicium poreux ont été réalisées en plaçant l'échantillon à 90° par rapport à la direction du faisceau incident. Le faisceau infrarouge traverse l'échantillon pour être ensuite mesuré par un détecteur, le DTGS (Deuterated Tri Glycine Surface) travaillant à température ambiante (Figure 2). Tous les spectres ont été enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} , avec 100 scans et une résolution de 4 cm^{-1} .

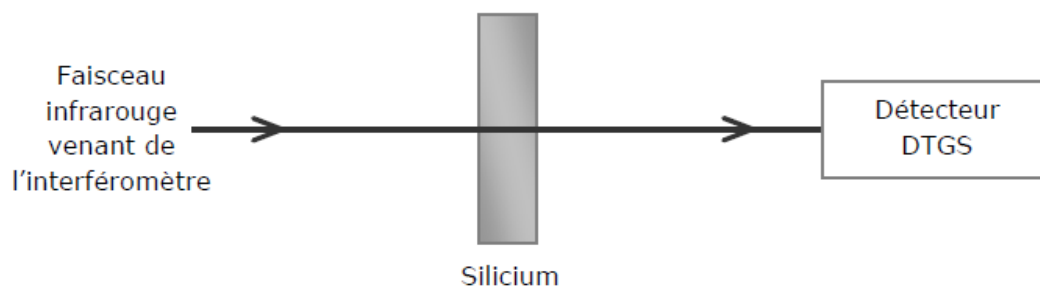


Figure. 2. Schéma des mesures FTIR en transmission

Le dispositif avec lequel les spectres d'absorption infrarouge ont été obtenus est un spectromètre à transformée de Fourier de type « Thermo-Nicolet ».

Dans ce travail, les spectres FTIR sont montrés en absorbance. Cela correspond à des pics positifs pour les espèces qui apparaissent sur la surface mesurée par rapport à une surface de référence qui est une surface de silicium hydrogénée. L'absorbance A (ou densité optique) est reliée à la concentration des espèces chimiques par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon l C$$

ε : Coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudié à une longueur d'onde donnée en $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

l : Epaisseur traversée en cm

C : la concentration en mol L^{-1}

L'absorbance A est déduite de l'intensité I du spectre étudié et de l'intensité I_0 d'un spectre de référence par la relation : $A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

Ainsi, les changements d'absorption observés permettent de connaître l'évolution (disparition ou apparition) des différents groupements chimiques présents.

4. Mesures infrarouges en mode ATR

La spectroscopie infrarouge utilisant la géométrie en réflexions internes multiples (la réflexion totale atténuée ATR : Attenuated Total Reflexion), a été utilisée pour les échantillons de silicium plan. Cette technique présente l'avantage d'augmenter la sensibilité de la mesure grâce à une amplification du signal associée aux réflexions multiples au sein de l'échantillon étudié. Pour avoir la réflexion totale, l'indice de réfraction du matériau doit être plus élevé que le milieu adjacent. C'est le cas du silicium.

Les échantillons de silicium utilisés pour cette géométrie sont biseautés à 45° sur les deux bords par un polissage mécanique : les échantillons de silicium découpés sous forme carrée sont collés à la cire entre deux supports en aluminium formant un prisme (Figure 3), puis polis en différentes étapes à l'aide de papiers abrasifs de cinq tailles de grains décroissantes et on finit le polissage avec une pâte diamantées (tailles des grains de 3 à $1\mu\text{m}$).

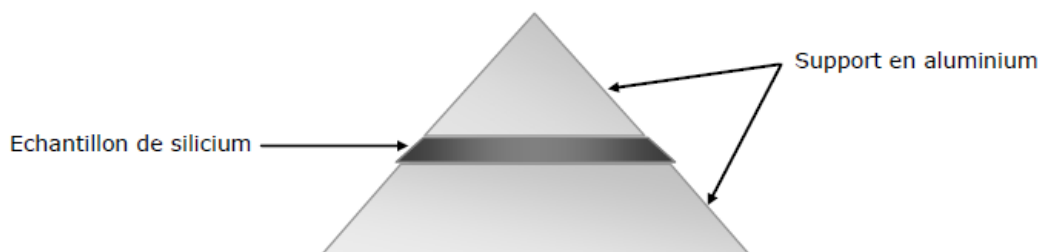


Figure 3. Polissage de l'échantillon de silicium sous forme d'un prisme.

La figure (4) représente le schéma des mesures FTIR en géométrie ATR. Un premier miroir parabolique permet de focaliser le faisceau provenant de l'interféromètre sur un des bords biseautés de l'échantillon. Après différentes réflexions internes, le faisceau infrarouge qui ressort du prisme de silicium est focalisé par deux autres miroirs paraboliques sur le détecteur.

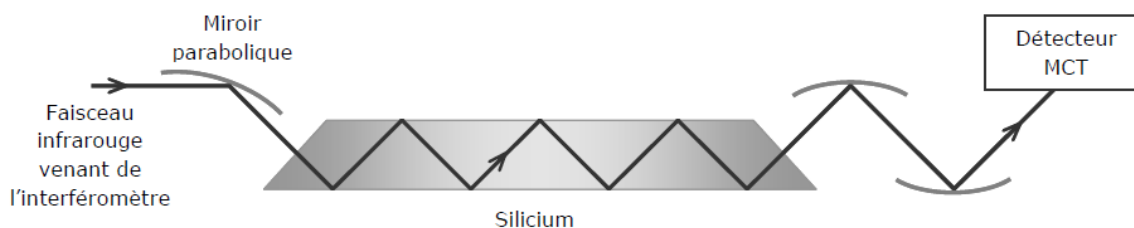


Figure 4. Schéma des mesures FTIR en géométrie ATR.

Le nombre de réflexions à l'intérieur du prisme est donné par la relation :

$$N = L / e \tan(\phi)$$

Où L est la longueur du prisme, e est l'épaisseur de l'échantillon de silicium, ϕ est l'angle d'incidence du faisceau par rapport au plan de la surface. Ce nombre de réflexions dépend de l'angle du biseau (ϕ') par lequel entre le faisceau : on a $\phi = \pi/2 - \phi'$. Dans ce travail $L = 14$ mm, $e = 500 \mu\text{m}$ et $\phi = 45^\circ$ donnant $N = 28$.

Dans le cas d'une mesure en géométrie ATR, le détecteur utilisé est un détecteur MCT (Mercure Cadmium Tellurure). Ce détecteur est une jonction p-n faite à base d'un semiconducteur à petit gap qu'il convient de refroidir à l'azote liquide avant utilisation. Le compartiment contenant le détecteur, les miroirs paraboliques ainsi que l'échantillon, est purgé à l'azote. Le détecteur MCT présente une coupure autour de 900 cm^{-1} . Les spectres infrarouges sont donc analysables sur une gamme de nombre d'onde comprise entre 900 et 4000 cm^{-1} . Les spectres sont obtenus par une accumulation de 200 scans de l'interféromètre avec une résolution de 4 cm^{-1} .

Lorsque les mesures sont effectuées en polarisation, un polariseur placé avant l'échantillon est alternativement positionné en polarisation s et p. En polarisation s, le champ électrique de l'onde est dans le plan de la surface. Cela permet de sonder les composantes des dipôles parallèles à la surface. En polarisation p, le champ électrique de l'onde est dans le plan d'incidence. Cela permet de sonder les composantes des dipôles perpendiculaires à la surface.

ANNEXE II : Mesure d'angle de contact

La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. La mesure de l'angle de contact permet la détermination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide / solide. Il est ainsi possible de déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe de l'échantillon. L'angle de contact dépend fortement de l'état de surface. Cette dernière se doit d'être exempte de tout contaminant. De plus, la rugosité ainsi que l'hétérogénéité chimique influe fortement sur cet angle. Il est à noter que le liquide sonde la surface sur plusieurs angströms en profondeur, ainsi l'angle ne dépend pas uniquement de la couche atomique superficielle mais aussi des groupements présents plus en profondeur.

D'un point de vue pratique, une goutte d'eau ultra-pure de 1 μL est déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon à analyser. Ce dernier est éclairé sur le côté par un faisceau de lumière blanche afin que la caméra puisse enregistrer l'ombre de la goutte (Figure.3).

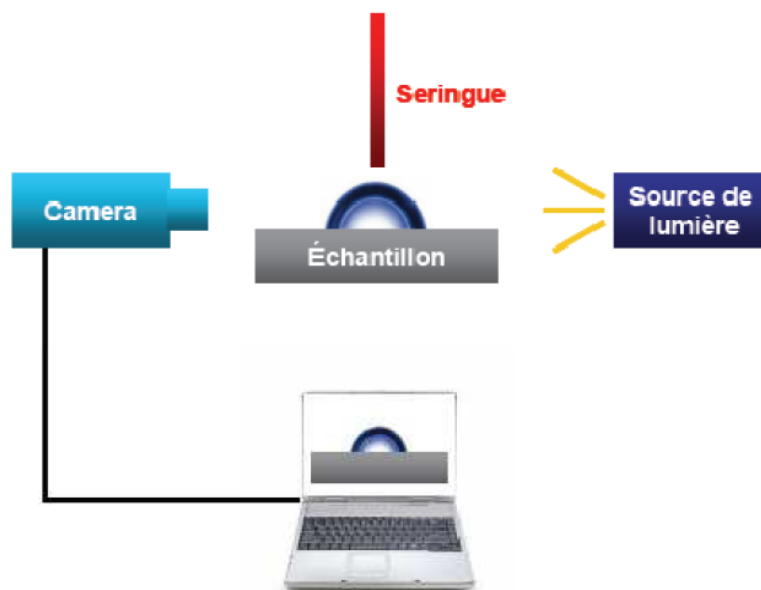


Figure. 3. Dispositif expérimental de mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle se fait à partir d'images capturées par un PC *via* une caméra. Le logiciel Visio drop permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images. Il détermine ensuite l'angle de contact grâce à des méthodes d'interpolation. La mesure de l'angle de contact se fait sur un appareil *DigiDrop* équipé d'une caméra USB.

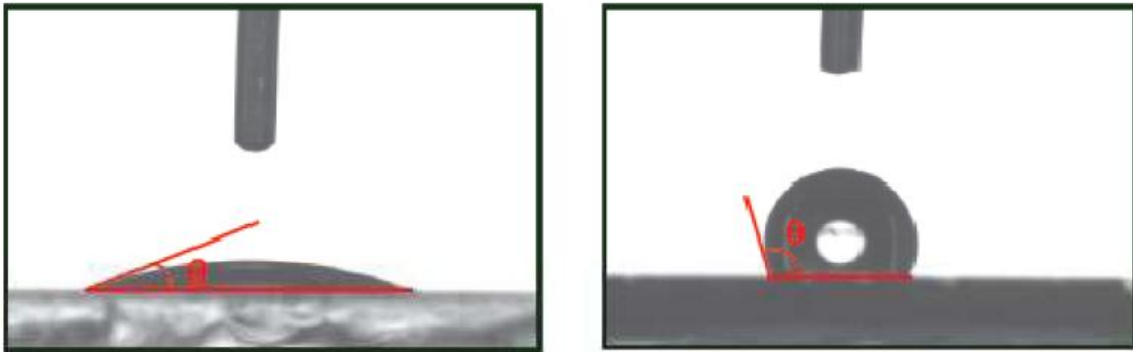


Figure.4. Goutte d'eau sur une surface hydrophile $\theta = 5^\circ$ (gauche) et sur surface hydrophobe (droit)

- tension interfaciale solide-liquide γ_{SL} (J/m^2)
- tension interfaciale solide-vapeur γ_{SV} (J/m^2)
- tension interfaciale liquide-vapeur γ_{LV} (J/m^2)

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young qui est la base de la plupart des méthodes de calcul de l'énergie de surface : $\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos\theta$

ANNEXE III : Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage est une technique permettant de réaliser des images de la surface d'objets en 3 dimensions avec une très haute résolution de l'ordre du nanomètre. Elle permet également la microanalyse d'un échantillon pour identifier et quantifier les éléments chimiques présents à sa surface. Cette technique est basée sur le principe des interactions électrons-matière. L'interaction électron-matière donne naissance à divers rayonnements : électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons transmis, rayons X et électrons Auger (Figure 5). A chacun de ces phénomènes correspond un mode de fonctionnement avec formation d'image.

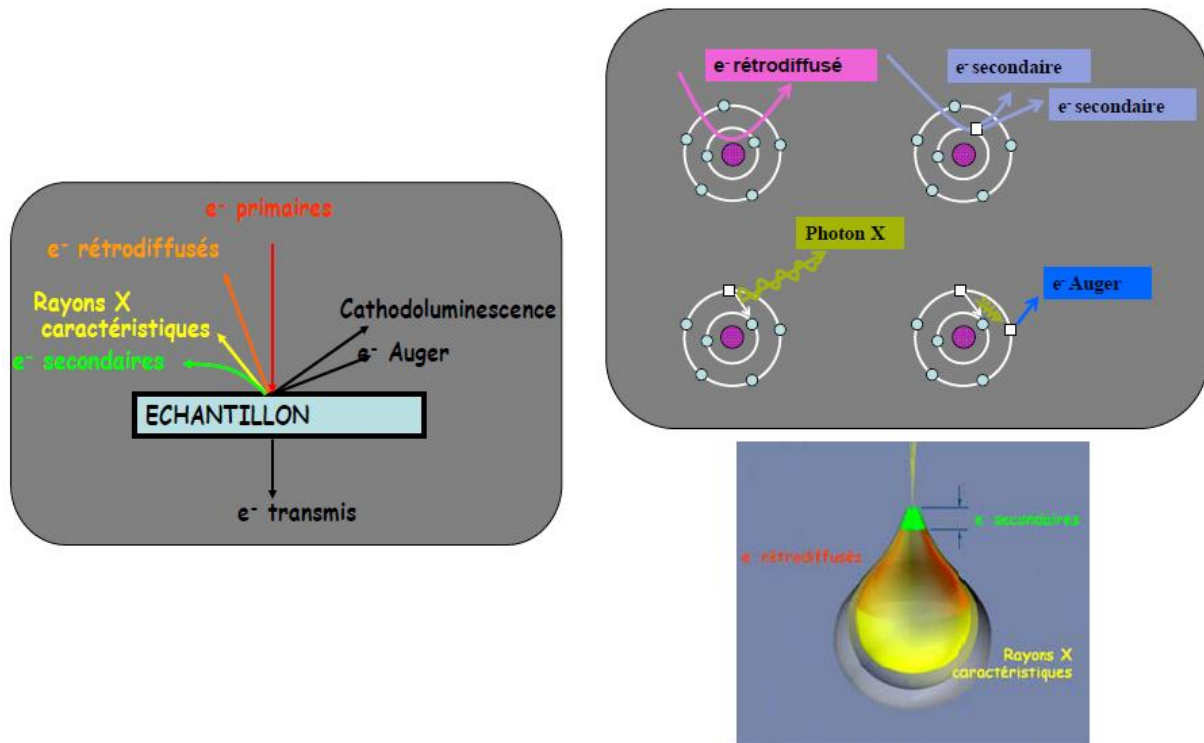


Figure.5. Signaux produits par interaction d'un électron primaire avec l'échantillon

Analyse morphologique

La détection des électrons secondaires est le mode classique d'observation de la morphologie de la surface. Le principe général consiste à balayer l'échantillon à observer par un faisceau électronique et on vient détecter les électrons secondaires de très faible énergie qui sont produits suite au bombardement de l'échantillon. Ces électrons secondaires sont amplifiés, détectés puis interprétés pour reconstruire une image en fonction de l'intensité du courant électrique produit. Le MEB réalise donc une topographie de l'échantillon à analyser, c'est pourquoi le MEB fournit des images en noir et blanc ou chaque nuance de gris est le résultat de l'intensité du courant détecté.

Les électrons secondaires captés proviennent d'un volume étroit (environ 10 nm). De ce fait, la zone de réémission fait à peu près le même diamètre que le faisceau. La résolution du microscope est donc le diamètre du faisceau, soit environ 10 nm. Une grille placée devant le détecteur d'électrons, polarisée positivement, attire les électrons. De cette manière, la majorité des électrons secondaires sont détectés alors que les électrons rétrodiffusés, qui ont une énergie plus élevée, ne sont quasiment pas déviés par le champ électrique produit par la grille du collecteur. La quantité d'électrons secondaires produite ne dépend pas de la nature chimique de l'échantillon, mais de l'angle d'incidence du faisceau primaire avec la surface.

Résumé

Dans cette étude, l'enzyme peroxydase de Raifort (HRP) a été immobilisée de manière covalente à la surface du silicium poreux (SiP) en utilisant une stratégie à plusieurs étapes. Tout d'abord, les terminaisons acides ont été générées sur la surface de SiP hydrogénée par hydrosilylation thermique de l'acide undécylénique. Ensuite, les terminaisons acides sont transformées en ester de succinimidyle. Cette réaction appelée activation, est réalisée en utilisant le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de l'agent de couplage *N*-éthyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Enfin, l'enzyme a été fixée à la surface par une réaction d'amidation. La structure des couches de SiP a été observée par un microscope électronique à balayage (MEB). Les caractérisations par spectroscopie infrarouge (FTIR) et par mesure de l'angle de contact ont confirmé l'efficacité de la fonctionnalisation après chaque étape. Les cycles Voltampérométriques ont été enregistrés en utilisant les surfaces de SiP modifiées avec HRP comme électrode de travail. Les résultats obtenus montrent que l'activité enzymatique de la HRP immobilisée a été préservée et, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'enzyme oxyde les molécules phénoliques qui sont ensuite réduites sur l'électrode modifiée du SiP.

Mots clés : Silicium poreux, fonctionnalisation, Peroxydase de Raifort, Oxydation d'enzyme, Phénol.

Abstract

In this study, horseradish peroxidase enzyme (HRP) was covalently immobilized on porous silicon (PSi) surface using multistep strategy. First, acid terminations were generated on hydrogenated PSi surface by thermal hydrosilylation of undecylenic acid. Then, the carboxyl-terminated monolayer was transformed to active ester (succinimidyl ester) using *N*-hydroxysuccinimide (NHS) in the presence of the coupling agent *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Subsequently, the enzyme was anchored on the surface via an amidation reaction. The structure of the PSi layers was observed by scanning electron microscopy (SEM). Infrared spectroscopy (FTIR) and contact angle measurements confirmed the efficiency of the modification at each step of the functionalization. Cyclic voltammetry was recorded using the HRP-modified PSi as working electrode. The results show that the enzymatic activity of the immobilized HRP is preserved and in the presence of hydrogen peroxide, the enzyme oxidizes phenolic molecules which were subsequently reduced at the modified-PSi electrode.

Keywords: Porous silicon, functionalization, Horseradish Peroxidase, Enzymatic oxidation, Phenol.

المخلص:

خلال هذه الدراسة تم تثبيت انزيم بيروكسيداز الفجل بواسطة رابطة تساهمية على السطح المسامي للسيليسيوم وذلك باعتماد استراتيجية متعددة المراحل. في البداية النهايات الحمضية تم إنشاؤها عن طريق تفاعل كيميائي حراري لحمض الانديسيلينيك على السطح المهدرج للسيليسيوم المسامي. فيما بعد تم تحويل النهايات الحمضية الى استر السوكسينيميديل, هذا التفاعل الذي يسمى بالتنشيط يتم باستعمال NHS ووجود EDC كعامل اقتران. في المرحلة الاخيرة يتم تثبيت الانزيم على السطح بواسطة رابطة اميدية. لوحظت مورفولوجية السطح المسامي للسيليسيوم باستعمال مجهر المسح الالكتروني. مختلف التحليلات التي اجريت بواسطة التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء و قياس زاوية الاتصال, اثبتت كفاءة التعديل بعد كل مرحلة. سجلت دورات فولتاممري باستعمال سطح السيليسيوم المسامي المثبت عليه انزيم بيروكسيداز الفجل كقطب عمل. النتائج المحصل عليها بينت حفظ الانزيم لنشاطها الانزيمي و بوجود بيروكسيد الهيدروجين تؤكد الانزيم جزيئات الفينول التي يتم ارجاعها فيما بعد على سطح السيليسيوم المعدل.

الكلمات المفتاحية: السيليسيوم المسامي, التعديل, بيروكسيداز الفجل, اكسدة الانزيم, الفينول.