



HAL
open science

Fonctionnalisation de Nanotubes de Carbone pour le Développement de Bio-architectures Affines : Application aux Biocapteurs

Raoudha Haddad

► **To cite this version:**

Raoudha Haddad. Fonctionnalisation de Nanotubes de Carbone pour le Développement de Bio-architectures Affines: Application aux Biocapteurs. Chimie. Institut National Polytechnique de Grenoble - INPG, 2010. Français. NNT: . tel-00587933

HAL Id: tel-00587933

<https://theses.hal.science/tel-00587933>

Submitted on 21 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Monastir
Faculté des Sciences de Monastir



& Université de Grenoble
Institut Polytechnique de Grenoble



GRENOBLE Grenoble
UNIVERSITÉ



THESE EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Présentée devant

La Faculté des Sciences de Monastir

pour obtenir le grade de Docteur

DE l'Université de Monastir, délivré par la Faculté des Sciences de Monastir
Spécialité : Chimie

Et

DE l'Université de Grenoble, délivré par l'Institut Polytechnique de Grenoble
Spécialité : Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Electrochimie

Présentée et Soutenue publiquement le 23 Octobre 2010

Par

HADDAD Raoudha

Fonctionnalisation de Nanotubes de Carbone pour le Développement de Bio-architectures Affines : Application aux Biocapteurs

Devant la commission d'examen :

| | | |
|-------------|-------------------------------|----------------------------------------------------|
| Président | Mr. Mohamed El Baker Rammah | Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir |
| Rapporteurs | Mr. Khaled Boujlel | Professeur à la Faculté des Science de Tunis |
| | Mme. Hafsa Korri-Youssoufi | Chargée de Recherche CNRS-Université Paris-Sud |
| Examineur | Mme. Nicole Jaffrezic Renault | Directrice de recherche CNRS-Université Lyon I |
| Invité | Mr. Michael Holzinger | Chargé de Recherche CNRS-Université de Grenoble |
| Directeurs | Mr. Serge Cosnier | Directeur de recherche CNRS-Université de Grenoble |
| | Mr. Abderrazak Maaref | Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir |

Je Dédie ce Travail

A la mémoire de mon grand-père

A mes Parents

A mon Frère Riadh

A ma grand-mère

A tous ceux qui me sont chers

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse est une collaboration entre le Laboratoire de Physique et Chimie des Interfaces (LPCI) de la Faculté des Sciences de Monastir et le Département de Chimie Moléculaire (DCM) de l'Université Joseph Fourier de Grenoble.

Mes premiers remerciements s'adressent conjointement et tout naturellement aux directeurs de ces laboratoires, Monsieur Hafedh Ben Ouada - Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir, et Monsieur Pascal Dumy - Directeur de recherche CNRS pour m'avoir accueillie au sein de leurs établissements.

Mes remerciements s'adressent également au programme MIRA (bourse de mobilité internationale de la région Rhône Alpes), à l'Université de Monastir ainsi qu'au programme CMCU (Comité Mixte de Coopération Universitaire) pour leurs soutiens financiers

Je tiens aussi à remercier Monsieur Mohamed El Baker Rammah, Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir pour l'honneur qu'il me fait de présider le Jury de ma thèse.

Je tiens par ailleurs à remercier Monsieur Khaled Boujlel, Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir et Madame Hafsa Korri Youssoufi, Chargée de Recherche CNRS à l'Université Paris-Sud pour avoir examiné et jugé ce travail.

Mes remerciements vont également à Madame Nicole Jaffrezic Renault, Directrice de recherche CNRS à l'Université Claude Bernard Lyon I pour l'honneur qu'elle me fait d'examiner mon travail de thèse.

Durant ces trois années de thèse, j'ai pu vivre une expérience qui m'a beaucoup apporté, tant sur le plan professionnel que personnel. Cette aventure implique des personnes qui m'ont soutenue, conseillée, aidée, encouragée, chacun à sa façon... Je voudrais ici, en ces quelques lignes, les remercier même si les mots ne suffisent pas à leur exprimer ma gratitude.

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la confiance et la générosité de Monsieur Serge Cosnier, Directeur de Recherche CNRS. Je voudrais par ailleurs lui exprimer ma gratitude pour la rigueur scientifique dont il a toujours fait preuve ainsi que pour ses qualités humaines et son soutien permanent.

Je présente aussi mes remerciements à Monsieur Abderrazak Maaref, Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir pour la confiance qu'il m'a donnée durant ces années de thèse en m'accordant une grande liberté d'action.

Je présente mes remerciements les plus sincères au département de Chimie de l'Université d'Oslo en Norvège, et en particulier à Monsieur Jaan Roots Professeur à l'Université d'Oslo de m'avoir accueillie au sein de son équipe et offert l'opportunité d'apprendre la spectroscopie Raman. C'est aussi grâce à l'aide et aux conseils d'Astrid que j'ai pu améliorer mes connaissances sur cette nouvelle technique de caractérisation.

Pour l'aide qu'il m'a apportée avec dévouement et disponibilité, pour son soutien moral, pour ses conseils judicieux et ses remarques pertinentes, je voudrais remercier Monsieur Michael Holzinger, Chargé de Recherche CNRS.

Pour son aide permanente, pour sa bienveillance, pour sa bonté, je tiens à exprimer ma gratitude à Madame Karine Gorgy, Maître de conférences à l'Université Joseph Fourier.

Pour sa rigueur scientifique, pour avoir répondu à mes nombreuses questions avec patience et dévouement, je tiens aussi à remercier Madame Chantal Gondran, Maître de conférences à l'Université Joseph Fourier.

Pour avoir assuré le bon déroulement des expériences, je remercie Madame Arielle Lepellec, Technicienne au Département de Chimie Moléculaire.

Je voudrais par ailleurs remercier toute l'équipe du Département de Chimie Moléculaire, et en particulier mes colocataires de bureau durant mon séjour à Grenoble : Fabien (pour son amitié, son grand cœur, pour m'avoir supportée quand ça n'allait pas et d'avoir été là jusqu'au bout), Hajra (pour les bons moments passés ensemble à la résidence, et pour les quelques mots en Indien dont je me souviens toujours), Jessica (de s'être inquiétée quand je me sentais mal), Ludivine (pour sa clémence et son écoute), Sébastien (pour les discussions en arabe même si elles étaient courtes), Adriana (pour sa gentillesse), Xavier (pour les discussions sur les complexes).

Je n'oublierai pas de remercier aussi mes amis de la Faculté des Sciences de Monastir qui ont accompagné mon parcours universitaire : Houssine (pour son aide et sa bienveillance), Ahlem (pour son soutien quand il le fallait, sans jamais rien attendre en retour), Manel (pour avoir gardé le contact depuis les premières manipulations de travaux pratiques en première année à la Faculté), Adnane (pour les discussions scientifiques enrichissantes et sa disponibilité), Mohamed (pour contribuer avec grand cœur au bon déroulement des préparations pour la soutenance).

Je garderai toujours un excellent souvenir des moments passés avec mes amis des quatre coins du monde : Isabel (pour son indulgence et sa sympathie), Neus (pour son sourire), Marcello (pour sa spontanéité), Dan (ma sœur chinoise avec qui j'ai partagé la passion de la recherche et du voyage), Farida (pour son soutien et sa bienveillance qui ont accompagné mes premiers pas à Grenoble), Yamile (une personne magnifique qui m'a aidé à passer les derniers moments à Grenoble), Cédric

(pour les repas pleins d'encouragements et de conseils), Katia (pour ses messages d'encouragements qui me font toujours plaisir).

Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude à ma famille et spécialement à mes parents pour leur soutien moral et financier constant, leur présence et la confiance dont ils ont fait preuve. Sans eux, je n'aurais pas été ce que je suis aujourd'hui. Ils ont toujours su m'inculquer la valeur de la science, m'ont soutenue inconditionnellement pendant toute ma vie. Que ce travail leur soit dédié avec toute mon affection.

Ma profonde gratitude s'adresse aussi à mon frère Riadh, pour ses encouragements, son écoute, ses plats faits avec amour et tout le reste... à ma grand-mère pour ses prières, son soutien moral, ses pulls chauds qui m'ont aidée à supporter le froid de Grenoble.

Une pensée spéciale pour mon grand-père, une personnalité exceptionnelle qui a marqué ma vie et qui m'a toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. J'espère que je serai toujours à la hauteur de ta confiance...

Et je vous dis que la vie est réellement obscurité sauf là où il y a élan

Et tout élan est aveugle sauf là où il y a savoir

Et tout savoir est vain sauf là où il y a travail

Et tout travail est vide sauf là où il y a amour

Et qu'est-ce travailler avec amour?

C'est mettre en toute chose que vous façonnez un souffle de votre esprit

Khalil JIBRAN



Table des matières

Sommaire

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Introduction générale..... | 1 |
|-----------------------------------|----------|

Chapitre I

Les nanotubes de carbone et les biocapteurs

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I-Les nanotubes de carbone..... | 3 |
| I.1-Historique..... | 3 |
| I.2-Classification des nanotubes de carbone..... | 5 |
| I.2.1-Les nanotubes de carbone mono-feuillet..... | 5 |
| I.2.2-Les nanotubes de carbone multi-feuillets..... | 6 |
| I.3-Synthèse des nanotubes de carbone..... | 6 |
| I.4-Propriétés et applications..... | 8 |
| I.5-Fonctionnalisation..... | 9 |
| I.5.1-Fonctionnalisation covalente..... | 11 |
| I.5.2-Fonctionnalisation non-covalente..... | 12 |
| I.5.3-Fonctionnalisation endohedrale..... | 14 |
| II-Les biocapteurs..... | 14 |
| II.1-Généralités..... | 14 |
| II.2-Différentes stratégies d'immobilisation..... | 15 |
| II.2.1-Interactions avidine-biotine..... | 18 |
| II.2.2-Interactions adamantane- β cyclodextrine..... | 19 |
| II.2.3-Interactions histidine-acide nitrilotriacétique..... | 20 |
| II.3-Mécanismes réactionnels..... | 21 |
| III-Les nanotubes de carbone, un matériau pour les biocapteurs..... | 24 |
| III.1-Fonctionnalisation covalente..... | 25 |
| III.2-Fonctionnalisation non-covalente..... | 28 |
| III.3-Fonctionnalisation par électropolymérisation..... | 29 |
| Conclusion..... | 31 |
| Bibliographie..... | 32 |

Chapitre II

Dispersion et caractérisation des nanotubes de carbone

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Introduction..... | 40 |
| I-Technique de dispersion des nanotubes de carbone..... | 41 |
| II-Caractérisation des nanotubes de carbone..... | 43 |
| II.1-Caractérisation morphologique et de surface..... | 44 |
| II.1.1-Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)..... | 44 |
| II.1.2-Caractérisation par spectroscopie Raman..... | 45 |
| II.1.3-Caractérisation par mesure d'angle de contact..... | 48 |
| II.2-Caractérisation électrochimique des dépôts de nanotubes..... | 53 |
| II.2.1-Effet des nanotubes sur le potentiel d'oxydation..... | 53 |
| II.2.2- Influence des nanotubes de carbone sur l'oxydation du H ₂ O ₂ | 54 |
| Conclusion..... | 55 |
| Bibliographie..... | 56 |

Chapitre III

Biocapteurs à glucose à base de nanotubes de carbone et de poly(pyrrole-biotine)

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Introduction..... | 58 |
| I-Synthèse du motif monomère, le pyrrole-biotine..... | 59 |
| II-Electropolymérisation du pyrrole-biotine..... | 60 |
| III-Caractérisation des films de poly(pyrrole-biotine) par fluorescence..... | 67 |
| IV-Caractérisation des films de poly(pyrrole-biotine) par MEB..... | 69 |
| V-Biocapteurs à glucose à base de polypyrrole-biotine) et de SWCNT..... | 70 |
| V.1-Biocapteur de référence Pt/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-biotine..... | 71 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| V.2-Biocapteur Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-biotine..... | 73 |
| V.2.1-Effet des nanotubes de carbone..... | 73 |
| V.2.2-Optimisation du nombre de couches de nanotubes de carbone..... | 75 |
| V.2.3-Réalisation d'architectures tridimensionnelles à base de couches de nanotubes de carbone..... | 77 |
| Conclusion..... | 79 |
| Bibliographie..... | 80 |

Chapitre IV

Application des nanotubes de carbone aux biocapteurs à base de pyrène-biotine

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Introduction..... | 86 |
| I-Synthèse et caractérisation du pyrène-biotine..... | 86 |
| I.1-Synthèse du pyrène-biotine..... | 87 |
| I.2-Charactérisation du pyrène biotine..... | 87 |
| I.2.1-Charactérisation spectroscopique..... | 87 |
| I.2.2-Charactérisation UV Visible..... | 88 |
| I.2.3-Charactérisation par émission..... | 89 |
| I.2.4-Charactérisation électrochimique..... | 90 |
| II-Application au développement de biocapteurs à glucose..... | 97 |
| II.1-Développement du biocapteur de référence à base de poly(pyrène-biotine) sans nanotubes de carbone | 97 |
| II.2-Charactérisation physico-chimique des différentes étapes de réalisation d'assemblages moléculaires à base de nanotubes de carbone et de pyrène-biotine..... | 98 |
| II.2.1-Assemblage en solution des pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone par interaction π | 100 |
| a-Contrôle électrochimique des dépôts de SWCNT-pyrène-biotine..... | 100 |
| b-Présentation de l'ancrage de pyrène-biotine sur les SWCNT par fluorescence et par microscopie électronique à balayage (MEB)..... | 101 |
| c-Charactérisation par spectroscopie Raman..... | 103 |
| d-Charactérisation par la technique de mouillabilité..... | 104 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| II.2.2-Assemblage des pyrène-biotine par interaction π sur une électrode recouverte de nanotubes de carbone..... | 106 |
| a-Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)..... | 107 |
| b-Caractérisation par spectroscopie Raman..... | 107 |
| c-Caractérisation par la technique de mouillabilité..... | 108 |
| II.2.3-Assemblage par électropolymérisation du pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone..... | 109 |
| a-Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)..... | 110 |
| b-Caractérisation par spectroscopie Raman..... | 110 |
| II.3-Réalisation de biocapteurs de glucose basés sur différentes techniques de fonctionnalisation du pyrène-biotine..... | 111 |
| II.3.1-Biocapteurs à base d'assemblage en solution des pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone par interaction π | 111 |
| a-Biocapteur à base de 2x20 μ L de SWCNT-pyrène-biotine..... | 111 |
| b-Influence de la quantité de SWCNT-pyrène-biotine immobilisée à la surface de l'électrode..... | 112 |
| c-Réalisation de structures tridimensionnelles à base de SWCNT-pyrène-biotine..... | 113 |
| II.3.2-Biocapteurs à base de pyrène-biotine adsorbés sur des dépôts de nanotubes de carbone..... | 116 |
| II.3.3-Biocapteurs à base de pyrène-biotine polymérisés sur des dépôts de nanotubes de carbone..... | 117 |
| II.3.4-Etude comparative des biocapteurs à glucose à base de pyrène-biotine et de nanotubes de carbone..... | 119 |
| III-Application au développement de biocapteurs à urée à base d'assemblage en solution des pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone par interaction π..... | 121 |
| Conclusion..... | 126 |
| Bibliographie..... | 127 |

Chapitre V

Application des nanotubes de carbone aux biocapteurs à glucose à base de pyrène-adamantane

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Introduction..... | 130 |
| I-Synthèse du pyrène-adamantane..... | 131 |
| II-Characterisation du pyrène adamantane..... | 132 |
| II.1-Characterisation par UV Visible..... | 132 |
| II.2-Characterisation électrochimique..... | 133 |
| III-Application au développement de biocapteurs à glucose..... | 136 |
| III.1-Biocapteur de référence basé sur un film de poly(pyrène-adamantane) sur Pt nue..... | 136 |
| III.2-Characterisation physico-chimique des différentes étapes de réalisation d'assemblages moléculaires à base de nanotubes de carbone et de pyrène-adamantane..... | 137 |
| III.2.1-Assemblage en solution des pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone par interaction π | 138 |
| a-Influence de la fonctionnalisation sur le comportement électrochimique des nanotubes de carbone..... | 138 |
| b-Characterisation de l'ancrage du pyrène-adamantane par MEB..... | 139 |
| c-Characterisation de l'ancrage du pyrène-adamantane par spectroscopie Raman..... | 140 |
| d-Characterisation par la technique de mouillabilité..... | 140 |
| III.2.2-Assemblage du pyrène-adamantane par interaction π sur une électrode recouverte de nanotubes de carbone..... | 142 |
| a-Characterisation par microscopie électronique à balayage (MEB)..... | 142 |
| b-Characterisation par spectroscopie Raman..... | 143 |
| c-Characterisation par la technique de mouillabilité..... | 143 |
| III.2.3-Assemblage par électro-polymérisation du pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone..... | 144 |
| a-Characterisation par microscopie électronique à balayage (MEB)..... | 144 |
| b-Characterisation par spectroscopie Raman..... | 145 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.3-Réalisation de biocapteurs de glucose basés sur différentes techniques de fonctionnalisation du pyrène-adamantane..... | 145 |
| III.3.1-Biocapteur à base d'assemblage en solution des pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone par interaction π | 145 |
| III.3.2-Biocapteur à base de pyrène-adamantane adsorbés sur des dépôts de nanotubes de carbone..... | 146 |
| III.3.3-Biocapteur à base de pyrène-adamantane polymérisés sur des dépôts de nanotubes de carbone..... | 147 |
| III.3.4-Etude comparative des biocapteurs à glucose à base de pyrène-adamantane et de nanotubes de carbone..... | 149 |
| Conclusion..... | 151 |
| Bibliographie..... | 152 |

| | |
|---------------------------------|------------|
| Conclusion générale..... | 153 |
|---------------------------------|------------|

Introduction générale

Introduction générale

Les nanotechnologies et l'avènement du nanomonde sont la nouvelle révolution de demain. Depuis les années 90, la manipulation de la matière à l'échelle nanométrique connaît un développement important et régulier. Les nanotubes de carbone ont provoqué une révolution dans le domaine de ce monde innovant. Ces nano-objets possèdent des propriétés électriques et mécaniques originales. Ainsi, ils ont provoqué un réel engouement dans de nombreux laboratoires de recherche puisqu'ils apportent une richesse incontestable dans de nombreux domaines tels que l'électronique, la chimie, la biochimie et l'électrochimie.

Eu égard à leur conductivité et à leur forte surface spécifique, les nanotubes de carbone constituent un matériau de choix pour le développement des biocapteurs. De vastes potentialités d'application des nanotubes comme matrices hôtes pour les biomolécules sont ainsi apparues et ont été renforcées par leur capacité à être fonctionnalisés chimiquement. Les nanotubes de carbone permettent donc la fixation de l'entité biologique à la surface de l'électrode avec un contrôle de la distribution spatiale sans perdre l'activité et la spécificité biologique contribuant ainsi à la formation d'édifices et de bioarchitectures conductrices.

Dans ce contexte, les travaux développés au cours de cette thèse qui implique nanotechnologie, électrochimie et biologie, se sont focalisés sur la combinaison des nanotubes de carbone monofeuillets avec des enzymes pour le développement de bioarchitectures à visées électroanalytiques.

Afin de mieux positionner le sujet de cette thèse, le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les nanotubes de carbone et les biocapteurs. Dans un premier temps, ce chapitre décrit brièvement la synthèse, les différents types de nanotubes de carbone, leur caractérisation physico-chimique ainsi que leur fonctionnalisation permettant leur utilisation dans différents domaines. Dans un deuxième temps, différentes stratégies d'immobilisation seront développées pour l'élaboration de biocapteurs. Enfin, nous décrirons les applications des nanotubes dans le domaine de la détection biomoléculaire.

Le deuxième chapitre présente notre technique de traitement des nanotubes de carbone permettant l'obtention de dépôts stables et homogènes, une étape clé dans l'élaboration des biocapteurs. Le contrôle des dépôts ainsi que leurs caractérisations physico-chimiques seront présentés.

Le troisième chapitre est dédié au concept de biofonctionnalisation d'un dépôt de nanotubes de carbone par polymérisation électrochimique puis ancrage de biomolécule par

Introduction générale

interactions affines. Ainsi les propriétés conductrices des nanotubes de carbone sont exploitées pour électrogénérer sur un dépôt de nanotubes un film polymère exhibant des propriétés affines. Dans notre cas, nous avons choisi le poly(pyrrole-biotine) qui présente des interactions affines avec l'avidine, une protéine.

La glucose oxydase choisie comme biomolécule modèle, a été ensuite immobilisée à la surface du polymère biotinylé via des interactions spécifiques avidine-biotine. Les performances du système "sandwich" SWCNT/polypyrrole-biotine/avidine/biotine-glucose oxydase pour le dosage ampérométrique du glucose ont été évaluées et une optimisation de la configuration de l'électrode a été entreprise.

Dans le quatrième chapitre, nous avons abordé un concept de biofonctionnalisation des dépôts de nanotubes totalement différent. Ce dernier consiste tout d'abord à fonctionnaliser par des systèmes affins via des liaisons covalentes, des nanotubes en solution. Le dépôt de ces nanotubes sur la surface de l'électrode est ensuite suivi d'une biofonctionnalisation par simple incubation avec une solution de biomolécule via la formation d'une liaison affine. Ce chapitre décrit donc la synthèse et la caractérisation spectroscopique et électrochimique d'un nouveau composé, le pyrène-biotine possédant un groupement pyrène ayant la capacité de s'accrocher sur les nanotubes de carbone par interaction π et un groupement biotine permettant l'ancrage d'enzymes biotinylées via un pont avidine. Différentes stratégies de réalisation de biocapteurs à glucose sont présentées afin d'optimiser l'architecture biomoléculaire permettant la détection optimale du glucose. Chaque étape d'ancrage a été caractérisée par spectroscopie Raman et mesure d'angle de contact.

Outre la réaction électro-enzymatique modèle basée sur la glucose oxydase, les potentialités d'application de cet assemblage ont été également testées avec l'enzyme uréase pour la détection de l'urée via des caractérisations électrochimiques capacitance-potentiel.

Quant au cinquième chapitre, il est consacré à la description d'un nouveau système d'ancrage de biomolécules sur les nanotubes de carbone basé sur la formation d'un complexe d'inclusion adamantane- β -cyclodextrine. Dans ce but, la synthèse d'un pyrène-adamatane permettant d'une part son accrochage sur les nanotubes de carbone par interaction π et d'autre part, la fixation d'une glucose oxydase- β -cyclodextrine par inclusion de l'adamantane dans la cavité de la β -cyclodextrine a été réalisée et ce système a été appliqué à la détection électro-enzymatique du glucose.

Chapitre I:

Les nanotubes de carbone et les biocapteurs

Chapitre I

Les nanotubes de carbone et les biocapteurs

I. Les nanotubes de carbone

I.1. Historique

Les nanotubes de carbone sont l'un des quatre états allotropes connus du carbone. Ce sont des tubes jusqu'à mille fois plus longs que larges, d'un diamètre de l'ordre du nanomètre. Ils ont de quelques microns à quelques dizaines de microns de longueur. Ces matériaux sont les premiers produits industriels issus de la nanotechnologie et ils sont souvent présentés comme le matériau miracle du XXI^{ème} siècle. En 2004, plus de deux milles articles scientifiques ont été publiés à leur propos [1], et aujourd'hui encore, il ne se passe guère de semaine sans que les revues scientifiques les plus prestigieuses n'ajoutent à cette liste une floraison remarquable pour un domaine aussi jeune.

Jusqu'en 1985, les seules formes cristallines connues du carbone étaient le graphite et le diamant. En 1985, R.E.Smalley et al [2] ont découvert une nouvelle forme de carbone, la molécule de fullerène C60 constituée de 60 atomes de carbone répartis sur les sommets d'un polyèdre régulier constitué de facettes hexagonales et pentagonales, ce qui leur valut le prix Nobel de chimie en 1996. L'histoire des nanotubes de carbone est réellement amorcée par la découverte du fullerène C60. En 1991, Iijima [3] met en évidence l'existence d'un nouvel état solide carboné en relation avec le fullerène, en observant des structures tubulaires par microscopie électronique dans des fibres de carbone qu'il nomme nanotubes de carbone, produits secondaires de la formation de fullerènes par la méthode à arc électrique. Iijima était la première personne à identifier les nanotubes de carbone comme une nouvelle forme

allotropique du carbone. Deux ans plus tard, les équipes d'Iijima [4] et de Bethune [5] publient successivement la découverte de l'existence des nanotubes de carbone mono-parois SWCNTs. Depuis, un intense effort de recherche a été entrepris pour améliorer notre connaissance des NTCs.

Mais des travaux antérieurs ont déjà publié des structures de nanotubes de carbone sans pour autant pouvoir les définir [6]. D'ailleurs, en 1952, Radushkevich et Lukyanovich ont publié dans un journal russe des images de nanotubes de carbone d'environ 50 nanomètres de diamètre [7].

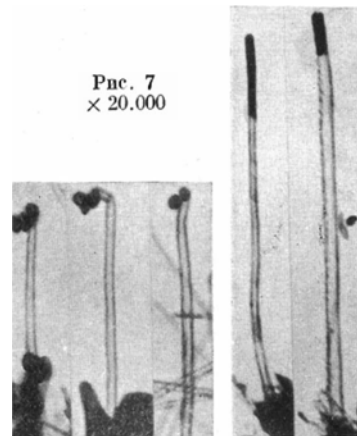


Figure I-1 : Images MET de nanotubes de carbone, publiées en 1952 [7].

Plus tard, en 1958, Hillert et Lange ont noté la formation de filaments graphitiques ayant une texture concentrique déterminée par diffraction d'électrons [8]. En 1976, un article d'Oberlin et Endo montre des fibres de carbone creuses de taille nanométrique obtenues par CVD (Chemical Vapor Deposition) [9]. Ils montrent aussi, par une image au microscope électronique à transmission (MET), un nanotube constitué d'un seul feuillet de graphène (Figure I-1).

En outre, en 1979, John Abrahamson décrit les nanotubes de carbone comme des fibres de carbone produites sur une anode de carbone après formation d'un arc électrique [10]. En 1982, un groupe de scientifiques soviétiques [11] publia des résultats de la caractérisation chimique et structurelle de nanoparticules de carbone produites par dismutation thermocatalytique de monoxyde de carbone. En utilisant des images MET et aux rayons X, les auteurs suggèrent que leurs cristaux tubulaires multi-couches de carbone ont été formés par enroulement de couches de graphène en cylindres.

I.2. Classification des nanotubes de carbone

Il existe deux types de nanotubes de carbone comme montré au **Schéma I-1**:

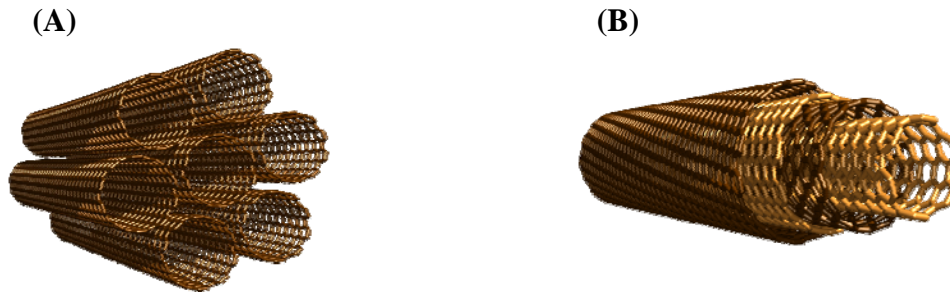


Schéma I-1 : Représentation schématique des deux classes de nanotube de carbone mono-feuillet (SWCNT) (A) et multi-feuillets (MWCNT) (B).

I.2.1. Les nanotubes de carbone mono-feuillets (Single Walled Carbon Nanotubes ; SWCNT) dont la structure peut être représentée par un feuillet de graphène enroulé sur lui-même et fermé à ses deux extrémités par une demi-sphère. Les atomes de carbone restent dans un état d'hybridation sp^2 . La façon dont le feuillet de graphène est enroulé sur lui-même définit un paramètre appelé hélicité qui fixe la structure du nanotube [12].

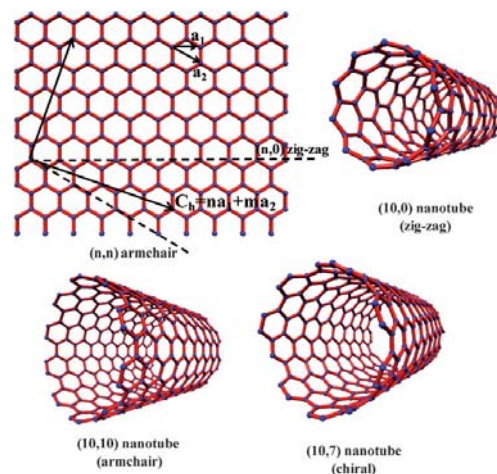


Schéma I-2 : Structure de type « nid d'abeille » du graphène et exemples de nanotubes selon les valeurs de n et m [13].

La structure de type « nid d'abeille » du graphène (**Schéma I-2**) est représentée par deux vecteurs directeurs a_1 et a_2 du système cristallin qui définissent le vecteur de chiralité C_h , axe selon lequel le graphène est enroulé pour former le nanotube [12-14].

Ce vecteur peut être décomposé en deux scalaires, m et n , tel que :

$$C_h = n a_1 + m a_2$$

Selon les valeurs de m et n , on définit trois types de nanotubes :

- Si $m=0$, on dira que le nanotube a une structure de type *zig-zag*
- Si $m=n$, on dira que le nanotube a une structure de type *fauteuil* ou *armchair*
- Dans les autres cas, on dira que le nanotube est *chiral*

I.2.2. Les nanotubes de carbone multi-feuillets (Multi Walled Carbon Nanotubes ; MWCNT) qui sont constitués de plusieurs feuillets de graphène enroulés les uns autour des autres. Ils se présentent comme des tubes creux concentriques avec un diamètre interne de l'ordre du nanomètre et une longueur de l'ordre de quelques micromètres [15].

Il existe deux modèles pour décrire la structure des nanotubes multifeuillets :

- Le modèle « *poupée russe* » : les plans de graphène sont arrangés en cylindres concentriques par emboîtement.
- Le modèle « *parchemin* » : un seul feuillet de graphène est enroulé en spirale sur lui-même.

I.3. Synthèse des nanotubes de carbone

La production mondiale de nanotubes de carbone atteint aujourd'hui plusieurs centaines de tonnes par an. Il existe plusieurs méthodes de synthèse [16].

On peut citer deux grandes familles de synthèse des nanotubes :

- Les synthèses à haute température qui peuvent être soit par ablation par arc électrique : cela consiste à établir un arc électrique entre deux électrodes de graphite. L'anode se transforme alors en plasma à une température d'environ 6000°C qui se condense sur la cathode en un dépôt contenant des nanotubes de carbone [17, 18], soit par ablation dans un four solaire, qui consiste à concentrer l'énergie solaire sur le graphite pour atteindre la température de vaporisation [21, 22], soit par ablation laser [19, 20] qui consiste à ablater une cible de graphite avec un rayonnement laser de forte énergie ce qui entraîne une évaporation puissante qui entraîne une expulsion des fragments de graphite et d'atomes de carbone [23, 24].

- Les synthèses à moyenne température ou CVD (*Chemical Vapour Deposition*) dites dépôt en phase vapeur se servant de particules métalliques comme catalyseurs [25, 26]. Ce procédé nécessite une source liquide ou gazeuse de carbone à laquelle on ajoute un

précurseur métallique. Le mélange est transformé en fines gouttelettes, puis transporté par un gaz inerte à un four où se forment les nanotubes de carbone, sur des plaques de verre ou de silicium, à une température comprise entre 750°C et 900°C.

Le procédé de synthèse HiPCO fait partie de cette famille des procédés de décomposition catalytique à moyenne température. Ce procédé de fabrication est à flux continu, ce qui est très positif pour une industrialisation. D'ailleurs, la société *Carbon Nanotech Inc* (CNI) propose des nanotubes synthétisés selon cette technique, qu'elle a brevetée et, de fait, elle est la seule à commercialiser ce type de nanotubes. Ce procédé HiPCO (*High Pressure dismutation of CO* : décomposition sous haute pression de CO), a été développé à la Rice University par le groupe de R. Smalley [27]. Un flux continu de pentacarbonyle de fer ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) et de monoxyde de carbone (CO) est introduit sous une pression de 10 atmosphères dans une enceinte chauffée à 1200°C (Schéma I-3). L'originalité du procédé tient au fait que le catalyseur, nécessaire à la croissance des tubes monofeuillets, est formé in situ par la décomposition du gaz précurseur. Le monoxyde de carbone utilisé comme source de carbone pour la croissance des tubes ne se pyrolyse pas à 1200°C, ce qui permet d'obtenir des nanotubes de carbone monofeuillets exempts de toute impureté graphitique. Les nanotubes formés par cette technique présentent une large distribution de diamètres dont des nanotubes très petits, mais contiennent beaucoup de catalyseur résiduel. En effet, le catalyseur ayant servi à la synthèse est retrouvé sous forme de nanoparticules sur la surface des fagots et représente environ 50% de la masse des nanotubes formés. La société CNI propose également des nanotubes HiPCO purifiés, où une partie du catalyseur résiduel a été enlevée par un traitement chimique. Dans ce cas, le catalyseur ne représente que 10 à 20% de la masse des nanotubes.

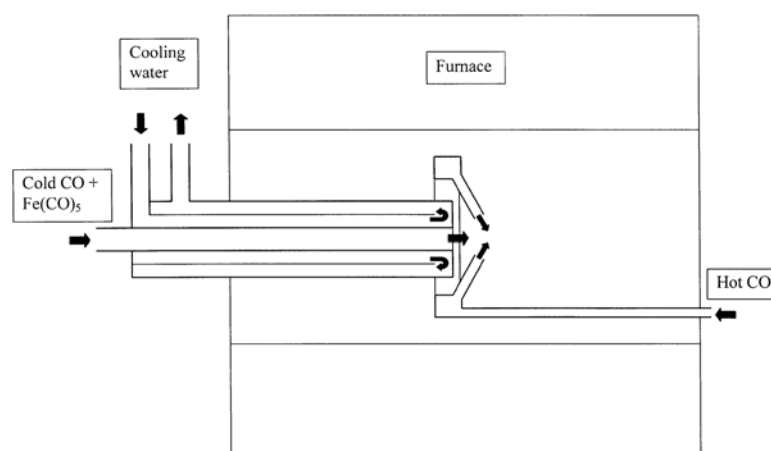


Schéma I-3 : Réacteur pour la production de nanotubes de carbone selon le procédé HiPCo [27].

I.4. Propriétés et applications

Les nanotubes de carbone suscitent un énorme intérêt dans le monde de la recherche, autant fondamentale qu'appliquée, car leurs propriétés sont exceptionnelles à bien des égards [28]. Leurs propriétés électriques, mécaniques et thermiques laissent entrevoir de nombreuses applications dans plusieurs domaines.

D'un point de vue électrique, les nanotubes mono-feuillets ont la particularité exceptionnelle de pouvoir être soit conducteurs comme un métal, soit semi-conducteurs en fonction de leur géométrie (diamètre du tube et angle d'enroulement de la feuille de graphène) [29, 30]. Des connexions entre tubes conducteurs et semi-conducteurs ont été réalisées, permettant de créer des nano-diodes, élément de base des nano-puces [31]. Les nanotubes de carbone sont également à l'origine d'une révolution dans le développement des transistors à effet de champ [32-34]; il a été ainsi récemment montré que des transistors ambipolaires pouvaient être préparés [35]. La structure de bande électronique caractéristique d'un NTC peut être déterminée en première approximation dans le modèle des liaisons fortes, sur la seule considération de la bande π et en négligeant les effets d'hybridation dus à la courbure de la structure du tube. En raison de ces propriétés, les nanotubes de carbone ont été utilisés pour modifier les pointes en microscopie de force atomique [36, 37]. Soumis à un champ électrique, les nanotubes de carbone vont présenter un très fort effet de pointe (principe du paratonnerre) à cause du grand rapport entre leur diamètre et leur longueur. Avec des tensions relativement faibles, on peut générer à leur extrémité des champs électriques importants, capables d'arracher les électrons de la matière et de les émettre vers l'extérieur. Cette émission est localisée à l'extrémité du tube et peut donc servir à envoyer des électrons à un endroit bien précis, un petit élément de matériau phosphorescent qui constituera ainsi le pixel d'un écran plat par exemple. Le matériau phosphorescent évacue l'énergie reçue sous forme de lumière avec le même principe que les écrans de tubes cathodiques. L'exploitation de cette propriété a déjà permis de réaliser des prototypes d'écrans plats à nanotubes [38].

Les modèles théoriques prévoient une conductivité thermique exceptionnellement élevée pour les nanotubes de carbone monoparois associée à une puissance thermoélectrique [39, 40]. Ils ont pour cela été utilisés pour améliorer la conductivité thermique de certaines céramiques [41].

Les nanotubes de carbone se distinguent aussi par leurs propriétés mécaniques [42]. Les nanotubes de carbone sont réputés pour leur résistance [43]. La stabilité élevée de la double liaison C=C au sein du système polyaromatique du graphène assure aux nanotubes de

carbone une rigidité exceptionnelle traduite par un module de Young particulièrement élevé. De plus, les NTC possèdent une grande flexibilité [44, 45] qui se caractérise par leur tolérance à des taux de déformation en traction élevés et des torsions sans rupture. Ce comportement de déformations élastiques non-linéaires semble être principalement dû au réarrangement réversible des atomes sous contrainte, par réhybridation sp^2 - sp^3 , ce qui ouvre la voie à l'utilisation des nanotubes de carbone dans tous les domaines de la vie courante pour remplacer la fibre de carbone.

Outre les avantages précédemment cités, le succès des nanotubes réside aussi dans leur remarquable surface spécifique, qui est estimée théoriquement à $1315 \text{ m}^2/\text{g}$ [46]. Cette propriété les rend particulièrement prometteurs pour la fabrication de biocapteurs et la conception de bio-structures tridimensionnelles [47, 48].

I.5. Fonctionnalisation

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone est devenue un domaine de recherche important et spécialement attractif au cours de la dernière décennie afin, d'une part d'améliorer leur solubilité en milieux aqueux et dans les solvants organiques [49-51], d'autre part de les doter de fonctions chimiques qui élargissent leurs domaines d'utilisation [52].

Les nombreux défauts présents aux extrémités des tubes et sur leurs parois (Schéma I-4) facilitent la fonctionnalisation des nanotubes. Ces défauts peuvent se présenter sous forme de :

- vides atomiques : atomes manquants dans la structure du graphène.
- défauts de Stone Wales : au lieu de former des hexagones, les atomes de carbone se réarrangent en pentagones ou en heptagones.

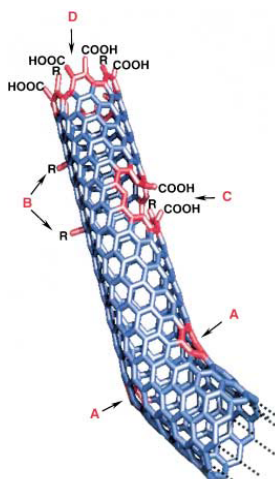


Schéma I-4 : Les défauts aux extrémités et à la paroi des nanotubes.

L'atome de carbone devient en état d'hybridation sp^3 et la quatrième liaison porte généralement un atome d'hydrogène ou une fonction hydroxyle (-OH). En raison de la courbure de la paroi, les liaisons C-C adoptent une hybridation mixte sp^2 - sp^3 . En conséquence, la réactivité chimique de la surface d'un NTC devient plus importante que celle d'un plan de graphène, au niveau de sa paroi et, plus particulièrement, de ses extrémités et de ses défauts. Il est possible de créer des défauts supplémentaires pour encore mieux faciliter la fonctionnalisation. Le nanotube est dans ce cas endommagé par un traitement oxydant, qui conduit à des trous dans sa paroi. Les atomes de carbone environnants sont généralement porteurs d'une fonction carboxylique (-COOH) susceptible d'être impliquée dans des réactions d'estérification ou d'amidation. Chen et al ont décrit en 1998 le premier greffage chimique de groupes fonctionnels organiques sur des SWCNTs via la formation d'amides entre les groupements acides carboxyliques de nanotubes oxydés et les amines. Cette réaction a permis d'obtenir des dérivées de nanotubes solubles dans des solvants organiques [53].

La fonctionnalisation des nanotubes en utilisant des produits chimiques agressifs par traitement avec des acides à haute température, introduit des défauts structuraux et induit une modification de leurs propriétés [54]. Les tubes sont légèrement raccourcis par ce type de traitement [55]. Haddon et al. ont présenté une étude sur les propriétés électroniques des films de nanotubes avant et après fonctionnalisation [56].

On peut, néanmoins, classer la fonctionnalisation des nanotubes de carbone en trois grandes catégories comme montré au **Schéma I-5** :

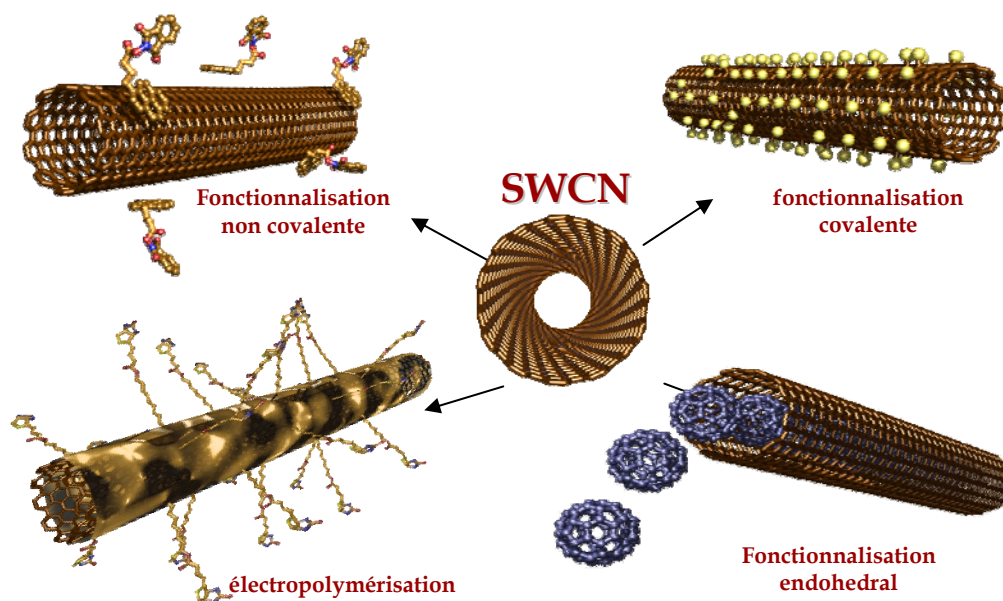


Schéma I-5 : Différents modes de fonctionnalisation des nanotubes de carbone.

I.5.1. Fonctionnalisation covalente

Il est possible de greffer de manière covalente des entités chimiques à la surface des nanotubes en utilisant des espèces très réactives comme des radicaux [57, 58], des carbènes [59], des nitrènes [60, 61], des ylures d'azométhine [62], des alkyls de lithium [63], de fluor [64] et des sels de diazonium [65]. Cependant, ce type de fonctionnalisation peut modifier les propriétés électroniques des nanotubes, par exemple dans le cas du carbène, par transfert de charge de la molécule vers le nanotube. La fonctionnalisation covalente des nanotubes entraîne donc une perturbation relativement importante du réseau de graphène, se traduisant par une disparition des bandes d'absorption liées aux singularités de Van Hove.

Chen et al ont proposé en 2005 une procédure originale de création de groupements alkyls et carboxyliques à la surface de nanotubes de carbone SWCNTs afin de permettre la fixation ultérieure de groupements fonctionnels [66] (Figure I-6). Dans ce cas, les nanotubes peuvent être alkylés et carboxylés par un traitement dans du sec-butyllithium et en faisant réagir les carbanions avec du dioxyde de carbone dans le THF sous agitation dans des conditions anhydres et en absence d'oxygène. L'acidification des nanotubes de carbone carboxylés est effectuée en utilisant un excès d'acide chlorhydrique.

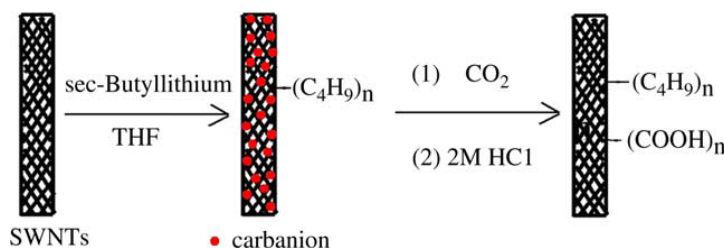


Schéma I-6 : Procédure de fonctionnalisation covalente des SWCNTs selon Chen et al [66].

Une autre méthode de fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone a été proposée par Chattopadhyay *et al.* en 2005 afin d'améliorer leur solubilité [67]. Cette fonctionnalisation est basée sur le traitement des SWCNTs avec du lithium dans l'ammoniaque. Ces nanotubes peuvent être ensuite fonctionnalisés par des groupements aryles en les faisant réagir avec l'iodate d'aryle.

I.5.2. Fonctionnalisation non-covalente

La fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone fait souvent appel à des espèces fortement réactives telles que des oxydants ou des réducteurs. C'est pourquoi une chimie de greffage de nanotubes basée sur des interactions non covalentes s'est fortement développée ces dernières années, soit par adsorption de tensioactifs, par enroulement de polymères, soit par adsorption de composés par interaction π .

Des interactions non-covalentes très fortes existent entre les nanotubes et les anilines [68], les amines [69], et les pyrènes [70, 71], augmentant ainsi la solubilité des nanotubes dans les solvants organiques. Ceci peut s'expliquer par la formation de complexes de type donneur-accepteur. Cette fonctionnalisation douce des nanotubes de carbone par formation de liaisons non-covalentes permet de physisorber diverses entités chimiques à la surface des nanotubes sans pour autant changer leurs propriétés.

Les molécules amphiphiles, les tensioactifs, comme le sodium dodécylsulfate (SDS) ou le Triton-X 100 (Schéma I-7), se lient aux nanotubes par interactions Van der Waals [72]. Le nanotube de carbone se retrouve alors à l'intérieur d'une micelle, ce qui permet de le disperser dans une phase aqueuse. Une interaction plus forte se crée entre le nanotube et le tensioactif lorsque la partie hydrophobe de la molécule amphiphile contient un groupe aromatique, en raison des interactions de type π -stacking qui se forment avec les parois du nanotube.

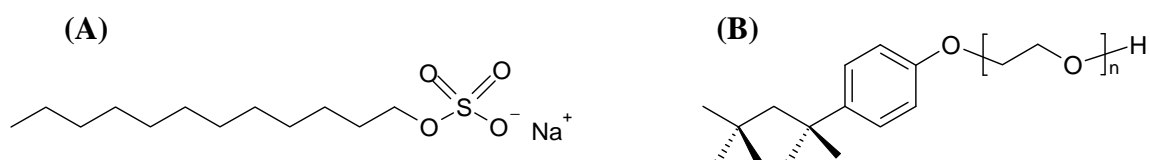


Schéma I-7 : Structure chimique du sodium dodécylsulfate (A) et Triton X (B).

Plusieurs travaux de recherche se sont focalisés sur la fonctionnalisation des nanotubes de carbone par des polymères conducteurs et sur l'étude des caractéristiques physiques et chimiques de ce nouveau composite qui présente un potentiel important pour des applications technologiques dans le domaine des transistors, des diodes, de l'optoélectronique...

Baibarac *et al.* ont proposé une fonctionnalisation des nanotubes de carbone mono-feuillets (SWCNTs) par électropolymérisation de l'aniline dans HCl [73]. Un traitement chimique par NH_4OH conduit à une réaction rédox interne entre le polyaniline et les

nanotubes de carbone, entraînant une transition de la chaîne polymère de l'état semi-oxydé à un état réduit.

Sahoo *et al.* ont reporté une fonctionnalisation des nanotubes de carbone par le polypyrrole par une polymérisation chimique in situ en utilisant le chlorure de fer $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ comme oxydant [74]. En premier lieu, les nanotubes de carbone MWCNT sont traités par un mélange d'acides concentrés $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (3:1) à 90°C pendant 10 minutes. La fonctionnalisation des nanotubes est effectuée par sonication dans un mélange de méthanol et d'acétonitrile contenant du pyrrole et du $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Le rapport de $\text{Fe}^{3+}/\text{pyrrole}$ est de 2,3. Les analyses FT-IR ont montré l'existence d'une interaction entre les groupements COOH des nanotubes et les groupements NH du polypyrrole, comme montré au **Schéma I-8**.

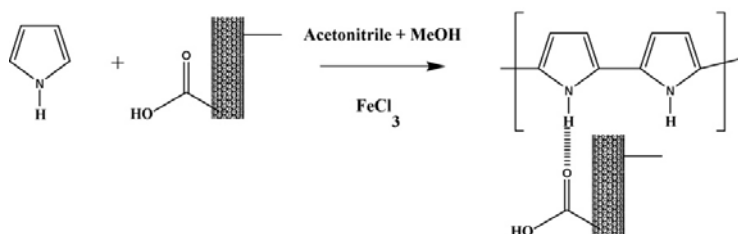


Schéma I-8 : Interaction entre le polypyrrole et le MWCNT-COOH selon Sahoo *et al.* [74].

Salipira *et al.* ont présenté une fonctionnalisation des nanotubes de carbone par un polymère de cyclodextrine pour la détection des polluants dans l'eau [75]. La fonctionnalisation est effectuée en mélangeant la β -cyclodextrine et l'hexaméthylène diisocyanate et en chauffant à 70°C . La fonctionnalisation des nanotubes de carbone par la β -cyclodextrine montre une capacité remarquable à absorber du *p*-nitrophénol et du trichloroéthylène.

Il est aussi possible de former des complexes supramoléculaires en enroulant des polymères autour des nanotubes [76]. Ainsi, la fonctionnalisation de tubes monofeuillets avec le poly(métaphénylènevinylène) (PmPV) conduit à une amélioration par huit de la conductivité du composite par rapport au polymère seul, sans diminution de ses propriétés de luminescence [77]. L'attachement des SWCNTs à des polymères contenant des chaînes polaires, tels que le polyvinyl pyrrolidone (PVP) ou le polystyrène sulfonate (PSS), conduit à des solutions stables dans l'eau du complexe SWCNT/polymère [78].

L'équipe de Iijima rapporte l'utilisation de suspension aqueuse de NTC stabilisée par des nanoparticules chargées [79]. Cette approche est également employée par l'équipe de Roth qui utilise des molécules de dodécylsulfate de sodium (SDS), adsorbées à la surface des

NTC pour interagir électrostatiquement avec des groupements ammonium accrochés à la surface d'un substrat [80].

I.5.3. Fonctionnalisation endohédrale

La cavité interne des nanotubes de carbone offre un espace hôte pour la déposition de systèmes cibles. Par exemple, des nanoparticules d'or et de platine sont insérées par capillarité dans les tubes en traitant les SWCNTs avec de l'acide chlorhydrique [81]. L'incorporation de fullerènes tel que le C60 [82], ou de métallofullerènes tel que le SmC82 [83], sont aussi des exemples impressionnants dans la chimie interne des nanotubes de carbone.

II. Les biocapteurs

II.1. Généralités

La construction de biocapteurs nécessitent une combinaison de plusieurs technologies à savoir la biologie moléculaire, la microélectronique, la physique, la chimie... Ils associent un élément de reconnaissance moléculaire, ou biorécepteur, qui est le premier maillon du biocapteur et qui est constitué par un matériau biologique (enzymes, anticorps, antigènes, cellules, ADN...) chargé de reconnaître l'espèce à analyser, et une composante physique, le transducteur, qui convertit les interactions et les reconnaissances physico-chimiques entre le bio-récepteur et la substance à analyser (**Schéma I-9**) en un signal électrique [84], optique [85], conductimétrique [86], spectrophotométrique [87], calorimétrique [88], piézoélectrique [89].

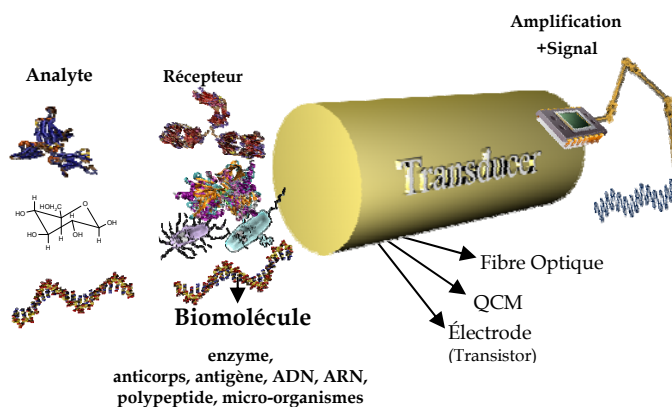


Schéma I-9 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Depuis les années 70, une centaine d'enzymes sont utilisées pour fabriquer des biocapteurs enzymatiques [90]. Ces biocapteurs ont connu un essor considérable avec un accroissement de leurs champs d'application dans différents domaines tel que l'environnement [91, 92], le diagnostic alimentaire [93], la santé [94, 95], le diagnostic clinique [96, 97], les études toxicologiques et les applications pour l'armée et contre le bioterrorisme [98].

Pour un capteur enzymatique, le substrat va migrer vers l'intérieur de la couche enzymatique et sera décomposé en produit de réaction dès qu'il entrera en contact avec l'enzyme immobilisée. Pour assurer une réponse rapide du biocapteur, la membrane retenant les enzymes ne doit pas créer de contraintes stériques. Les différentes étapes mises en jeu au cours du fonctionnement du capteur enzymatique sont :

- Le transport du substrat de la solution vers la couche enzymatique;
- La diffusion du substrat dans la couche enzymatique accompagnée de la transformation enzymatique du substrat en produit de réaction;
- La migration des produits vers le transducteur;
- la conversion du produit à l'interface en signal exploitable.

Les capteurs ampérométriques enzymatiques combinent la spécificité de l'enzyme pour le substrat avec les avantages de la détection sélective ampérométrique. Dans ce cas, il est absolument nécessaire que l'enzyme immobilisée consomme ou produise une espèce électroactive au cours de la réaction enzymatique. Une différence de potentiel est appliquée entre le biocapteur et une électrode de référence afin d'oxyder ou de déduire électrochimiquement l'espèce électroactive. L'intensité du courant enregistré entre le biocapteur et l'électrode auxiliaire est ainsi directement dépendante de la concentration d'un substrat cible qui est consommé dans l'épaisseur de la couche enzymatique. Une nécessité fondamentale pour le développement de ces bioélectrodes ampérométriques est de pouvoir conserver l'activité enzymatique immobilisée et de réduire au maximum les phénomènes de diffusion des substrats et des produits à travers le support considéré.

II.2. Différentes stratégies d'immobilisation

Un des grands défis rencontrés dans le développement des biocapteurs est la stratégie d'immobilisation de l'entité bio-spécifique sur la surface du capteur, car cette dernière ne doit pas dénaturer l'élément biologique. La procédure d'immobilisation ne doit donc pas altérer les propriétés biologiques de la macromolécule immobilisée, en particulier elle doit assurer une

bonne accessibilité aux sites catalytiques ou de reconnaissance. Ceci peut être envisagé via une orientation spatiale de la biomolécule facilitant ainsi son interaction avec la cible. De plus, le dépôt doit conduire à une haute densité des biomolécules à la surface du transducteur afin d'obtenir une sensibilité élevée. Il apparaît donc que la stabilité et la reproductibilité de l'immobilisation de la macromolécule biologique à la surface du transducteur avec rétention de ses activités biologiques reste une étape cruciale.

Les principales méthodes conventionnelles utilisées connues pour l'immobilisation des macromolécules biologiques (**Schéma I-10**) sont :

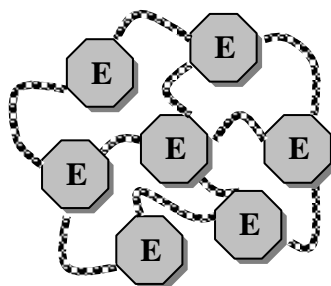
- L'adsorption physique [99] : L'adhésion de l'entité biologique à la surface du transducteur est basée sur des interactions électrostatiques, hydrophobes, Van-der-Waals ou des liaisons hydrogènes. En revanche, les inconvénients de cette méthode d'immobilisation sont liés au changement de conformation de la biomolécule et à sa dénaturation.
- La réticulation chimique ou électropolymérisation [100] : La réticulation des biomolécules à la surface d'un support solide ou à d'autres biomolécules par l'utilisation d'un agent de réticulation augmente la stabilité du biocapteur. Parmi ces agents, le glutaraldéhyde est le plus souvent utilisé sous sa forme liquide ou vapeur. Cette méthode de couplage est basée sur la réaction des groupements fonctionnels de l'agent réticulant avec les groupements amines des enzymes pour former des pontages covalents "enzyme-enzyme". Ce couplage aboutit à des biocapteurs stables, mais les biomolécules immobilisées perdent une partie de leur activité du fait de la rigidification de la structure tridimensionnelle.
- L'inclusion physique [101-103] : Cette technique consiste à incorporer la biomolécule dans des matrices de type polymères organiques, sol-gels, pâte de carbone, matériaux inorganiques (argile). La biomolécule se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques ou inorganiques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de la biomolécule grâce à une porosité suffisante du gel. Cette technique est cependant limitée par la taille des pores du gel entraînant le relargage des biomolécules de faible poids moléculaire.
- Le greffage covalent [104, 105] : Cette méthode d'immobilisation conduit à des liaisons fortes entre la biomolécule et la surface du transducteur et elle nécessite la présence de groupements fonctionnels sur la surface du transducteur. Ces groupements sont en général de type carboxylique (-COOH), amine (-NH₂), hydroxyle (-OH) ou thiol

(-SH) permettant l'accrochage de groupements fonctionnels de la biomolécule n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire. Cette technique permet l'obtention de liaisons stables et des contraintes diffusionnelles limitées.

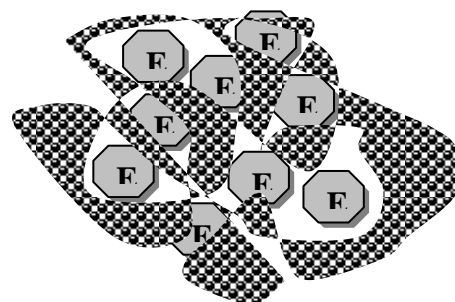
- Langmuir Blodgett [106] : Cette technique consiste à emprisonner des molécules d'enzymes entre deux monocouches de composés amphiphiles (tensio-actifs) grâce à la force électrostatique. Ces films ordonnés créent une matrice inerte dans laquelle l'enzyme peut être immobilisée.



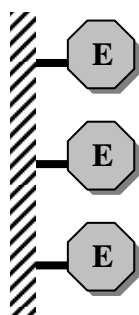
Adsorption physique



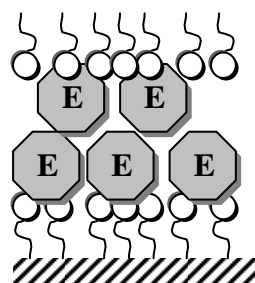
Réticulation



Inclusion physique



Greffage covalent



Langmuir-Blodgett

Schéma I-10 : *Différentes méthodes d'immobilisation d'une enzyme.*

Ces dernières années, l'immobilisation de biomolécules via des interactions affines est devenue une alternative prometteuse, car l'espèce biologique peut être attachée aux surfaces solides sur un site prédéterminé en réduisant au minimum les interférences. En particulier, l'électrogénération de films polymères, portant des partenaires affins, permet d'une part un contrôle aisé de la croissance de la couche polymère et d'autre part un contrôle spatial de la

biomembrane. De plus, l'électropolymérisation peut être réalisée en milieu organique puisque l'ancrage de la biomolécule intervient après.

Les premières tentatives pour obtenir une structure de reconnaissance tridimensionnelle (3D), afin d'améliorer la sensibilité du capteur en augmentant la densité de récepteurs biologiques immobilisés, ont été réalisées au Département de Chimie Moléculaire (DCM, UJF Grenoble) pour la fabrication de capteurs enzymatiques [107]. Dans ce contexte, je présenterai brièvement les trois systèmes d'affinité les plus utilisés, à savoir l'affinité entre l'avidine et la biotine, l'affinité entre l'adamantane et la β -cyclodextrine et l'affinité entre l'histidine et le NTA (l'acide nitrotriacétique).

II.2.1. Interactions avidine-biotine

L'avidine est une glycoprotéine de masse molaire 66 KDa extraite du blanc d'œuf, purifiée et caractérisée par Green en 1963 [108, 109]. La particularité de l'avidine réside dans le fait qu'elle possède une affinité très grande ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) pour la biotine (vitamine B8) [110]. Cette affinité a longtemps laissé penser qu'il se formait au niveau du site actif une liaison covalente entre la protéine et son substrat. En réalité, la biotine est complexée à l'intérieur du site récepteur de l'avidine (Schéma I-11). La stabilité du complexe ainsi formé résulte d'interactions hydrophobes et hydrophiles entre les acides aminés du site de complexation de l'avidine et la biotine. Les travaux de Livnah *et al.* [111] décrivent les interactions entre les résidus composant le site de fixation de la biotine et l'avidine.

Différents travaux basés sur des films électropolymérisés ont exploité ce système d'interactions pour immobiliser des biomolécules. Ainsi, l'avidine a été piégée dans des films et greffée chimiquement à leur surface. Toutefois, l'approche la plus répandue reste la fonctionnalisation d'un monomère par la biotine et son électropolymérisation. En effet, l'électrogénération de films polymères biotinylés permet l'attachement avec succès de l'avidine sur des sondes biotinylés. L'avantage de l'ancrage par interactions affines est l'absence de réactifs chimiques pouvant désactiver les biomolécules. De plus, cette approche d'immobilisation est basée sur la formation d'un seul point d'ancrage ce qui préserve l'accessibilité à la biomolécule immobilisée voire son activité. Les premiers exemples de films biotinylés ont été décrits pour la polymérisation de dérivés biotinylés fonctionnalisés par des pyrroles [112, 113]. Ces films ont été principalement utilisés pour la conception de puces à ADN, d'immunocapteurs et de capteurs de protéines. Contrairement au procédé de couplage

covalent, cette procédure permet l'élaboration de multi-couches enzymatiques sur des surfaces de polymère [114, 115]. Dans le but de conférer des propriétés spécifiques aux polymères biotinylés (hydrophilicité, chiralité, conductivité rédox, photosensibilité), différents monomères biotinylés ont été synthétisés tels que le complexe tris(bipyridyl) Fer(II) contenant six groupes biotines pré-orientés, le carbazole chiral biotinylé ou le complexe tris bipyridine-pyrrole ruthenium (II) biotinylé [116, 117]. Toutefois, le point faible de cette stratégie d'immobilisation basée sur l'interaction avidine-biotine réside dans la présence d'une couche intermédiaire d'avidine. Cette dernière atténue la sensibilité de l'électrode aux phénomènes intervenant à l'interface (hybridation, immuno-réaction,...), voire elle masque partiellement la surface pour la détection électrochimique des produits d'une réaction enzymatique.

Comme alternative à cette approche, un nouveau système d'affinité basé sur des films électropolymérisés impliquant le concept de formation d'interactions supramoléculaires entre l'adamantane et la β -cyclodextrine a été récemment utilisé.

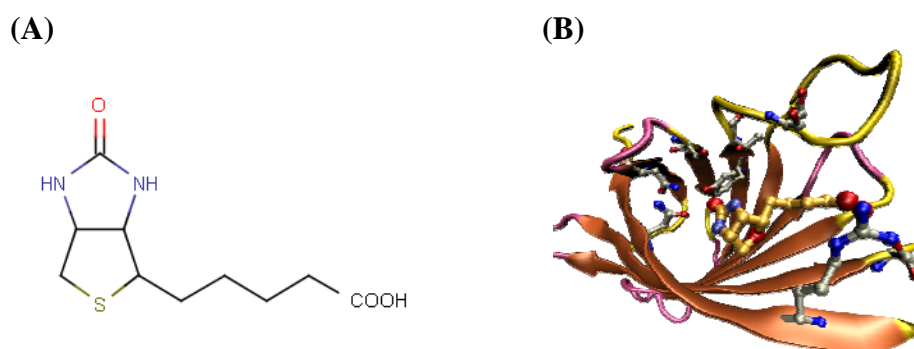


Schéma I-11 : Structure chimique de la biotine (vitamine B₈) (A) et Complexe avidine-biotine (B).

II.2.2. Interactions adamantane- β cyclodextrine

Les cyclodextrines sont des molécules cages d'origine naturelle qui permettent d'encapsuler diverses molécules. Ces produits naturels résultant de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*, ont été découverts en 1891 par Villiers [118]. Parmi les cyclodextrines les plus utilisées, la β -cyclodextrine possède une structure en cône tronqué délimitant une cavité dont l'intérieur présente un environnement carboné apolaire et hydrophobe (squelette carboné et oxygène en liaison éther), capable d'accueillir des molécules peu hydrosolubles voire non polaires, tandis que l'extérieur du tore présente de nombreux

groupements hydroxyles. Tous les groupes polaires hydroxyles localisés à l'extérieur délimitent la cavité hydrophobe.

Le système affiné adamantane/ β -cyclodextrine présenté au **Schéma I-12** est particulièrement prometteur pour l'immobilisation de biomolécules. Cette association se fait par inclusion par interaction hydrophobe de l'adamantane dans la cavité de la β -cyclodextrine [119-122]. L'interaction entre ces deux partenaires étant moins forte ($K_a = 10^5 \text{ M}^{-1}$) [123] que celle du système biotine avidine ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$), une réversibilité de l'immobilisation des biomolécules peut être envisagée. De plus, une perspective attrayante dans l'utilisation de ce système d'affinité réside dans l'absence de la couche intermédiaire d'avidine et, par conséquent, la suppression de l'effet néfaste de cette dernière sur la performance des biocapteurs. La version polymère de ce système d'affinité basé sur les interactions invité-hôte entre l'adamantane et la β -cyclodextrine, a été exploitée en électropolymérisant le pyrrole-adamantane [124]. Ce principe a été appliqué avec succès à l'attachement direct de la glucose oxydase modifiée par la β -cyclodextrine ou à l'attachement indirect de la glucose oxydase-adamantane via l'ancrage de nanoparticules d'or modifiées par la β -cyclodextrine.

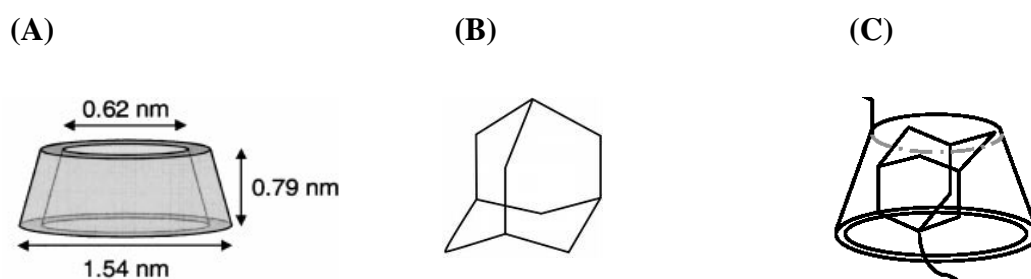


Schéma I-12 : Représentation schématique de la β -cyclodextrine (A), de l'adamantane (B) et du complexe β -cyclodextrine adamantane (C).

II.2.3. Interactions histidine-acide nitrilotriacétique

Un autre système d'affinité utilisant des films polymères et l'acide nitrilotriacétique (NTA) a été proposé [125, 126]. La stratégie d'immobilisation est basée sur la chélation de cations métalliques tels que Cu^{2+} ou Ni^{2+} par des polymères contenant des groupements NTA, suivie par la fixation de protéines marquées à l'histidine axialement, deux histidines se coordonnent sur le complexe précédemment formé (**Schéma I-13**).

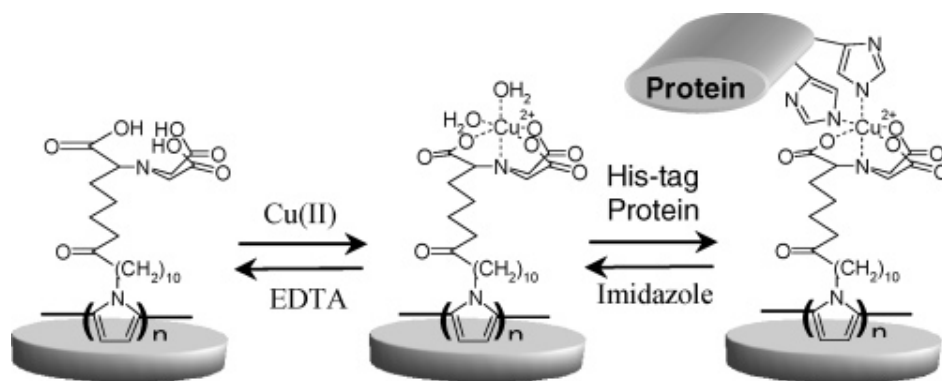
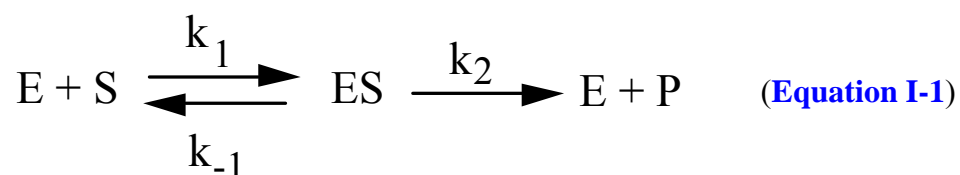


Schéma I-13 : Réalisation de biocapteur en utilisant l'affinité entre histidine-NTA selon Haddour et al. [125].

II.3. Mécanismes réactionnels

Au cours de la réaction enzymatique, le substrat (S) diffuse vers le site actif en se liant à l'enzyme (E) pour former le complexe enzyme-substrat (ES). Cette liaison chimique possède une durée de vie bien déterminée et donne rapidement naissance à un produit (P).

Cette modélisation de l'aspect cinétique enzymatique dérive de la théorie de Michaelis et Menten développée en 1913 [127] qui tient compte du passage par un complexe enzyme-substrat dit *complexe de Michaelis* au cours de la réaction catalytique (Equation I-1).



E, S, ES et P sont respectivement l'enzyme, son substrat, le complexe intermédiaire et le produit de la réaction enzymatique.

D'après l'Equation I-1, la vitesse de la réaction enzymatique est égale à la vitesse de disparition du substrat mais aussi à la vitesse d'apparition du produit P :

$$V = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad (\text{Equation I-2})$$

Avec :

$$- \frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] \quad (\text{Equation I-3})$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (\text{Equation I-4})$$

On peut alors écrire :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad (\text{Equation I-5})$$

Où k_1 et k_{-1} , les constantes cinétiques directe et inverse, K_M , constante de Michaelis dépendent de la nature de l'enzyme et correspondent à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre une vitesse réactionnelle égale à la moitié de la vitesse maximale V_m . La détermination de K_M permet d'avoir une idée sur la constante de dissociation du complexe enzyme/substrat ES. K_M représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Si $[E_T]$ est la concentration totale de l'enzyme, alors la concentration en enzyme libre dans la solution est donnée par l'équation :

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad (\text{Equation I-6})$$

En combinant [Equation I-5](#) et [Equation I-6](#), on obtient :

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equation I-7})$$

En introduisant [Equation I-7](#) dans [Equation I-4](#), la vitesse de la réaction s'écrit :

$$V = k_2 \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equation I-8})$$

En supposant que la vitesse de la réaction est maximale quand tous les sites catalytiques sont saturés, on peut écrire :

$$[E_T] = [ES] \quad (\text{Equation I-9})$$

Donc :

$$V_m = k_2 [E_T] \quad (\text{Equation I-10})$$

La combinaison **Equation I-8** et **Equation I-10** nous conduit à l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equation I-11})$$

La détermination graphique des paramètres cinétiques V_m et K_M n'est pas toujours très précise. Pour cette raison, on utilisera une méthode se basant sur la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten (**Equation I-11**). C'est la représentation de Lineweaver-Burk.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{Equation I-12})$$

En traçant la variation de $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{[S]}$, on pourra déterminer précisément la valeur de K_M comme montré à la **Figure I-2**.

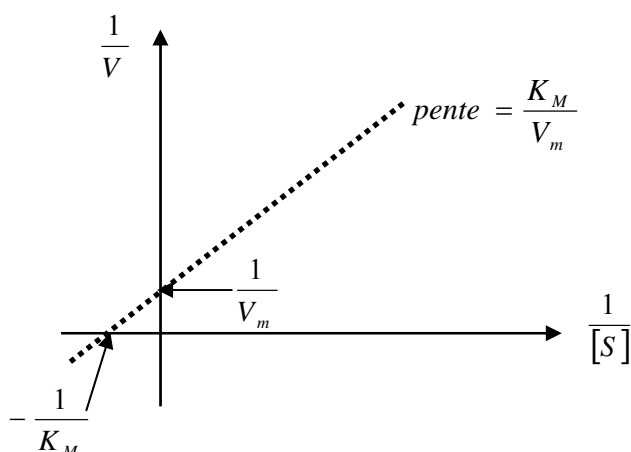


Figure I-2 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten selon Lineweaver-Burk.

Dans notre cas, le calcul de la constante apparente de Michaelis est effectué directement en traçant la variation de $1/i=f(1/[S])$.

Pour un capteur ampérométrique, la densité de courant limite est proportionnelle à la vitesse de la réaction enzymatique V :

$$i = \alpha_{corr} z F V \quad (\text{Equation I-13})$$

Avec α_{corr} : Facteur de correction

z : Nombre d'électrons transférés

F : Constante de Faraday

La variation du courant en fonction de la concentration en substrat $[S]$ est alors :

$$i = \alpha_{corr} zF \frac{V_m [S]}{K_M + [S]} \quad \text{(Equation I-14)}$$

La valeur réelle de l'asymptote i est inférieure à zFV_m (facteur de correction $\alpha_{corr} < 1$) car les espèces P diffusent dans les trois dimensions de l'espace bien que la direction vers l'électrode soit privilégiée. En plus, un dépôt excessif d'enzymes sur l'électrode peut en partie masquer les sites réactionnels électrochimiques (diminution du coefficient α_{corr}) et limitent la diffusion du substrat à travers la biomembrane.

Lorsqu'il y a une forte limitation de la diffusion du substrat, il convient de compléter le modèle cinétique pour tenir compte de cette diffusion à l'intérieur de la couche enzymatique. C'est le modèle à couche limitante d'apport. La vitesse d'avancement de la réaction devient alors :

$$V = \frac{V_m [S]}{K_M + [S] + V_m d/D} \quad \text{(Equation I-15)}$$

Avec D , le coefficient de diffusion et d , la distance entre l'enzyme et la surface du film.

Soit :

$$i = \alpha_{corr} zF \frac{V_m [S]}{K_M + [S] + V_m d/D} \quad \text{(Equation I-16)}$$

III. Les nanotubes de carbone, un matériau pour les biocapteurs

Les propriétés exceptionnelles des nanotubes de carbone en termes de surface spécifique et de caractéristiques électriques en font des candidats prometteurs pour le développement des biocapteurs. Des avancées particulièrement prometteuses, en termes de sensibilité, ont été obtenues en combinant les propriétés des nanotubes avec celles des protéines greffées. Outre les procédures de co-immobilisation physique des nanotubes et de

biomolécules, les nanotubes doivent généralement subir une fonctionnalisation afin de créer des attaches permettant l'ancrage de protéines [128].

III.1. Fonctionnalisation covalente

Les enzymes peuvent être immobilisées sur les nanotubes oxydés en créant des liaisons amides avec les acides carboxyliques formés sur les nanotubes de carbone. Le greffage covalent des entités biologiques à la surface des nanotubes est plus efficace sur les défauts à leurs surfaces [129, 130] et spécialement sur des nanotubes de petits diamètres, comme les tubes HiPCO, du fait de la courbure importante de leur plan de graphène [131]. Cette méthode de fonctionnalisation qui rend les nanotubes de carbone solubles en milieu aqueux a aussi permis leur utilisation dans la technique de "layer by layer".

Par exemple, des biocapteurs ampérométriques à glucose reproductibles, stables et sélectifs ont été fabriqués par Liu *et al.* à la surface d'électrodes de carbone vitreux par auto-assemblage électrostatique des nanotubes de carbone chargés négativement et de polymère cationique, le polydiallyldiméthylammonium chloride (PDDA). Ainsi, le système (PDDA/GO_x/PDDA/CNT) formé présente un microenvironnement favorable permettant de préserver la bioactivité de la glucose oxydase [132].

Wang *et al.* ont présenté en 2006, une procédure originale d'élaboration de biocapteur à glucose en se basant sur la même technique en utilisant des nanotubes de carbone chargés négativement [133]. La surface de l'électrode d'or est fonctionnalisée par des charges négatives suite à un traitement à l'acide 11-mercaptopundécanoïque (MUA), puis incubée dans une solution de polymère rédox chargé positivement, le poly[(vinylpyridine)Os(bipyridyl)₂Cl^{2+/3+}] (PVP-Os). La fixation de l'enzyme est effectuée par piégeage dans une matrice de nanotubes de carbone (Schéma I-14).

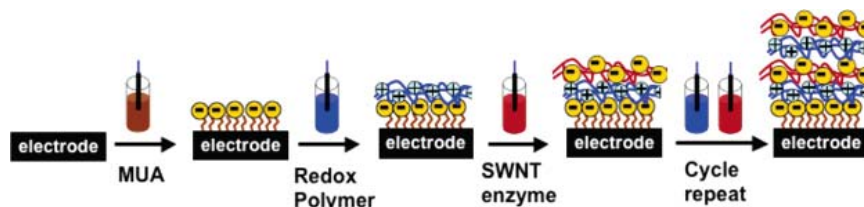


Schéma I-14: Procédure de fonctionnalisation par la technique couche par couche selon Wang *et al.* [133].

Gooding *et al.* ont présenté une stratégie intéressante permettant l'étude des propriétés de transfert d'électrons des enzymes rédox, la 11-microperoxydase (MP-11) via son

attachement à l'extrémité de SWCNTs alignés (**Schéma I-15**). Dans ce cas, une électrode d'or activée par la cysteamine (SAM) est immergée dans une dispersion de SWCNTs oxydés dans du diméthylformamide (DMF) contenant du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) afin de convertir les groupements carboxyles localisés aux extrémités des CNTs en des esters carbodiimide actifs. La microperoxydase est liée covallement aux extrémités des tubes par incubation de ces dernières dans une solution de microperoxydase à 4°C durant une nuit [134].

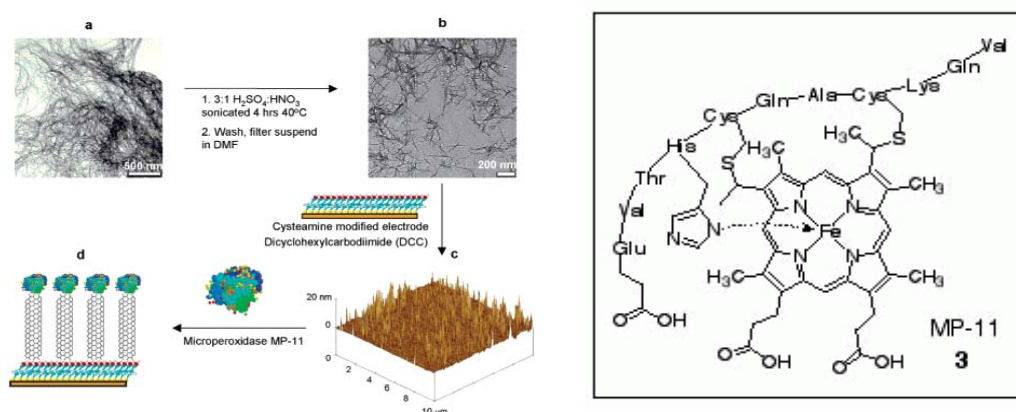


Schéma I-15: Alignement des CNTs pour le transfert d'électrons avec la microperoxydase MP-11 selon Gooding et al. [134] et Structure chimique du microperoxydase MP-11 [135].

Le groupe de Willner a proposé une approche originale pour l'immobilisation et la connexion électrique d'oxydase par des nanotubes de carbone (**Schéma I-16**). Une extrémité d'un SWCNT oxydé est attachée d'une façon covalente en présence d'un agent de couplage, le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), à la surface d'une électrode d'or activée par un mélange thioéthanol/cystamine, alors que l'autre extrémité est greffée chimiquement au Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) [136]. Après reconstitution de la glucose oxydase par incubation d'une apo-enzyme sur la FAD, ils ont décrit une étude structurale sur l'alignement de la glucose oxydase en utilisant des connecteurs électriques entre le centre de l'enzyme rédox et la surface de l'électrode. Ils ont aussi démontré que la GOX était connectée à l'électrode via le SWCNT qui agit comme un fil électrique entre l'enzyme et la surface du transducteur.

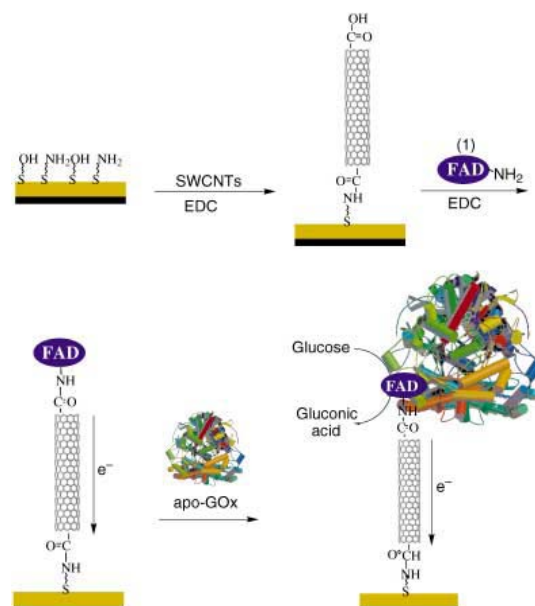


Schéma I-16 : Fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone par un cofacteur enzymatique (FAD) selon Willner *et al.* [136].

Shi Kam *et al.* ont rapporté une application des nanotubes de carbone fonctionnalisés par une entité fluorescente, le 5-(5-aminopentyl)thioureidyl fluorescein en présence de l'EDC (le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) ainsi que des SWCNT-streptavidine pour la fixation des cellules du leukemia promyelocytic humain (HL60) par endocytose [137].

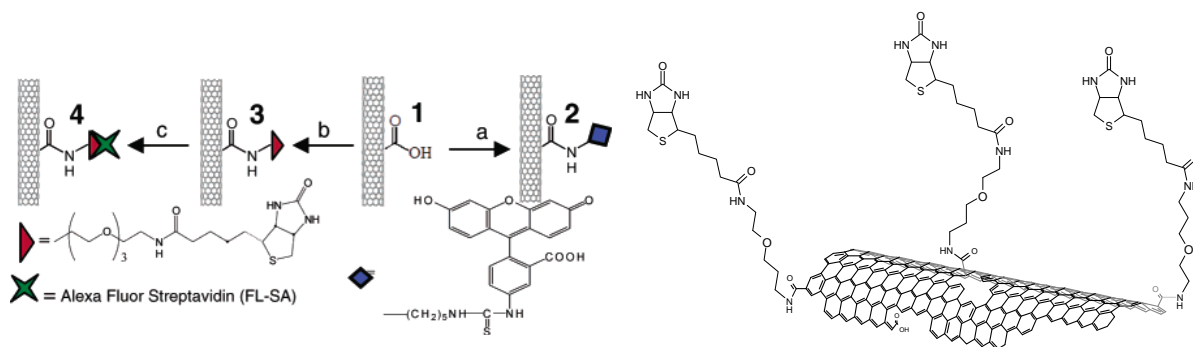


Schéma I-17 : Fonctionnalisation des nanotubes de carbone selon Kam *et al* pour la fixation du HL60 [137].

Williams *et al.* ont développé une méthode de fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone par du PNA (Peptide Nucleic Acid) qui est un analogue de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) en faisant subir aux nanotubes un traitement acide puis en les faisant réagir avec du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride et du N-hydroxysuccinimide (NHS) afin de former des SWCNTs fonctionnalisés par des groupements esters activés [138]. Ceci va permettre l'accrochage à la surface de ces nanotubes des PNA (Schéma I-18).

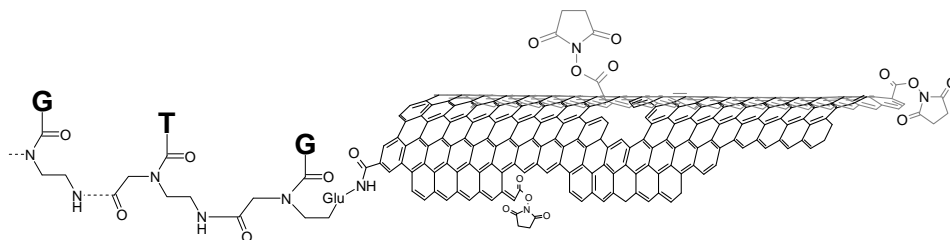


Schéma I-18 : Fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone par du PNA selon Williams et al. [138].

III.2.Fonctionnalisation non-covalente

Une autre façon d'immobiliser les biomolécules sur les nanotubes de carbone consiste à employer des interactions non-covalentes entre les nanotubes et un réactif susceptible de développer un couplage chimique ou affiné avec une biomolécule. La première approche pour utiliser les SWCNTs pour l'immobilisation spécifique de biomolécules a été réalisée par le groupe de Hongji Dai en 2001 [139], qui a décrit la fonctionnalisation non covalente des nanotubes de carbone pour l'immobilisation de différentes molécules biologiques avec un bon contrôle de la spécificité. La fonctionnalisation nécessite une molécule bi-fonctionnelle, l'acide 1-pyrenebutanoïque, estérifiée par un groupement succinimidyl. La fixation est basée sur les interactions des systèmes π entre le N-succinimidyl-1-pyrenebutanoate et la paroi des nanotubes (Schéma I-19). Ces molécules sont adsorbées d'une façon irréversible à la surface des nanotubes hydrophobes dispersés dans le DMF et le méthanol, et permettent l'immobilisation de la ferritine, de la streptavidine et de la biotiny-3,6-dioxaoctanediamine. Ces premiers résultats ont marqué le point de départ d'un intérêt croissant pour la construction de biocapteurs à base de SWCNTs.

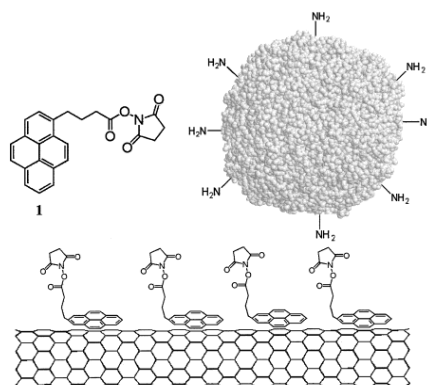


Schéma I-19 : Fonctionnalisation non-covalente des nanotubes de carbone par des dérivés de pyrène portant des esters activés selon Hongji Dai et al. [139].

Koen Besteman *et al.* ont réussi en 2003 à réaliser un biocapteur à effet de champ en immobilisant la glucose oxydase sur des nanotubes de carbone par l'intermédiaire d'une

molécule fixée d'un côté aux SWCNTs par des groupements pyrène et de l'autre côté à l'enzyme par une liaison amide [140].

Chao Li *et al.* ont réalisé des capteurs pour la détection d'un marqueur du cancer de la prostate l'antigène PSA (Prostate-Specific-Antigen) en utilisant le même système d'immobilisation [141]. Les groupement acide 1-pyrenebutanoïque se trouvant à la surface des nanotubes de carbone sont convertis en ester carboxylate succinimidyl par incubation dans le N,N'-dicyclohexylcarbodiimie (DCC) et le N-hydroxysuccinimide. Les anticorps sont attachés à la surface de l'électrode par formation de liaison amide (Schéma I-20).

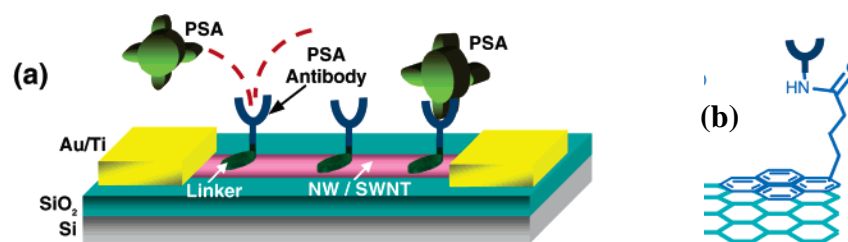


Schéma I-20 : Représentation schématique de l'immunocapteur à base de SWCNT pour la détection du PSA (a) et Fonctionnalisation des CNTs par l'anticorps AB-PSA (b) [141].

III.3. Fonctionnalisation par électropolymérisation

Parmi les méthodes les plus simples d'immobilisation de biomolécules, l'encagement dans un film polymère par électropolymérisation s'avère particulièrement adapté à la biofonctionnalisation des CNTs. Les avantages de cette approche sont combinés avec les propriétés exceptionnelles des nanotubes de carbone. Des articles récents décrivent des biocapteurs enzymatiques à base de nanotubes de carbone, où l'enzyme est piégée par électropolymérisation [142]. Notamment les films polypyrroliques peuvent fournir un support optimal pour interagir avec les nanotubes de carbone.

Par exemple, Joseph Wang et Mustapha Musameh ont décrit en 2005 une procédure de préparation d'un biocapteur ampérométrique basé sur la co-immobilisation de nanotubes de carbone et de glucose oxydase dans un film électropolymérisé de polypyrrole [143].

Wallace *et al.* ont développé un nouveau matériau constitué par des nanotubes de carbone alignés et hautement orientés obtenus par pyrolyse du Fe(II) phthalocyanine sous atmosphère d'argon à 900°C recouverts par une couche de polypyrrole permettant l'immobilisation du GOX sur les nanotubes durant le processus de polymérisation [144].

S. Cosnier *et al.* ont également développé une méthode originale de fonctionnalisation des nanotubes de carbone dans un milieu aqueux en présence d'un tensioactif électropolymérisable, le (11-pyrrolyl-1-ylundecyl)triéthylammonium tétrafluoroborate [145].

Ceci permet par addition de biomolécules, en particulier la glucose oxydase et la tyrosinase, et par simple électropolymérisation, une élaboration simple et rapide de biocapteurs. Le film de nanotubes de carbone obtenu à la surface de l'électrode est homogène et les biomolécules sont piégées au cours du processus d'électropolymérisation.

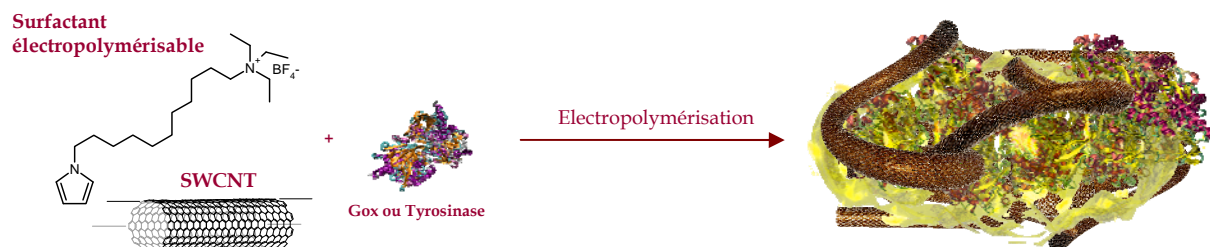


Schéma I-21 : Fonctionnalisation des nanotubes de carbone par électro-polymérisation selon Cosnier et al. [145].

Une nouvelle génération de biocapteurs à base de nanotubes de carbone et du système d'affinité entre l'adamantane et la β -cyclodextrine est décrite en 2009 (**Schéma I-22**). Un film de poly(pyrrole-adamantane) a été électrogénéré sur des dépôts de SWCNT. Ce film permet l'immobilisation d'enzymes par l'intermédiaire de nanoparticules modifiées par la β -cyclodextrine en utilisant les interactions hôte-invité "host-guest" [124].

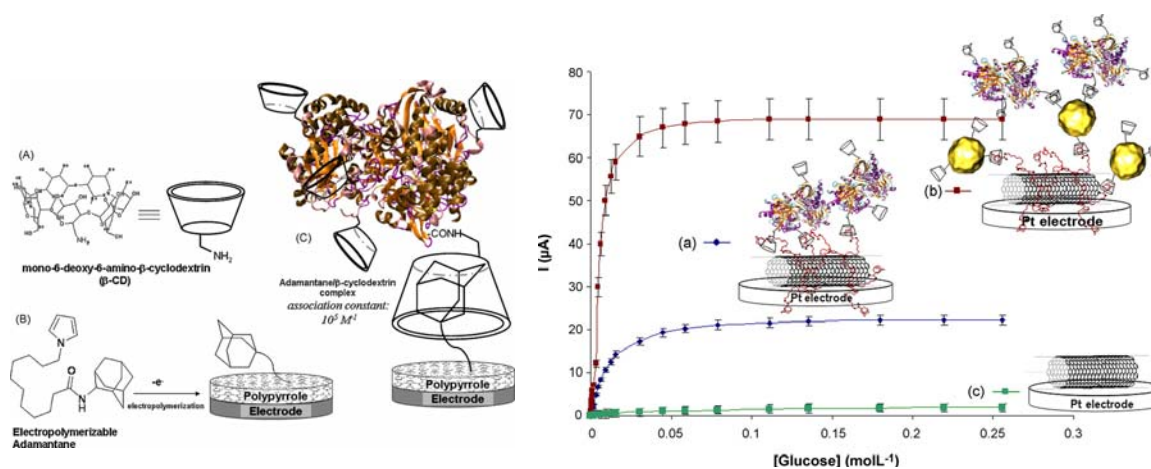


Schéma I-22 : Fonctionnalisation des nanotubes de carbone par électro-polymérisation du pyrrole-adamantane selon Holzinger et al. [124].

Schmidtke *et al.* ont proposé un biocapteur à glucose par immobilisation de la GOX avec des SWCNTs et un film de poly[(vinylpyridine)Os(bipyridyl)₂Cl^{2+/3+}] en utilisant deux alternatives ; déposer en premier lieu les SWCNTs à la surface de l'électrode de carbone vitreux ensuite l'hydrogel contenant le polymère rédox et l'enzyme, ou bien incorporer le polymère rédox dans le composite de GOX et de SWCNTs puis modifier l'électrode de carbone vitreux comme montré au **Schéma I-23** [146].

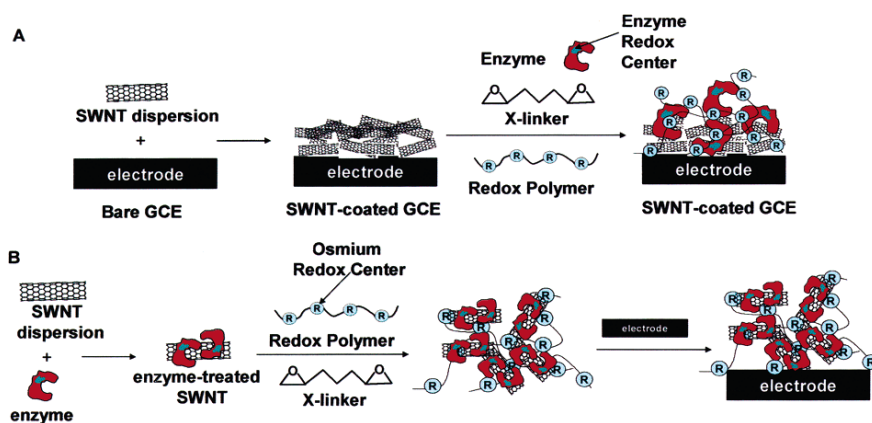


Schéma I-23: *Elaboration de biocapteur obtenu par un film de SWCNT fixé sur une électrode puis dépôt d'un hydrogel rédox (A) ou par incubation de SWCNTs dans une solution d'enzyme puis par incorporation dans un hydrogel rédox suivi d'un dépôt sur électrode (B) [146].*

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté les nanotubes de carbone ; l'historique de leur découverte, leur description, leurs propriétés, leurs domaines d'application ainsi que leur fonctionnalisation. Nous avons ensuite décrit les biocapteurs, leurs différentes composantes et les trois systèmes d'affinités les plus utilisés permettant l'ancrage enzymatique. Nous avons présenté dans une troisième partie quelques exemples bibliographiques de fonctionnalisation de nanotubes de carbone pour la détection biologique.

Références bibliographiques du chapitre I

- [1] Diana Lucio-Arias, Loet Leydesdorff, *Scientometrics*, **2007**, 70, 603
- [2] Y.Liu, Sc.Obrien, Q.Zhang, J.R.Heath, F.K.Tittel, R.F.Curl, H.W.Kroto, R.E.Smalley, *Chemical Physics Letters*, **1986**, 126, 215
- [3] S. Iijima, *Nature*, **1991**, 354, 56
- [4] Sumio Iijima, Toshinari Ichihashi, *Nature*, **1993**, 363, 603
- [5] D. S.Bethune, C. H.Kiang, M. S.de Vries, G.Gorman, R.Savoy, J.Vazquez, R.Beyers, *Nature*, **1993**, 363, 605
- [6] Guest Editorial, *Carbon*, **2006**, 44, 1621
- [7] L.V.Radushkevich, V.M.Lukyanovich, *Zurn Fisic Chim*, **1952**, 26, 88
- [8] M. Hillert, N.Lange, *Z Zeitschrift fuer Kristallographie, Kristallgeometrie, Kristallphysik, Kristallchemie*, **1958**, 111, 24
- [9] A. Oberlin, M. Endo, T. Koyama, *Journal of Crystal Growth*, **1976**, 32, 335
- [10] J.Abrahamson, *Carbon*, **1973**, 11, 337
- [11] A.M.Nesterenko, N.F.Kolesnik, S.Akhmatov Yu, V.I.Sukhomlin, O.V.Prilutskii, *Izvestiya Akademii Nauk SSSR Metally*, **1982**, 3, 12
- [12] T. Belin, F. Epron, *Materials Science and Engineering B*, **2005**, 119, 105
- [13] C. N. R. Rao, Rakesh Voggu, A. Govindaraj, *Nanoscale*, **2009**, 1, 96
- [14] Micah J. Green, Natnael Behabtu, Matteo Pasquali, W. Wade Adams, *Polymer*, **2009**, 50, 4979
- [15] S. Amelinckx, A. Lucas, P. Lambin, *Rep. Prog. Phys.*, **1999**, 62, 1471
- [16] Andrea Szabo, Caterina Perri, Anita Csato, Girolamo Giordano, Danilo Vuono, Janos B. Nagy, *Materials*, **2010**, 3, 3092
- [17] Zujin Shi, Yongfu Lian, Fu Hui Liao, Xihuang Zhou, Zhennan Gu, Y Zhang, S Iijima, Hongdong Li, Kwok To Yue, Shu-Lin Zhang, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **2000**, 61, 1031
- [18] M. Cadek, R. Murphy, B. McCarthy, A. Drury, B. Lahr, R. C. Barklie, M. in het Panhuis, J. N. Coleman, W. J. Blau, *Carbon*, **2002**, 40, 923
- [19] Haiyan Zhang, Yu Ding, Chunyan Wu, Yimin Chen, Yanjuan Zhu, Yanyang He, Shao Zhong, *Physica B: Condensed Matter*, **2003**, 325, 224

- [20] Mitsuhiro Kusaba, Yoshiaki Tsunawaki, *Thin Solid Films*, **2006**, 506-507, 255
- [21] D. Laplaze, L. Alvarez, T. Guillard, J. M. Badie, G. Flamant, *Carbon*, **2002**, 40, 1621
- [22] D. Luxembourg, G. Flamant, D. Laplaze, *Carbon*, **2005**, 43, 2302
- [23] Masako Yudasaka, Nobuko Sensui, Morio Takizawa, Shunji Bandow, Toshinari Ichihashi, Sumio Iijima, *Chemical Physics Letters*, **1999**, 312, 155
- [24] P. C. Eklund, B. K. Pradhan, U. J. Kim, Q. Xiong, *Nano Lett.*, **2002**, 2, 561
- [25] D. Laplaze, L. Alvarez, T. Guillard, J. M. Badie, G. Flamant, *Carbon*, **2002**, 40, 1621
- [26] S.N. Bondi, W.J. Lackey, R.W. Johnson, X. Wang, Z.L. Wang, *Carbon*, **2006**, 44, 1393
- [27] P. Nikolaev, M.J. Bronikowski, R. Kelley Bradley, F. Rohmund, D.T. Colbert, K.A. Smith, R.E. Smalley, *Chemical Physics Letters*, **1999**, 313, 91
- [28] Valentin N. Popov, *Materials Science and Engineering R*, **2004**, 43, 61
- [29] R. Saito, M. Fujita, M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, *Appl. Phys. Lett.*, **1992**, 60, 2204
- [30] J.W. Mintmire, B.I. Dunlap, C.T. White, *Physical Review Letters*, **1992**, 68, 631
- [31] P.G. Collins, A. Zettl, H. Bando, A. Thess, R. Smalley, *Science*, **1997**, 278, 100
- [32] R. Martel, T. Schmidt, H.R. Shea, T. Hertel, Ph. Avouris, *Applied Physics Letter*, **1998**, 73, 2447
- [33] G.Gruner, *Anal Bioanal Chem*, **2006**, 384, 322
- [34] Brett Lee allen, Padmakar D. Kichambare, Alexander Star, *Advanced Materials*, **2007**, 19, 1439
- [35] J.A. Misewich, R. Martel, Ph. Avouris, J.C. Tsang, S. Heinze, J. Tersoff, *Science*, **2003**, 300, 783
- [36] H. Dai, J. H. Hafner, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, R. E. Smalley, *Nature*, **1996**, 384, 147
- [37] S. S. Wong, J. D. Harper, P. T. Lansbury, Jr., C. M. Lieber, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 603
- [38] Takeru Okada, Toshihiro Yoshioka, *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, 93, 171501
- [39] M.S.Dresselhaus, G.Dresselhaus, J.C.Charlier, E.Hernandez, *Philosophical transactions A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, **2004**, 362, 2065
- [40] Eric Pop, David Mann, Qian Wang, Kenneth Goodson, Hongjie Dai, *Nano Lett.*, **2006**, 6, 96

- [41] G. D.Zhan, J. D.Kuntz, H.Wang, A.K.Mukherjee, *Thermal Conductivity*, **2005**, 27, 103
- [42] J. Bernholc, D. Brenner, M.B. Nardelli, V. Meunier, C. Roland, *Annu. Rev. Mater. Res.*, **2002**, 32, 347
- [43] V. N. Popov, V. E. Van Doren, M. Balkanski, *Physical Review B*, **2000**, 61, 3078
- [44] J. Y. Huang, S. Chen, Z. Q. Wang, K. Kempa, Y. M. Wang, S. H. Jo, G. Chen, M. S. Dresselhaus, Z. F. Ren, *Nature*, **2006**, 439, 281
- [45] S. Iijima, C. Brabec, A. Maiti, J. Bernholc, *Journal of Chemical Physics*, **1996**, 104, 2089
- [46] A. Peigney, C. Laurent, E. Flahaut, R. R. Bacsá, A. Rousset, *Carbon*, **2001**, 39, 507
- [47] J.Wang, *Electroanalysis*, **2005**, 17, 7
- [48] D. Vairavapandian, P. Vichchulada, M.D. Lay, *Anal. Chim Acta*, **2008**, 626, 119
- [49] J. Hilding, E. A. Grulke, Z. G. Zhang, F. Lockwood, *Journal of Dispersion Science and Technology*, **2003**, 24, 1
- [50] Howard Wang, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2009**, 14, 364
- [51] Rick. Rajter, Roger H.French, *International Journal of Materials Research*, **2010**, 101, 27
- [52] K. Balasubramanian, M. Burghard, *Small*, **2005**, 1, 180
- [53] J. Chen, M. A. Hamon, H. Hu, Y. Chen, A. M. Rao, P. C. Eklund, R. C. Haddon, *Science*, **1998**, 282, 95
- [54] E. Riggs, Z. Guo, D.L. Carroll, Y.-P. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5879
- [55] J. Liu, A.G. Rinzler, H. Dai, J.H. Hafner, R.K. Bradley, P.J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelinov, C.B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.-S. Shon, T.R. Lee, D.T. Colbert, R.E. Smalley, *Science*, **1998**, 280, 1253
- [56] E. Bekyarova, M. E. Itkis, N. Cabrera, B. Zhao, A. Yu, J. Gao, R. C. Haddon, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5990
- [57] M. Holzinger, O. Vostrowsky, A. Hirsch, F. Hennrich, M. Kappes, R. Weiss, F. Jellen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, 40, 4002
- [58] H. Peng, P. Reverdy, V. N. Khabashesku, J. L. Margrave, *Chem. Commun.*, **2003**, 3, 362
- [59] H. S. Chen, A. R. Kortan, R. C. Haddon, N. Kopylov, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 3088
- [60] M. Holzinger, J. Abraham, P. Whelan, R. Graupner, L. Ley, F. Hennrich, M. Kappes, A. Hirsch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 28, 8566

- [61] M. Holzinger, J. Steinmetz, D. Samaille, M. Glerup, M. Paillet, P. Bernier, L. Ley, R. Graupner, *Carbon*, **2004**, 42, 941
- [62] V. Georgakilas, K. Kordatos, M. Prato, D. M. Guldi, M. Holzinger, A. Hirsch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 760
- [63] G. Viswanathan, N. Chakrapani, H. Yang, B. Wei, H. Chung, K. Cho, Y. Ryu Chang, M. Ajayan Pulickel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9258
- [64] E. T. Mickelson, C. B. Huffman, A. G. Rinzler, R. E. Smalley, R. H. Hauge, J. L. Margrave, *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 296, 188
- [65] J. L. Bahr, J. M. Tour, *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 3823
- [66] Shimou Chen, Wenming Shen, Guozhong Wu, Daoyong Chen, Ming Jiang, *Chemical Physics Letters*, **2005**, 402, 312
- [67] Jayanta Chattopadhyay, Anil K. Sadana, Feng Liang, Jonathan M. Beach, Yunxuan Xiao, Robert H. Hauge, W. E. Billups, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4067
- [68] Y. Sun, S.R. Wilson, D.I. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 5348
- [69] J. Kong, H. Dai, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 2890
- [70] Martin Jönsson-Niedziolka, Katarzyna Szot, Jerzy Rogalski, Marcin Opallo, *Electrochemistry Communications*, **2009**, 11, 1042
- [71] Christian Ehli, G. M. Aminur Rahman, Norbert Jux, Domenico Balbinot, Dirk M. Guldi, Francesco Paolucci, Massimo Marccaccio, Demis Paolucci, Manuel Melle-Franco, Francesco Zerbetto, Stephane Campidelli, Maurizio Prato, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 11222
- [72] Adam J. Blanch, Claire E. Lenehan, Jamie S. Quinton, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, 9805
- [73] M. Baibarac, I. Baltog, C. Godon, S. Lefrant, O. Chauvet, *Carbon*, **2004**, 42, 3143
- [74] Nanda Gopal Sahoo, Yong Chae Jung, Hyang Hwa So, Jae Whan Chob, *Synthetic Metals*, **2007**, 157, 374
- [75] K. L. Salipira, B. B. Mamba, R. W. Krause, T. J. Malefetse, S. H. Durbach, *Environ Chem Lett*, **2007**, 5, 13
- [76] Zdenko Spitalskya, Dimitrios Tasis, Konstantinos Papagelis, Costas Galiotis, *Progress in Polymer Science*, **2010**, 35, 357
- [77] A. Star, J.F. Stoddart, D. Steuerman, M. Diehl, A. Boukai, E.W. Wong, X. Yang, S.-W. Chung, H. Choiand, J.R. Heath, *Angew. Chem.*, **2001**, 113, 1721
- [78] M.J.O'Connell, P.Boul, L.M.Ericson, C.Huffman, Y.Wang, E.Haroz, C.Kuper, J.Tour, K.D.Ausman, R.E.Smalley, *Chem.Phys.Lett.*, **2001**, 342, 265

- [79] J. Zhu, M. Yudasaka, M. Zhang, S. Iijima, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 11317
- [80] M. Burghard, G. Duesberg, G. Philipp, J. Muster, S. Roth, *Adv. Mater.*, **1998**, 10, 584
- [81] Jeremy Sloan, Jens Hammer, Marek Zwiefka-Sibley, Malcolm L. H.Green, *Chemical Communications*, **1998**, 3, 347
- [82] Brian W. Smith, Marc Monthieux, David E. Luzzi, *Chemical Physics Letters*, **1999**, 315, 31
- [83] T.Okazaka, K.Suenaga, K.Hirahara, S.Bandow, S.Iijima, H.Shinohara, *J.Am.Chem.Soc.*, **2001**, 123, 9673
- [84] Adam Heller, *Current Opinon in Biotechnology*, **1996**, 7, 50
- [85] P.B. Daniels, J.K. Deacon, M.J. Eddowes, D.G. Peddley., *Sensors and Actuators*, **1988**, 15, 299
- [86] A. S. Jdanova, S. Poyard, A. P. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 321, 35
- [87] A. M. Azevedo, D. Miguel, F. Prazeres, J. M.S. Cabral, L. P. Fonseca, *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 21, 235
- [88] Y. Zhang, S. Tadigadapa, *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, 19, 1733
- [89] K.A. Davis, T.R. Leary., *Anal. Chem*, **1989**, 61, 1227
- [90] M.Mehrvar, M.Abdi, *Analytical Sciences*, **2004**, 20, 1113
- [91] R.R.Kim, *Biosensors and Bioelectronics*, **1995**, 10, 533
- [92] K.Reybier, S.Zairi, N.Jaffrezic-Renault, B.Fahys, *Talanta*, **2002**, 56, 1015
- [93] K. Kriz, M. Anderlund, D. Kriz, *Biosen. Bioelectron*, **2001**,16, 363
- [94] ML.Hamlaoui, K.Reybier, M.Marrakchi, N.Jaffrezic-Renault, C.Martelet, R.Kherrat, A.Walcarius, *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 466, 39
- [95] E.Wilkins, and P.Atanosov, *Medical Engineering and Physics*, **1996**, 18, 273
- [96] S. J. Updike, B. J. Gilligan, M. C. Shults, R. K. Rhodes, *Diabetes Care*, **2000**, 23, 208
- [97] R. Lenigk, E. Lam, A. Lai, H. Wang, Y. Han, P. Carlier, R. Renneberg, *Biosen. Bioelectron*, **2000**,15, 541
- [98] BM.Paddle, *Biosensors and Bioelectronics*, **1996**, 11, 1079
- [99] A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csöregi, G. B. Ardila, I. Y. Sakharov, R. G. Gazaryan, *Biosen. Bioelectron.*, **2000**, 15, 491

- [100] L. I. Netchiporouk, N. F. Shram, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, R. Cespuglio, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 4358
- [101] H.-Z. Bu, S. R. Mikkelsen, A. M. English, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 4320
- [102] W.-Y. Lee, K. S. Lee, T.-H. Kim, M.-C. Shin, J.-K. Park, *Electroanalysis*, **2000**, 12, 78
- [103] W.-Y. Lee, S.-R. Kim, T.-H. Kim, K. S. Lee, M.-C. Shin, J.-K. Park, *Anal. Chim Acta*, **2000**, 404, 195
- [104] M. Díaz-González, M. B. González-García, A. Costa-García, *Electroanalysis*, **2005**, 17, 1901
- [105] E. Katz, I. Willner, *Electroanalysis*, **2003**, 15, 913
- [106] K. Wan, J. M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, *Talanta*, **2000**, 52, 663
- [107] S. Cosnier, C. Gondran, A. L. Pellec, A. Senillou, *Anal. Lett.*, **2001**, 34, 61
- [108] N.M. Green, M.D. Melamed, *Biochemical Journal*, **1963**, 89, 591
- [109] R.J. De Lange, and T.S. Huang *Journal of Biological Chemistry*, **1971**, 246, 698
- [110] Paul Pantano, Thomas Hellman Morton, Werner G. Kuhr, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 1833
- [111] Oded Livnah, Edward A. Bayert, Meir Wilcheht, Joel Sussman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1993**, 90, 5076
- [112] Serge Cosnier, Margarita Stoytcheva, Anne Senillou, Hubert Perrot, Rosa P. M. Furriel, Francisco A. Leone, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 3692
- [113] Serge Cosnier, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2000**, 89, 127
- [114] Serge Cosnier, Bruno Galland, Chantal Gondran, Arielle Le Pellec, *Electroanalysis*, **1998**, 10, 808
- [115] C. Mousty, J.-L. Bergamasco, R. Wessel, H. Perrot, S. Cosnier, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 2890
- [116] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *Chem. Commun.*, **2004**, 21, 2472
- [117] N. Haddour, J. Chauvin, C. Gondran, S. Cosnier, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9693
- [118] A. Villiers, *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, **1891**, 112, 536
- [119] A. Fragoso, J. Caballero, E. Almirall, R. Villalonga, R. Cao, *Langmuir*, **2002**, 18, 5051
- [120] R. Villalonga, R. Cao, A. Fragoso, A. E. Damiao, P. D. Ortiz, J. Caballero, *J. Mol. Cat. B.*, **2005**, 35, 79

- [121] R. Villalonga, C. Camacho, R. Cao, J. Hernández, u. C. Matías, *Chem. Commun.*, **2007**, 9, 942
- [122] C. Camacho, J. C. Matías, B. Chico, R. Cao, L. Gómez, B. K. Simpson, R. Villalonga, *Electroanalysis*, **2007**, 19, 2538
- [123] F. Charbonnier, S. Penadés, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 17, 3650
- [124] M. Holzinger, L. Bouffier, R. Villalonga, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24, 1128
- [125] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5752
- [126] Jessica Baur, Chantal Gondran, Michael Holzinger, Eric Defrancq, Hubert Perrot, Serge Cosnier, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 1066
- [127] W. P. Atkins., *Physical Chemistry*. 3rd Ed Oxford University, Press New York, **1982**
- [128] Wenrong Yang, Kyle R. Ratinac, Simon P. Ringer, Pall Thordarson, J. Justin Gooding, Filip Braet, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 2114
- [129] S. Banerjee, T. Hemraj-Benny, S. S. Wong, *Advanced Materials*, **2005**, 17, 17
- [130] K. Balasubramanian, M. Burghard, *Small*, **2005**, 1, 180
- [131] Andreas Hirsch. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1853
- [132] G.Liu, Y.Lin, *Electrochem. Commun*, **2006**, 8, 251
- [133] Youdan Wang, Pratixa P. Joshi, Kevin L. Hobbs, Matthew B. Johnson, and David W. Schmidtke, *Langmuir*, **2006**, 22, 9776
- [134] J.J.Gooding, R.Wibons, J.Liu, W.Yang, D.Losic, S.Orbons, F.J.Mearns, J.G.Shapter, D.B.Hibbert, *J.Am.Chem.Soc*, **2003**, 125, 9006
- [135] P.A. Mabrouk, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 189
- [136] F.Patolsky, Y.Weizmann, I.Willner, *Angew.Chem.Ind.Ed*, **2004**, 43, 2113
- [137] N. Wong Shi Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6850
- [138] K. A. Williams, P. T. M. Veenhuizen, B. G. de la Torre, R. Eritja, C. Dekker, *Nature*, **2002**, 420, 761
- [139] R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 3838
- [140] Koen Besteman, Jeong-O Lee, Frank G.M.Wiertz, Hendrik A.Heering, Cees Dekker, *Nano Letters*, **2003**, 3, 727

[141] Chao Li, Marco Curreli, Henry Lin, Bo Lei, F.N.Ishikawa, Ram Datar, Richard J.Cote, Mark E.Thompson, Chongwu Zhou, *J.Am.Chem.Soc*, **2005**, 127, 12484

[142] Gustavo A. Rivas, Maria D. Rubianes, Marcela C. Rodriguez, Nancy F. Ferreyra, Guillermina L. Luque, Maria L. Pedano, Silvia A. Miscoria, Concepcion Parrado, *Talanta*, **2007**, 74, 291

[143] Joseph Wang, Mustapha Musameh, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 539, 209

[144] M.Gao, L.Dai, G.G.Wallence, *Synth.Met*, **2003**, 137, 1393

[145] S. Cosnier, R. E. Ionescu, M. Holzinger, *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 5129

[146] P.P.Joshi, S.A.Merchant, Y.Wang, D.W.Schmidtke, *Anal.Chem*, **2005**, 77, 3183

Chapitre II:

Dispersion et caractérisation des nanotubes de carbone

Chapitre II

Dispersion et caractérisation des nanotubes de carbone

Introduction

L'essor des nanosciences et des nanotechnologies est porteur de bouleversements conceptuels et technologiques [1]. La réalisation, l'étude et la manipulation de structures, de systèmes ou d'objets à l'échelle du milliardième de mètre répond à un besoin fondamental de miniaturisation. En plus, les entités nanométriques se caractérisent par un comportement et des propriétés spécifiques. Ainsi, la nouvelle appréhension de la matière promet un développement technologique significatif.

Les nanotubes de carbone (NTCs) occupent une place particulière dans le monde des nanotechnologies. De plus, leur utilisation comme matériau d'électrodes pour la détection biomoléculaire est devenu un thème de recherche de plus en plus prisé ces dernières années. De nombreux groupes partout dans le monde travaillent sur l'exploitation des propriétés électriques des nanotubes de carbone afin de développer des biocapteurs. Pour atteindre ce but, la jonction des dépôts des nanotubes à la surface d'un transducteur ainsi que l'immobilisation des biomolécules sur ces électrodes doivent être stables et reproductibles, afin d'optimiser la conversion par le transducteur du signal biologique en un signal aisément exploitable. Pour cela, avoir une bonne dispersion est une étape cruciale dans la réussite de la réalisation du biocapteur. Différents travaux ont été réalisés afin d'obtenir une bonne dispersion de nanotubes de carbone pour développer des matériaux de haute performance [2]. La force thermodynamique qui entraîne la formation d'agrégats doit donc être contrée.

Parmi les approches proposées, celle conçue pour changer l'énergie de surface à l'aide de tensioactifs [3-5] afin d'améliorer leur compatibilité chimique avec le solvant ciblé. Cette

compatibilité augmente les caractéristiques de mouillage ou d'adhérence et réduit leur tendance à s'agglomérer. En parallèle, un intense effort de recherche a été entrepris pour améliorer notre connaissance sur ce nano-objet aux propriétés exceptionnelles à bien des égards suite à leur dispersion et leur dépôt sur des électrodes [6].

Nous avons utilisé des nanotubes de carbone obtenus par le procédé HiPCo qui bénéficie d'une expertise reconnue pour la synthèse de nanotubes de carbone. Nos efforts se sont orientés sur la conception et l'optimisation d'une méthode novatrice de dispersion des nanotubes de carbone permettant d'obtenir des dépôts homogènes à la surface d'électrodes de platine. Nos nanostructures à base de nanotubes de carbone constituent des structures de dimension minimale aptes à assurer plusieurs fonctions, telles que le transport d'électrons et l'expansion tridimensionnelle d'un dépôt. Le contrôle de la structure des nanotubes de carbone et leurs dépôts s'avèrent impératif pour maîtriser la conception de nos architectures tridimensionnelles employées pour les dispositifs biocapteurs.

Dans ce chapitre, nous présentons en premier lieu notre méthode de dispersion des nanotubes de carbone mise au point pour la fabrication de biocapteurs reproductibles et fiables. Nous présenterons en second lieu une caractérisation électrochimique des dépôts de nanotubes de carbone en tant que matériau d'électrode, puis nous décrirons les propriétés structurales et électrochimiques de ce matériau nanostructuré.

I. Technique de dispersion des nanotubes de carbone

Confronté à la double difficulté d'obtenir des solutions stables de nanotubes de carbone HiPCo et à la sensibilité des biomolécules envers des agents tensioactifs et des solvants toxiques, nous avons alors développé un prétraitement doux pour les nanotubes, sans créer de défauts, pour obtenir des dispersions homogènes avec une bonne reproductibilité sans affecter les propriétés de ces nanotubes [7]. Les nanotubes de carbone monofeuillets commerciaux (HiPCo, Unidym, purifiés) ont été prétraités en les dispersant successivement dans le tétrahydrofurane (THF) et le diméthylformamide (DMF) sans dépasser un délai de sonication de deux heures au total. Par exemple, 20 mg de nanotubes obtenus par le procédé HiPCo sont dispersés dans 300 mL de THF placés dans un bain à ultrasons pendant 1h30. Le solvant est ensuite évaporé afin de récupérer une poudre fine de nanotubes de carbone qui sera redispersée dans 200 mL de DMF pendant 30 minutes à température ambiante. Après sédimentation des nanotubes de carbone non dispersés, la solution est filtrée avec une

membrane PTFE ayant des pores de diamètre 0,45 μm puis rincée avec du THF. La pâte humide est transférée dans quelques millilitres d'éther diéthylique et agitée mécaniquement afin d'éviter l'agrégation des nanotubes de carbone. L'étape importante est le pilonnage de ce matériau à sec. L'avantage essentiel du procédé de traitement développé réside dans le fait que la dispersion des nanotubes de carbone est extrêmement homogène et stable dans le THF après une sonication de seulement 20 à 30 minutes, sans utilisation de tensio-actifs qui risquent de diminuer la stabilité des enzymes. Ces dispersions de nanotubes peuvent ensuite être utilisées pour modifier les surfaces des transducteurs avec des dépôts de nanotubes homogènes. **La figure II-1** montre une dispersion de nanotubes de carbone (0,1 mg mL⁻¹) soniquée pendant la même durée (20 minutes) avant et après les traitements indiqués.

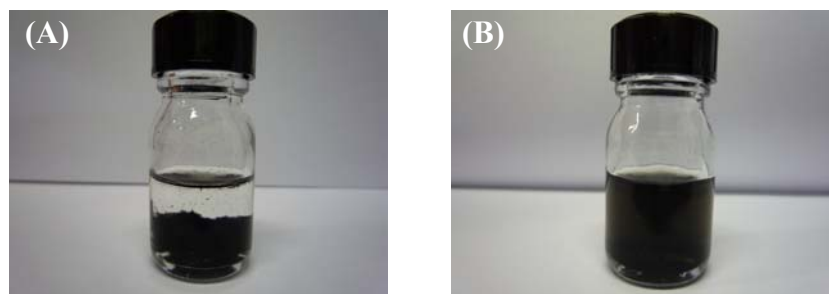


Figure II-1: Dispersion par sonication durant 20 minutes de nanotubes HiPCo avant (A) et après (B) l'étape de prétraitement.

Cependant, malgré l'obtention d'une bonne dispersion, des agrégats de nanotubes de carbone en fagots de tailles différentes apparaissent au fond du récipient. Bien que de faible ampleur, cette apparition d'agrégats qui précipitent empêche de connaître exactement la concentration des nanotubes en solution, et donc de déterminer avec précision la quantité de NTCs déposée sur la surface d'une électrode.

Afin de surmonter cet obstacle, nous avons conçu une approche électrochimique simple pour évaluer la quantité de nanotubes de carbone prétraités déposés à la surface d'électrodes [8]. Cette approche consiste à déterminer les charges capacitives induites par voltampérométrie cyclique lors de balayage de potentiels entre 0 et 0,6 V. Cette gamme de potentiels a été choisie afin d'éviter l'oxydation irréversible du dépôt de nanotubes. **La figure II-2** montre l'évolution de la charge intégrée en fonction du volume d'une solution de nanotubes déposée. Comme prévu, la charge capacitive augmente avec la quantité de nanotubes. Cette évolution s'avère linéaire, démontrant ainsi une bonne corrélation entre la charge capacitive et la quantité de nanotubes adsorbée à la surface des électrodes. Cette

approche électrochimique constitue ainsi une façon simple et rapide pour contrôler la quantité relative de nanotubes de carbone présente à la surface d'électrodes et s'avère essentielle pour l'élaboration de couches homogènes et stables.

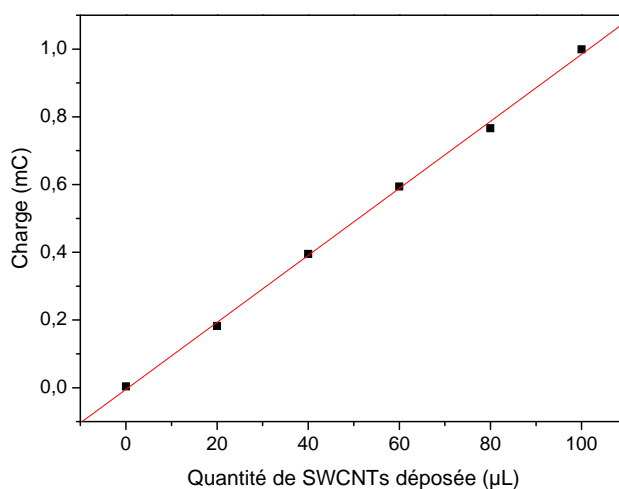


Figure II-2: Evolution de la charge capacitive en fonction du volume de solution de NTCs adsorbée à la surface de l'électrode.

II. Caractérisation des nanotubes de carbone

Les différentes techniques utilisées pour synthétiser des nanotubes permettent d'obtenir des nanotubes de diverses qualités, avec des distributions et des tailles variées. Afin de réaliser ce travail de thèse à base de nanotubes de carbone HiPCo, il est nécessaire de bien connaître la structure des échantillons de nanotubes à notre disposition. Les informations structurales initiales que nous possédions étant fragmentaires, nous avons décidé d'effectuer la caractérisation la plus complète possible de la structure de nos échantillons de nanotubes. La caractérisation a été effectuée avant et après l'étape de prétraitement. Nous avons utilisé des techniques de caractérisation de morphologie et de surface, à savoir la microscopie électronique, la diffusion Raman et la mesure de la mouillabilité. Nous avons aussi réalisé des études électrochimiques de dépôts de nanotubes de carbone sur des électrodes de platine. Nous avons donc corréler et recoupé les informations fournies par toutes ces techniques pour aboutir à une connaissance détaillée de la structure de nos échantillons.

II.1. Caractérisation morphologique et de surface

II.1.1. Caractérisation par Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique repose sur l'interaction d'un faisceau d'électrons avec la matière. Sous l'impact du faisceau d'électrons incidents balayant la surface de l'échantillon, des électrons secondaires et des rayonnements électromagnétiques sont générés dans le volume d'interaction et recueillis pour former des images. Le balayage de l'échantillon par le faisceau d'électrons permet d'enregistrer une suite de valeurs, et de reconstruire point par point la cartographie de l'effet mesuré à la surface de l'échantillon [9, 10].

Pour pouvoir observer les nanotubes de carbone en MEB, nous les avons disposés sur un Scotch double-face graphitique, lui-même collé sur un plot en cuivre afin d'améliorer la conductivité de l'ensemble et s'affranchir des phénomènes de charge. Les images ont été obtenues avec un ULTRA 55 FESEM basé sur une colonne GEMINI® FESEM avec un booster de faisceau (Nano Technology Systems Division, Carl Zeiss NTS GmbH, Germany) et un canon de tungstène, en appliquant un potentiel d'accélération. La **Figure II-3** illustre le contraste de topographie sur un échantillon de nanotubes HiPCo, avant et après l'étape de prétraitement. On constate que les fagots de ces nanotubes se présentent sous la forme de galettes très denses. L'observation des nanotubes à cette échelle en microscopie électronique à balayage permet de déduire plusieurs informations structurales. Nous pouvons ainsi juger la pureté des échantillons et la faible proportion d'impuretés graphitiques. Nous pouvons aussi appréhender la topologie et l'homogénéité des dépôts à la surface d'électrodes ainsi que la densité des fagots dans l'échantillon de nanotubes, voire leur enchevêtrement, et donc les connexions existantes entre eux. Toutefois, il est impossible de mesurer la longueur des nanotubes mono-feuillets par cette technique puisque l'enchevêtrement des fagots rend toute mesure de longueur hasardeuse. Par ailleurs, nous pouvons juger par cette technique d'analyse que la structure des nanotubes reste intacte et que l'échantillon est exempt de défauts structuraux suite à l'étape de prétraitement.

La microscopie à balayage électronique permet donc d'apprécier qualitativement l'échantillon d'une manière globale, cependant, il est nécessaire d'observer plusieurs zones des échantillons de nanotubes, afin d'obtenir, par recoupement, des informations structurales fiables.

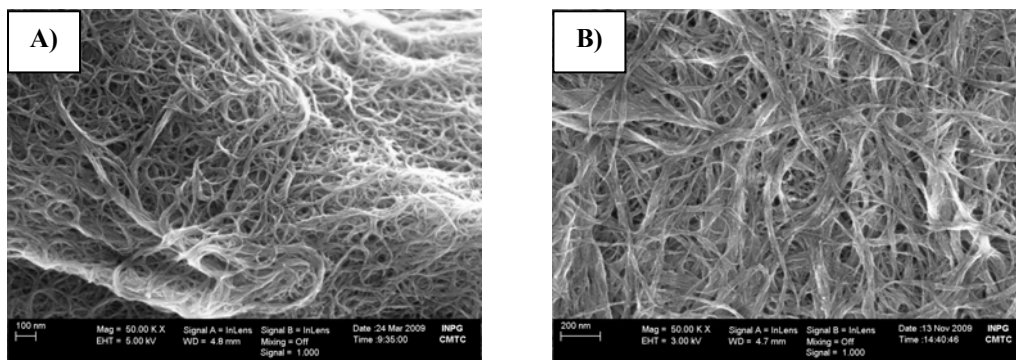


Figure II-3: Images MEB caractéristiques des échantillons de SWNTs HiPCO purifiés avant (A) et après (B) l'étape de prétraitement.

II.1.2. Caractérisation par spectroscopie Raman

Le principe de la spectroscopie Raman consiste à exciter l'échantillon à étudier avec une lumière monochromatique (un laser) et à analyser la lumière diffusée. Les photons incidents sont en partie absorbés par la matière. L'analyse en fréquence de la lumière diffusée met en évidence une composante de la même longueur d'onde que le faisceau incident, c'est la diffusion Rayleigh (diffusion élastique) et une composante de longueur d'onde différente du faisceau incident, c'est la diffusion Raman (diffusion inélastique).

Toutefois, si la fréquence $\nu_0 - \nu_{\text{vib}}$ du photon diffusé est inférieure à celle du photon incident (ν_0), il y a gain d'énergie vibrationnelle pour la molécule et perte d'énergie pour le photon, c'est la raie Stokes. Le photon qui cède son énergie possède donc une énergie $h\nu_0 - \Delta E$, où ΔE représente un saut énergétique.

Si au contraire le photon incident est diffusé à une fréquence $\nu_0 + \nu_{\text{vib}}$, il y a perte d'énergie vibrationnelle pour la molécule et gain d'énergie pour le photon, c'est la raie anti-Stokes. La molécule étant dans un état excité possède un niveau énergétique supérieur, elle peut se désexciter en donnant de l'énergie. Le photon possède alors l'énergie $h\nu_0 + \Delta E$, ce qui se traduit en terme spectral par l'apparition de raies symétriques à celles de Stokes énergétiquement équidistantes à celles de Rayleigh.

L'intensité de la diffusion anti-Stokes est toutefois faible et inférieure à celle des raies Stokes notamment, car conformément à la loi de répartition de Boltzmann la probabilité de présence des états excités est très faible.

Les spectres détectés correspondent donc aux structures dont les transitions optiques entre bande de conduction et bande de valence correspondent à la fenêtre résonante du laser d'excitation E_{laser} . Le **Schéma II-1** montre le principe de la diffusion Raman.

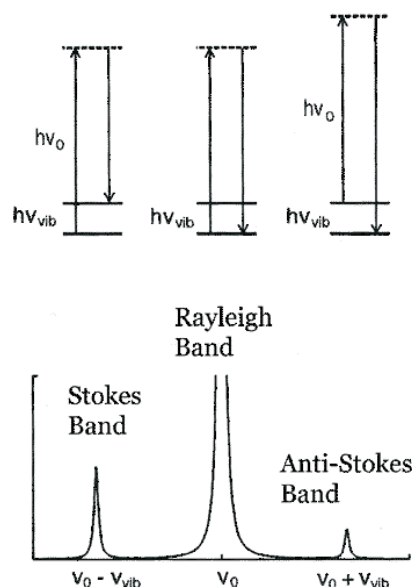


Schéma II-1: Principe de la spectroscopie Raman.

La spectroscopie Raman a fortement contribué à la compréhension des propriétés unidimensionnelles des nanotubes de carbone permettant de renseigner sur leur pureté [11].

Les nanotubes sont essentiellement caractérisés par trois régions :

- le mode de vibration radiale ou RBM (Radial Breathing Mode situé entre 100 cm^{-1} et 300 cm^{-1} , où les atomes de carbone possèdent un déplacement uniforme perpendiculairement à l'axe du tube et ce mode est situé à une fréquence ν liée au diamètre \varnothing_{NTC} des nanotubes de carbone par la relation empirique suivante [12] :

$$\nu_{\text{cm}^{-1}} = \frac{224}{d_{\text{nm}}}$$

Ce mode n'est visible que pour les tubes en conditions résonantes, quand l'énergie du laser excitateur correspond à l'énergie d'une transition entre les états électroniques associés aux maxima de la densité d'états.

- la bande D, située entre 1250 cm^{-1} et 1450 cm^{-1} , est due à la diffusion induite par le désordre structural au sein des nanotubes de carbone, ou à la présence de carbone amorphe [13]. Cette bande peut donc renseigner sur les défauts dans les nanotubes de carbone mais aussi sur les impuretés présentes dans l'échantillon. Des nanotubes parfaits auront une faible contribution dans cette zone. Elle est également observée dans le graphite, et son intensité croît d'autant plus que le désordre organisationnel du graphite augmente [14].

- le mode tangentiel noté G, situé entre 1450 cm^{-1} et 1650 cm^{-1} , est caractéristique des nanotubes de carbone puisqu'il indique la courbure des feuillets de graphène au sein de la

paroi des nanotubes. Ce mode dépend principalement de la chiralité et donc de la nature semi-conductrice ou métallique des tubes [15].

La caractérisation Raman est réalisée en collaboration avec l'Université d'Oslo sur un instrument de Spectra Physics (**Figure II-4**) avec une longueur d'onde d'excitation de 532 nm employant un laser argon ayant une puissance de 0,2 W avec un temps d'acquisition de 60 s. 90% de la raie élastique du laser est filtrée pour ne pas chauffer voire brûler les nanotubes. En effet, il est à noter que la caractérisation Raman peut être destructive si la puissance reçue par les nanotubes de carbone est très forte [16].

Ce spectromètre permet aussi de travailler en micro-Raman, c'est-à-dire d'utiliser un microscope pour n'observer qu'une petite partie d'un échantillon. Ceci permet de travailler sur des quantités très faibles d'échantillon. Les nanotubes HiPCo sont simplement déposés en poudre sur un support en platine, ne présentant pas de raies Raman, en utilisant un scotch double face. Cette caractérisation par spectroscopie Raman a été effectuée afin d'évaluer la qualité structurale des nanotubes de carbone HiPCo suite à l'étape de prétraitement.

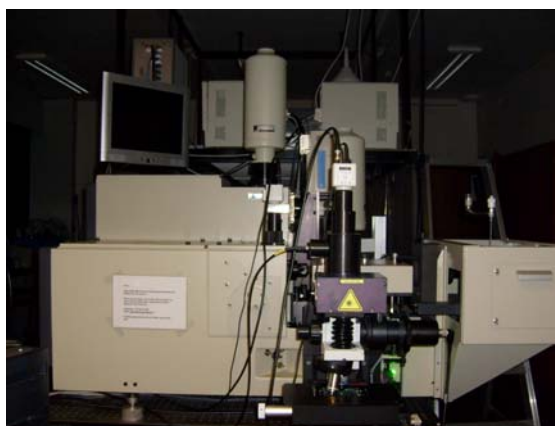


Figure II-4: Spectromètre Raman Spectra Physics (Université d'Oslo).

Sur le spectre représenté à la **Figure II-5** correspondant à une poudre de nanotubes bruts et traités, la zone des hautes fréquences comporte une bande G possédant deux pics à 1577 et à 1540 cm^{-1} qui correspondent aux modes tangentiels (bande G) représentant des élongations carbone-carbone à la surface des nanotubes dont le profil spectral est typique à celui des nanotubes semi-conducteurs. La bande D à 1340 cm^{-1} est d'intensité relativement faible. Le faible rapport des surfaces D/G, qui est de 0,038, indique une teneur peu élevée en défauts au sein des nanotubes de carbone obtenus par le procédé HiPCo et la présence limitée d'espèces carbonées secondaires. Suite à l'étape de traitement, le rapport des surfaces D/G

augmente légèrement et devient égal à 0,043 indiquant que l'étape de prétraitement n'entraîne pas de défauts structuraux significatifs au sein des nanotubes de carbone.

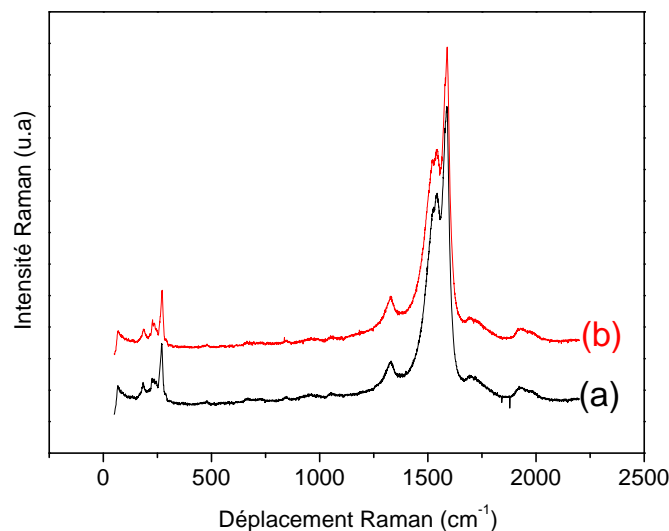


Figure II-5: Spectres Raman de nanotubes de carbone en poudre avant (a) et après (b) traitement.

On a utilisé la position des pics RBM pour déterminer les diamètres des tubes dans l'échantillon en se servant de la loi empirique. La distribution de diamètre des nanotubes HiPCo est identique pour un échantillon de nanotube avant et après l'étape de prétraitement et elle est comprise entre 0,8 et 1,2 nm ce qui est en accord avec la littérature pour les nanotubes de carbone obtenus par le procédé HiPCo [17]. Ces valeurs sont légèrement plus petites que celles des nanotubes synthétisés selon d'autres méthodes [18-20].

Le profil obtenu dans le cas des nanotubes du procédé HiPCo est particulier, large et asymétrique. Les interactions de Van der Waals induisent des variations dans les caractéristiques décrites, notamment une expression non-linéaire de la fréquence RBM en fonction du \varnothing_{NTC} [12].

Les informations apportées par la spectroscopie Raman sont en accord avec nos observations en microscopie électronique à balayage qui attestent que les nanotubes de carbone sont majoritaires et que les défauts et les espèces carbonées secondaires sont rares dans l'échantillon.

II.1.3. Caractérisation par mesure d'angle de contact

La technique de mesure de l'angle de contact est intéressante pour la caractérisation de surfaces. Elle permet de vérifier l'homogénéité d'une surface avec une bonne résolution

spatiale [21, 22] et de déterminer l'énergie libre d'adhésion entre liquides et solides exactement à leur interface d'interactions [23]. Cette technique nous renseigne sur la mouillabilité d'un substrat qui peut être caractérisée par l'angle de contact statique d'une goutte d'eau déposée à sa surface ce qui permettra de caractériser les réactions qui ont lieu au niveau des interfaces. La forme adoptée par la goutte sur le substrat est caractéristique des interactions entre l'eau, le substrat et l'atmosphère environnante. Ainsi, son profil va varier en fonction des forces d'origine moléculaire (Van der Waals, électrostatique, liaisons accepteur-donneur d'électrons) et d'origine topologique (de conformation). Je pourrai ainsi déterminer le caractère hydrophobe ou hydrophile et aboutir à la notion d'énergie libre et sa composante basique.

La technique de mouillabilité est basée sur la détermination de l'angle de raccordement à la jonction des phases solide/liquide/vapeur. Cet angle de raccordement du liquide sur le solide est déterminé par les énergies superficielles du liquide et du solide (γ_{LG} , γ_{SG}) et interfaciales (γ_{SL}) des phases en équilibre suivant la relation de Young-Dupré [24] :

$$\gamma_{LG} \cos \theta + \gamma_{SL} - \gamma_{SG} = 0$$

Avec :

γ_{SG} : la tension superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide.

γ_{SL} : l'énergie libre interfaciale entre le solide et le liquide.

γ_{LG} : la tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur.

Θ : l'angle de contact.

La relation donnée par l'équation précédente peut être représentée vectoriellement suivant le modèle de Young-Dupré comme montré au **Schéma II-2**.

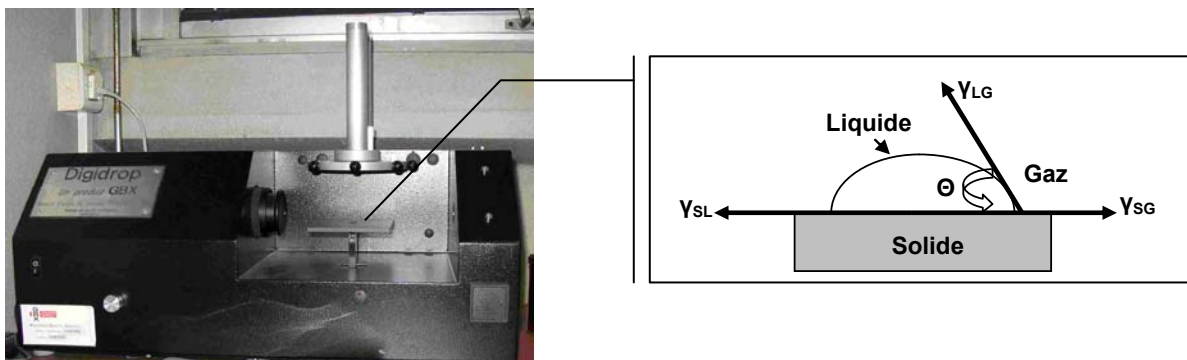


Schéma II-2: Appareil Digidrop, et principe de mesure de l'angle de mouillage d'un liquide sur une surface solide et équilibre des forces à l'interface air/liquide/solide.

Dans cette partie, nous avons vérifié l'homogénéité du dépôt des nanotubes prétraités sur la surface d'une électrode et étudié la caractérisation thermodynamique des nanotubes de carbone permettant par la suite l'élaboration du système biocapteur. Le dispositif utilisé est composé d'un appareil (Digidrop, GBX Scientific Instrument, France) et d'un système d'acquisition et d'analyse d'images. Le système GBX permet le déplacement du porte-échantillon selon l'axe vertical puis le dépôt d'un volume précis du liquide sur la surface de cet échantillon. L'image de l'évolution de 2 μ L d'une goutte déposée à l'aide d'une micro seringue est enregistrée par une caméra puis traitée pour déterminer l'angle de contact et calculer l'énergie libre de surface. La procédure de mesure est répétée plusieurs fois en différents points de l'échantillon.

Nous avons utilisé le substrat Si/SiO₂/Si₃N₄ et l'eau comme liquide sonde pour caractériser l'hydrophobicité des nanotubes de carbone. La surface de nitrure de silicium est nettoyée dans l'ordre par le trichloréthylène (15 min), l'acétone (10 min) et le 2-propanol (10 min) aux ultrasons [25]. Puis, la surface est activée par un mélange sulfochromique (H₂SO₄ + K₂Cr₂O₇) pendant 15 min, puis rincée à l'eau ultra-pure avant d'être séchée sous flux d'azote. Les structures de type Si/SiO₂/Si₃N₄ possèdent un caractère hydrophobe marqué par un angle de contact égal à 80°. Le traitement chimique a permis de rendre la surface active et hydrophile ($\theta = 6,3^\circ$). La mesure dynamique de l'angle de contact d'une surface recouverte de nanotubes de carbone (20 μ L déposée par spin coating) indique le caractère hydrophobe ($\theta = 38,5^\circ$) ce qui confirme la réussite de la phase d'accrochage et montre le caractère hydrophobe des nanotubes de carbone mono-feuillets obtenus par le procédé HiPCo (Figure II-6). L'obtention du même angle de raccordement à la jonction en différents endroits de l'échantillon atteste de l'homogénéité du dépôt à la surface du substrat.



Figure II-6 : Images d'une goutte d'eau déposée sur la surface de nitrure de silicium après traitement chimique (A) et recouverte de nanotubes de carbone (B).

Pour quantifier les propriétés énergétiques de surface relatives au dépôt de nanotubes, nous avons déterminé l'énergie de surface ainsi que sa composante basique selon le modèle de Van Oss [26, 27].

L'énergie libre de surface est une propriété intrinsèque du matériau qui contribue à l'interprétation des phénomènes interfaciaux et elle résulte des forces d'attraction et de répulsion existantes entre les matériaux présents au voisinage de la zone de séparation de chacune des phases [28, 29].

F.M. Fowkes a proposé que la tension de surface d'un liquide polaire, ou l'énergie libre de surface d'un solide polaire, soit décomposée de la façon suivante [30] :

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^i + \gamma^p + \gamma^{ad} + \gamma^h + \gamma^e$$

Avec :

γ : tension de surface du liquide ou l'énergie libre de surface.

γ^d : composante due à la dispersion.

γ^i : composante due aux interactions dipôle-dipôle induites

γ^p : composante due aux interactions dipôle-dipôle.

γ^{ad} : composante due aux interactions accepteur-donneur d'électrons.

γ^h : composante due aux liaisons hydrogènes

γ^e : composante due aux interactions électrostatiques.

Selon C.J.Van Oss *et al.*, les trois premiers termes peuvent être combinés dans la composante de Lifshitz Van der Waals [31] :

$$\gamma^{lw} = \gamma^d + \gamma^i + \gamma^p$$

Dans notre cas, nous supposons qu'il n'y a pas d'interactions électrostatiques. Dans le modèle développé par Good et Van Oss, l'énergie de surface est alors la somme de deux composantes, la composante dispersive de Lifshitz et la composante polaire décrite à l'aide du modèle acide/base de Lewis. L'énergie libre de surface d'un solide, ou la tension de surface d'un liquide, s'écrit alors:

$$\gamma = \gamma^{lw} + \gamma^{ab}$$

Avec γ^{ab} : la composante acido-basique de l'énergie de surface.

Selon Van Oss *et al.*, cette composante acido-basique peut s'exprimer en fonction de deux paramètres non additifs : la tension de surface accepteuse d'électrons (γ^+ , composante acide de l'énergie de surface) et la tension de surface donneuse d'électrons (γ^- , composante basique de l'énergie de surface) qui résultent respectivement des interactions des accepteurs et des donneurs d'électrons. Ainsi, la composante polaire est proportionnelle à la racine carrée du produit de la composante acide et de la composante basique. Nous avons alors la relation suivante :

$$\gamma^{ab} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$$

L'expression de l'énergie libre de surface d'un solide s'écrit alors:

$$\gamma = \gamma^{LW} + 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$$

En déposant une goutte de trois liquides différents dont les composantes dispersives et polaires sont connues, on peut obtenir l'énergie de surface du solide. Les trois liquides sondes utilisés sont, le diiodométhane (solvant apolaire), le formamide (solvant polaire) et l'eau (solvant polaire) avant et après le dépôt des nanotubes de carbone sur la surface de la couche de nitrure de silicium.

Le logiciel Windrop 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. Ce logiciel utilise les méthodes d'interpolation par polynôme ou par arcs de cercles pour déterminer l'angle de contact. A l'issue des mesures, le logiciel calcule les différentes composantes associées au modèle de Good Van Oss utilisant les trois liquides sondes différents, et assimile les interactions polaires à des interactions accepteur-donneur d'électrons.

Le **Tableau II-1** donne la mouillabilité des surfaces suite à l'étape de nettoyage puis suite au dépôt des nanotubes de carbone. La surface de nitrure de silicium possède une composante basique de 54,7 mJ m⁻². Après dépôt des nanotubes, la composante basique diminue (31,6 mJ m⁻²) ce qui peut être expliqué par la présence de défauts sur les nanotubes de carbone à savoir des groupements carbonyles, carboxyles et hydroxyles.

La caractérisation des surfaces par mesure d'angle de contact nous a permis de vérifier d'une part l'homogénéité de notre dépôt de nanotube de carbone et d'autre part de déterminer le caractère thermodynamique des nanotubes de carbone mono-feuillets utilisés.

Tableau II-1 : *Energie de surface et ses composantes selon le modèle de Van Oss pour une électrode nettoyée puis recouverte de nanotubes de carbone.*

| Electrode | Θ_{Eau} (°) | Θ_{Form} (°) | Θ_{Diiod} (°) | Energie (mJ m ⁻²) | γ_{OH^-} (mJ m ⁻²) |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>Si₃N₄ nettoyé</i> | 6,3 | 6,3 | 34,6 | 56,5 | 54,7 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT prétraités</i> | 38,5 | 17,5 | 40,9 | 55,4 | 31,6 |

II.2. Caractérisation électrochimique des dépôts de nanotubes

La caractérisation électrochimique des films de nanotubes de carbone déposés sur une électrode est une étape importante avant son utilisation comme matériau de biocapteurs. Il est nécessaire de connaître la surface active suite aux dépôts de nanotubes. Il sera aussi intéressant de connaître l'apport de ce nano-matériau sur l'oxydation de l'eau oxygénée.

II.2.1. Effet des nanotubes sur le potentiel d'oxydation

Afin de connaître l'influence des nanotubes de carbone sur le phénomène de diffusion à travers l'électrode, nous avons utilisé la voltampérométrie sur électrode tournante. Dans ce travail, les mesures sont réalisées avec un potentiostat (Autolab, PGSTAT 100) dans une cellule à trois électrodes ; une électrode de travail (carbone vitreux) de 5 mm de diamètre connectée à un contrôleur de vitesse type EDI 101 T, une électrode auxiliaire en platine et une électrode de référence au calomel saturée (ECS). L'électrolyte support utilisé est un tampon phosphate à pH 7 + 0,1 M LiClO₄ contenant l'hydroquinone (2 mM) comme sonde rédox. L'enregistrement des voltampérogrammes de l'électrode nue et de l'électrode recouverte par les nanotubes de carbone (3x20 µL) est réalisé pour une vitesse de rotation de l'électrode de 200 rpm et une vitesse de balayage de 10 mV s⁻¹.

Le voltampérogramme obtenu sur une électrode recouverte de nanotubes de carbone prétraités est comparé à celui de l'électrode nue. Suite au dépôt de nanotubes de carbone, on observe pour une même vitesse de rotation (200 rpm) une augmentation du courant limite et une perte de réversibilité du signal (**Figure II-7**). En effet, le potentiel d'oxydation de l'hydroquinone passe de 0,26 V à 0,39 V. Ceci peut être expliqué par un transfert différent d'électrons. Ces résultats attestent le succès de la phase d'accrochage des nanotubes à la surface de l'électrode via la modification du comportement électrochimique.

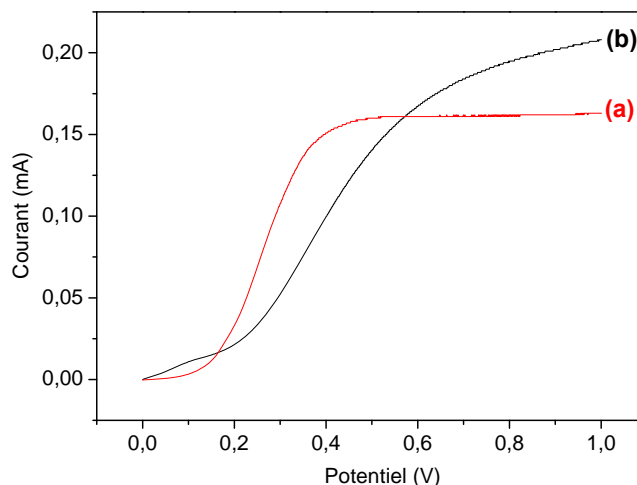
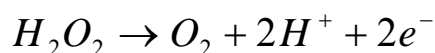


Figure II-7: Voltampérogrammes enregistrés sur une électrode de carbone vitreux nue (a) et fonctionnalisée par SWCNT (b) plongée dans une solution tampon phosphate 0,1 M (pH 7) contenant de l'hydroquinone (2 mM). $V=10 \text{ mV s}^{-1}$.

II.2.2. Influence des nanotubes de carbone sur l'oxydation du H_2O_2

La réponse des biocapteurs ampérométriques à base d'enzymes oxydases est dépendante de l'oxydation de H_2O_2 enzymatiquement généré. L'eau oxygénée est oxydée en O_2 à la surface de l'électrode de platine à 0,6 V vs ECS. L'intensité du courant d'oxydation est proportionnelle à la concentration en H_2O_2 et donc à la concentration en glucose. Le principe de fonctionnement du biocapteur à glucose à base de glucose oxydase est le suivant :



Puisque la réponse du biocapteur est due à l'oxydation de H_2O_2 à la surface du platine, nous nous proposons de déterminer l'influence des nanotubes de carbone déposés sur une électrode de platine sur l'oxydation électrochimique du peroxyde d'hydrogène. Cette étude permettra aussi de vérifier si le film de nanotubes de carbone permet sa diffusion jusqu'à l'électrode.

Afin d'estimer l'influence des nanotubes de carbone sur les performances d'une électrode de platine vis-à-vis de H_2O_2 , la réponse d'une électrode de platine nue a été comparée à celle d'une électrode recouverte de nanotubes de carbone dans un tampon phosphate (0,1 M) à pH 7 à un potentiel de 0,6 V. La **Figure II-8** montre la courbe d'étalonnage du courant anodique en fonction de la concentration du peroxyde d'hydrogène.

Il apparait clairement que le dépôt de nanotubes de carbone entraîne une augmentation de + 51% de la sensibilité à H_2O_2 , soit 99 et 150 $mA M^{-1}$ pour, respectivement, l'électrode de platine nue et l'électrode de platine recouverte de SWCNTs. Cette augmentation peut être due à un effet électro-catalytique des particules de fer incorporées lors de la synthèse des nanotubes par le processus HiPCo [32, 33].

Une autre façon d'interpréter ce résultat est de considérer que les nanotubes de carbone facilitent et accélèrent la désorption du O_2 libéré, ce qui augmente le nombre de sites disponibles sur l'électrode facilitant ainsi l'oxydation et donc le transfert d'électrons.

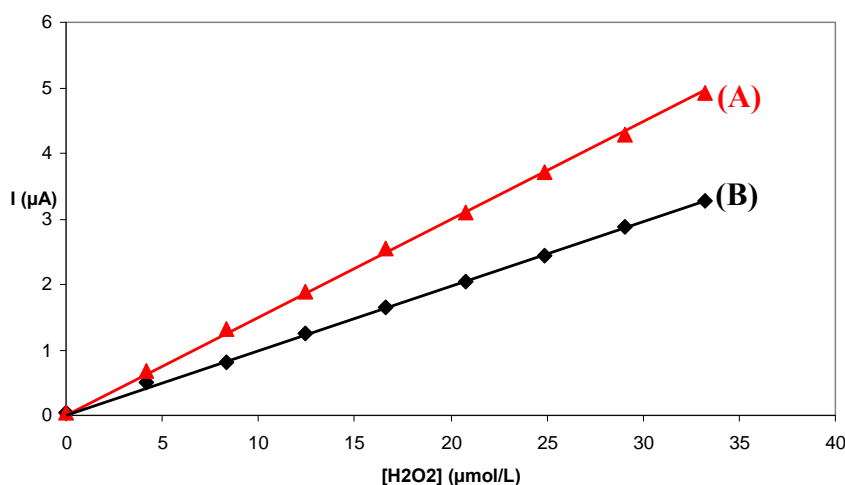


Figure II-8: Evolution du courant en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène Pour une électrode de Pt/SWCNT (A), et Pt nue (B).

Conclusion

La caractérisation des nanotubes de carbone suite à l'étape de prétraitement chimique nous a permis de vérifier la conservation de leurs propriétés. Notre technique permet de préserver la structure des nanotubes et d'obtenir des dépôts homogènes et stables à la surface des électrodes. Par ailleurs, la compréhension du comportement des nanotubes sur une électrode s'avère fondamental dans l'analyse des résultats obtenus lors de la conception des biocapteurs.

Références bibliographiques du chapitre II

- [1] Inpil Kang, Yun Yeo Heung, Jay H.Kim, Jong Won Lee, Ramanand Gollapudi, Srinivas Subramaniam, Suhasini Narasimhadevara, Douglas Hurd, Goutham R.Kirikera, Vasselin Shanov, Mark J.Schulz, Donglu Shi, Jim Boerio, Shankar Mall, Marina Ruggles-Wren, *Composites B*, **2006**, 37, 382
- [2] S. Niyogi, M. A. Hamon, H. Hu, B. Zhao, P. Bhowmik, R. Sen, M. E. Itkis, R. C. Haddon, *Accounts of Chemical Research*, **2002**, 35, 1105
- [3] O. Matarredona, H. Rhoads, Z. Li, J. H. Harwell, L. Balzano, D. E. Resasco, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 13357
- [4] M. F. Islam, E. Rojas, D. M. Bergey, A. T. Johnson, A. G. Yodh, *Nano Letters.*, **2003**, 3, 269
- [5] W. Wenseleers, I. I. Vlasov, E. Goovaerts, E. D. Obraztsova, A. S. Lobach, A. Bouwen, *Advanced Functional Materials*, **2004**, 14, 1105
- [6] Ignac Capek, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2009**, 150, 63
- [7] R. Haddad, S. Cosnier, A. Maaref, M. Holzinger, *Analyst*, **2009**, 134, 2412
- [8] R. Haddad, S. Cosnier, A. Maaref, M. Holzinger, *Sensor Lett.*, **2009**, 7, 801
- [9] Dhriti Nepal, Dong Sik Kim, Kurt E.Geckeler, *Carbon*, **2005**, 43, 651
- [10] Jinyoung Li, Yafei Zhang, *Physica E*, **2005**, 28, 309
- [11] Anthony W.Musumeci, Eric R.Waclawik, Ray L.Frost, *Spectrochimica Acta A*, **2008**, 71, 140
- [12] S. Rols, A. Righi, L. Alvarez, E. Anglaret, R. Almairac, C. Journet, P. Bernier, J.L. Sauvajol, A.M. Benito, W.K. Maser, E. Munoz, M.T. Martinez, G.F. de la Fuente, A. Girard, J.C. Ameline, *European Physical Journal B : Condensed Matter Physics*, **2000**, 18, 201
- [13] S. D. M. Brown, A. Jorio, M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, *Physical Review B : Condensed Matter and Materials Physics*, **2001**, 64, 073403-1
- [14] K. Nakamura, M. Fujitsuka, M. Kitajima, *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics*, **1990**, 4, 12260
- [15] S.D.M. Brown, A. Jorio, P. Corio, M.S. Dresselhaus, R. Saito et K. Kneipp. *Physical Review B : Condensed Matter and Materials Physics*, **2001**, 63, 155414/1

- [16] V.A.Karachevtsev, A.Yu.Glamazda, U.Dettlaff-Weglikowska, V.S.Kurnosov, E.D.Obraztsova, A.V.Peschanskii, V.V.Eremenko, S.Roth, *Carbon*, **2003**, 41, 1567
- [17] Belinda I.Rosario-Castro, Enid J.Contés, Marisabel Lebron-Colon, Michael A.Meador, germarie Sanchez-Pomales, Carlos R.Cabrera, *Materials characterization*, **2009**, 60, 1442
- [18] M.Lamy de la Chapelle, S.Lefrant, C.Journet, W.Maser, P.Bernier, A.Loiseau, *Carbon*, **1998**, 36, 705
- [19] A.M.Rao, S.bandow, E.Richter, P.C.Eklund, *Thin Solid Films*, **1998**, 331, 141
- [20] Takashi Uchida, Masaya Tazawa, Hiroshi Sakai, Akira Yamazaki, Yoshihiro Kobayashi, *Applied Surface Science*, **2008**, 254, 7591
- [21] Yong Cheol Hong, Dong Hun Shin, Han Sup Uhm, *Surface and coatings technology*, **2007**, 201, 5025
- [22] R.Kannan, D.Sivakumar, *Colloids and surfaces A : Physicochem.Eng.Aspects*, **2008**, 317, 694
- [23] Minglin Ma, Randal M.Hill, *Current Opinion in colloid and interface science*, **2006**, 11, 193
- [24] C.J.Van Oss, W.Wu, R.F.Giese, J.O.Naim, *Colloids and surfaces B : Biointerfaces*, **1995**, 4, 185
- [25] H. Barhoumi, A. Maaref, S. Cosnier, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *ITBM-RBM*, **2008**, 29, 192
- [26] C.J.Van Oss, L.Ju, M.K. Chaudhury, R.J. Good., *Journal of Colloid and Interface Science*, **1989**, 128, 313-319
- [27] C.J.Van Oss, M.K.Chaudhury, et R.J.Good, *Separation Sciences Technology*, **1989**, 24, 15
- [28] C.J.Van Oss, *Colloids and Surfaces A : Physiochemical and Engineering Aspects*, **1993**, 78, 1
- [29] W.Wu, R.F.Giese, Jr, C.J.Van Oss, *Powder Technology*, **1996**, 89, 129
- [30] F.M. Fowkes, *Industrial Engineering and Chemistry*, **1964**, 56, 40
- [31] C.J.Van Oss, R.J. Good, H.J. Busscher., *Journal of Dispersion Sciences Technology*, **1990**, 11, 75
- [32] Y. Chen, Z. Iqbal, and S. Mitra, *Advanced Functional Materials*, **2007**, 17, 3946
- [33] Jaanus Kruusma, Vaino Sammelselg, Craig E.Banks, *Electrochemistry communications*, **2008**, 10, 1872

Chapitre III :

*Biocapteurs à glucose à
base de nanotubes de
carbone et de poly(pyrrole-
biotine)*

Chapitre III

Biocapteurs à glucose à base de nanotubes de carbone et de poly(pyrrole-biotine)

Introduction

Une grande attention est portée actuellement sur la recherche de nouvelles stratégies d'immobilisation des enzymes et d'amélioration des performances des biocapteurs. La phase critique est l'optimisation des protocoles d'immobilisation sans que l'activité biologique ne soit altérée. Parmi les techniques d'immobilisation les plus répandues, les polymères conducteurs ont particulièrement connu un essor important ces vingt dernières années grâce à leurs propriétés mécaniques et électroniques [1-9]. Les électrodes modifiées par ces polymères ont permis le développement de procédures analytiques utilisant des réactifs immobilisés permettant de former des multicouches d'espèces actives à leurs surfaces [10] ainsi qu'un contrôle des propriétés physiques et chimiques de l'interface électrode/électrolyte [11, 12]. C'est pour ces raisons que, depuis quelques années, de nombreux laboratoires se sont tournés vers les techniques d'électro-polymérisation pour former des couches minces. Cette orientation s'est focalisée sur plusieurs familles de polymères conducteurs [13-16] et plus particulièrement les poly(pyrroles) grâce à leur grande stabilité et leur haute biocompatibilité non dénaturante qui a été largement utilisée pour l'immobilisation de biomolécules. Des travaux de recherche ont été focalisés sur la fixation de biomolécules sur des films de polypyrrole en utilisant des systèmes d'affinité [17-38]. D'autres travaux se sont orientés sur la fixation de médiateurs rédox favorisant la reconnaissance biologique [39-44], ou la fixation de catalyseurs [45,46]. La fixation covalente directe de molécules biologiques sur des films de

polypyrrole a également fait l'objet de nombreux travaux [47-51]. Les études effectuées ont montré que la structure, le nombre d'unités monomères de la couche de polymère formée ainsi que son épaisseur, peuvent être contrôlés en faisant varier les grandeurs électrochimiques imposées et les conditions d'électropolymérisation [52-56].

Eu égard à l'intérêt suscité par les nanotechnologies, notre travail s'est focalisé sur le couplage de nanomatériau et des polymères conducteurs, pour la réalisation de bio-assemblages plus performants. Notre ambition est principalement de développer des stratégies innovantes pour la conception d'architectures tridimensionnelles basées sur le polypyrrole et les nanotubes de carbone monofeuillets (SWCNTs). Ces derniers présentent des potentialités prometteuses pour la construction d'édifices supramoléculaires en raison de leurs différents atouts à savoir une surface spécifique remarquable [57], et des propriétés électriques [58, 59] et mécaniques exceptionnelles [60, 61].

Nous décrivons dans ce chapitre la fonctionnalisation d'électrodes à base de nanotubes de carbone par un film de poly(pyrrole-biotine) afin de concevoir un biocapteur à glucose. La réponse ampérométrique de ce biocapteur à base de glucose oxydase est due à l'oxydation électrochimique de H_2O_2 enzymatiquement généré en présence de glucose et de O_2 . Cette oxydation intervient principalement à la surface de l'électrode de platine puisque les nanotubes n'entraînent pas d'amélioration significative de la réponse à l'eau oxygénée comme montré au **Chapitre II**. Nous avons utilisé les propriétés des nanotubes de carbone pour augmenter la surface spécifique de l'électrode susceptible d'immobiliser la glucose oxydase afin d'aboutir à un biocapteur plus performant. J'ai utilisé ici le système d'affinité entre l'avidine et la biotine. L'enzyme (la glucose oxydase biotinylée) est fixée à la surface de l'électrode préalablement fonctionnalisée par un film de poly(pyrrole-biotine) grâce à une couche intermédiaire d'avidine. Une optimisation du nombre de couches de nanotubes de carbone ainsi qu'un contrôle de la structure tridimensionnelle ont été effectués.

I. Synthèse du motif monomère, le pyrrole-biotine : biotinoate de 11-pyrrole undecyle (biotin-11-pyrrol-1-yl-undecyl ester)

La synthèse de l'ester biotinoate de 11-pyrrole undecyle a été effectuée en utilisant la même procédure que celle décrite par *Cosnier et al.* [61-64] :

Un mélange de biotine (500 mg ; 2 mmol), de 11-(1-pyrrolyl)undécanol (208 mg ; 1,66 mmol), de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide DCC (413 mg ; 2 mmol) et de

diméthylaminopyridine DMAP (81 mg ; 0,66 mmol) dans du dichlorométhane CH_2Cl_2 anhydre est maintenu sous atmosphère d'argon pendant six jours, à température ambiante, puis le mélange est filtré. La phase organique est ensuite évaporée et le résidu est lavé avec du Et_2O . Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (95 : 5). La recristallisation à partir du $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ conduit à un produit pur (**Schéma III-1**). Le rendement de la réaction est de 60%.

La caractérisation par RMN du proton donne les résultats suivants :

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δppm = 6.27 (m, 2 H, **23 et 26**), 5.75 (m, 2 H, **24 et 25**), 5.4 (s, 1 H, **2**), 5.1 (s, 1 H, **1**), 4.13 (m, 1 H, **4**), 3.95 ppm (m, 1 H, **3**), 3.68 ppm (t, 2 H, **12**), 3.48 ppm (t, 2 H, **22**), 2.78 ppm (td, 1 H, **7**), 2.54 ppm (dd, 1 H, **6**), 2.39 ppm (d, 1 H, **5**), 1.95 ppm (t, 2 H, **11**), entre 0.9 et 1.5 ppm (m, 24 H, **8-10 et 13-21**),.

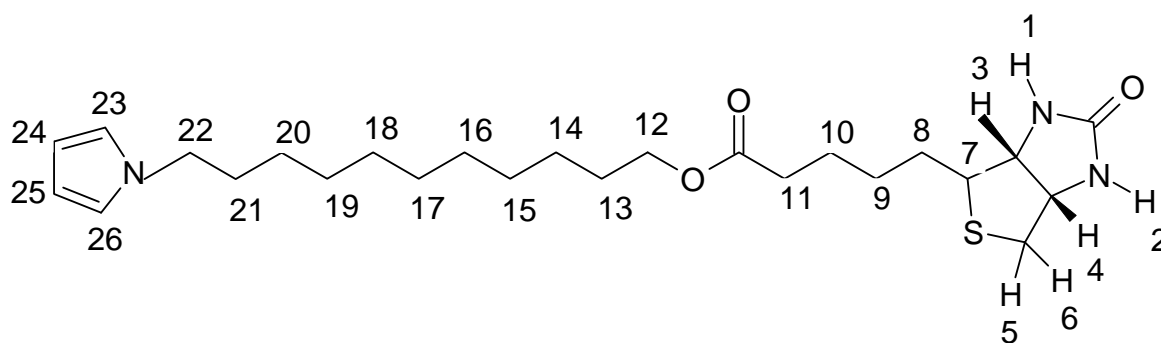


Schéma III-1: Structure Chimique du pyrrole-biotine.

II. Electropolymérisation du pyrrole-biotine

La synthèse électrochimique des polymères est réalisée par le mode potentiostatique (potentiel anodique constant qui correspond à l'oxydation du monomère) ou par balayage de potentiel : le monomère s'oxyde à un potentiel donné pour produire un radical cationique qui réagit avec les autres radicaux pour former un film d'épaisseur contrôlé. Ces films présentent généralement une bonne adhérence et homogénéité, ainsi qu'une grande stabilité et un nombre important de sites actifs disponibles. L'oxydation des polymères conducteurs conduit à la formation d'un radical cation délocalisé sur plusieurs unités de monomères. Pour le polypyrrole, il y a d'abord formation d'un polaron, puis d'un bipolaron (délocalisation de deux charges sur le segment de polymère). Les charges sont ensuite délocalisées sur tout le polymère [65]. Le mécanisme d'électrosynthèse du polypyrrole, décrit dès 1979 par Diaz *et al.* [66] fait intervenir un radical lors de la croissance du polymère. La réaction débute par un transfert électronique suivi par une succession de réactions chimiques et de transferts

électroniques [67-70]. A la surface de l'électrode, le monomère est oxydé en un radical cation avec départ d'un électron du doublet électronique de l'azote. Le couplage radicalaire, suivi de l'élimination de 2 protons, conduit au dimère du pyrrole. Pour la seconde étape, d'autres auteurs font le postulat d'une attaque électrophile d'un radical cation sur une unité monomère [71]. La réaction se poursuit par une déprotonation du dimère, qui permet sa réaromatisation. Après des multiples itérations, nous nous retrouvons en présence de filaments de polypyrrole enchevêtrés. La longueur de l'oligomère formé augmente, devenant insoluble à partir d'une certaine longueur de chaîne et précipite alors sur la surface de l'électrode [72, 73]. Le taux de dopage (degré d'oxydation moyen fractionnaire) déterminé grâce à la présence des ions dopants est compris entre 0,25 et 0,33 pour le polypyrrole [74]. Ces valeurs correspondent à une charge positive délocalisée pour trois ou quatre cycles pyrrole. Chaque charge positive est compensée par celle d'un anion de l'électrolyte support afin de maintenir l'électroneutralité du film. Le mécanisme d'électro-polymérisation du pyrrole est représenté au **Schéma III-2**.

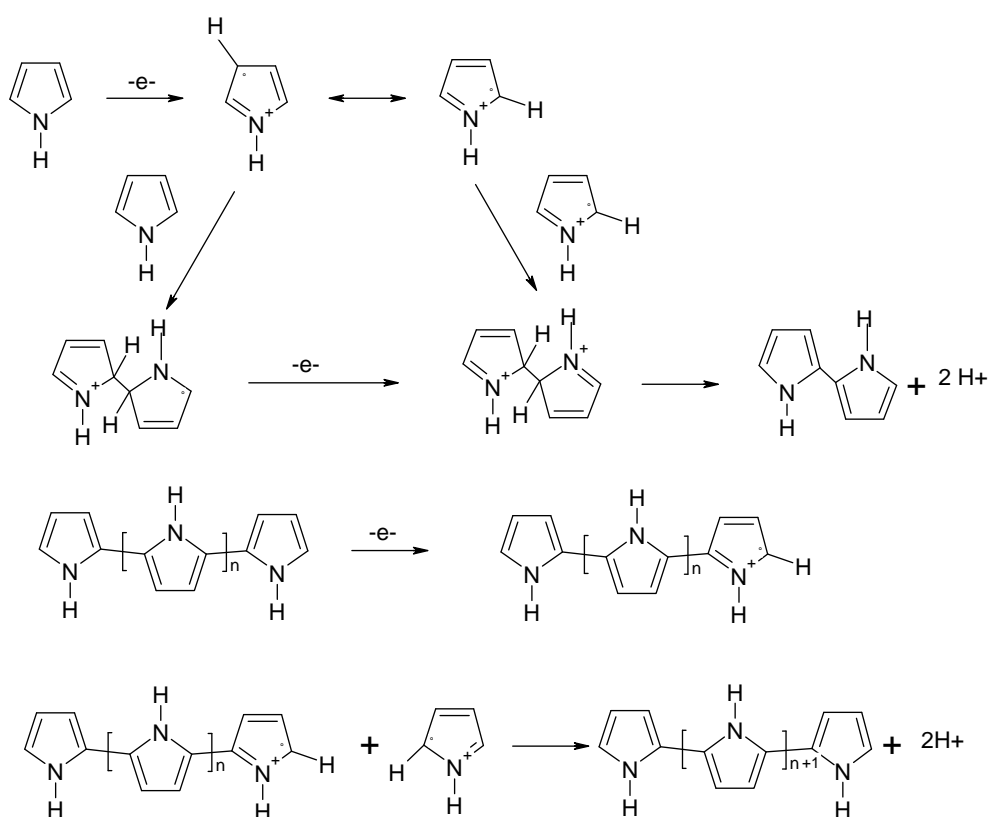


Schéma III-2 : Mécanisme d'électro-polymérisation du pyrrole.

Comme nous avons greffé des substituants biotine sur le noyau pyrrolique, nous nous proposons d'étudier les conséquences de ce greffage sur les propriétés électroactives du

monomère pyrrole. Nous avons vérifié que le motif biotine n'empêche pas la polymérisation du pyrrole à cause de sa taille ou de ses propriétés physico-chimiques. En effet, la conductivité du film électrogénéré doit être suffisante pour que la réaction de polymérisation puisse se poursuivre et que la croissance du film ne soit pas limitée aux très faibles épaisseurs. Il a été rapporté que les polymères de pyrroles-N substitués par des groupes alkyles sont 10^5 à 10^8 fois moins conducteurs que le polypyrrole non substitué. Cette diminution est probablement due à la non-planéité des chaînes de polymères et à une cinétique de polymérisation plus lente [75-78].

Les différents modes d'influence des substituants peuvent être classés en deux catégories : les effets stériques [79-81] et les effets électroniques [82].

Les films de polypyrrole non fonctionnalisés peuvent subir des cycles d'oxydo-réduction [83], passant de l'état neutre à l'état conducteur (Figure III-1). Le pic d'oxydation du polymère apparaît au potentiel $E_a = +0,2$ V. En revanche, en allant vers des potentiels plus positifs, un large pic irréversible de suroxydation est observé entraînant la perte de l'électroactivité du polypyrrole.

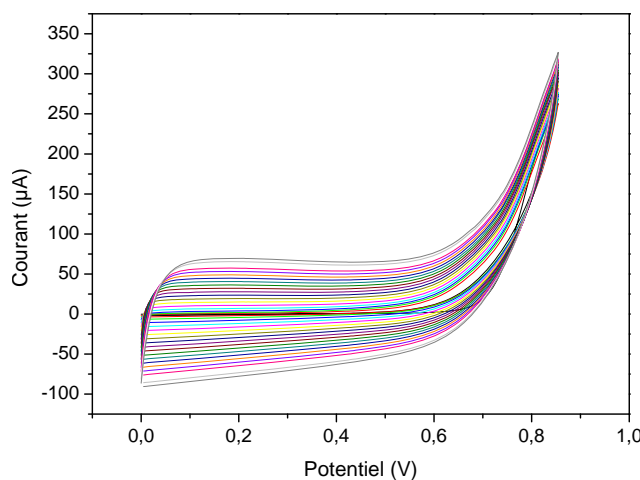


Figure III-1: Voltampérogrammes de l'électro-polymérisation du pyrrole (2,2 mM) par balayage successif de potentiel sur électrode de platine nue entre 0 et 0,85 V par rapport à 10 mM Ag^+/Ag dans $CH_3CN + TBAP$ (0,1 M). $V=100$ mV s^{-1} .

On a effectué des courbes voltampérométriques du pyrrole N-substitué par les groupements biotine afin de comparer les valeurs des potentiels redox et de déceler l'effet des biotines sur le processus d'électro-polymérisation. Pour assurer la conductivité ionique du milieu d'électro-polymérisation, un électrolyte support contenant des anions inorganiques de petite taille (ClO_4^-) est ajouté au solvant. La Figure III-2 montre l'électropolymérisation du pyrrole-biotine sur une électrode de platine nue par balayage successif de potentiel entre 0 et

0,8 V. On constate une augmentation continue des pics anodique et cathodique du système réversible du polypyrrole. Ceci indique la formation d'un film électrogénéré à la surface de l'électrode. Le voltampérogramme présente un pic d'oxydation à 0,33 V et un pic de réduction à 0,26 V dus respectivement à l'oxydation et la réduction du poly(pyrrole-biotine). Comme attendu pour les pyrroles N-substitués [83-85], l'électroactivité du poly(pyrrole-biotine) est nettement plus anodique que celle du polypyrrole non fonctionnalisé. Par ailleurs, l'effet électronique attracteur de la biotine et sa faible solubilité ralentissent le processus d'électro-polymérisation.

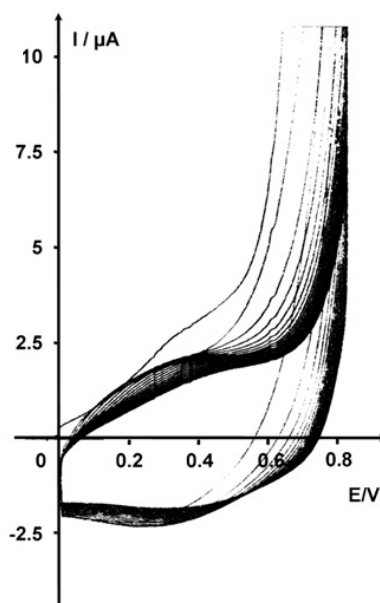


Figure III-2: Voltampérogrammes de l'électro-polymérisation du pyrrole-biotine par balayage successif en potentiel sur électrode de platine nue entre 0 et 0,85 V par rapport à 10 mM Ag⁺/Ag dans CH₃CN + TBAP (0,1 M).

Le contrôle de l'épaisseur des films de polypyrrole et de poly(pyrrole-biotine) est possible par polymérisation par électrolyse au potentiel imposé de 0,85 V, considéré comme le potentiel optimum pour l'électropolymérisation du pyrrole biotine [84], en intégrant la charge anodique.

Le rendement électrique du processus d'électro-polymérisation du pyrrole et du poly(pyrrole-biotine) sur l'électrode de platine peut être déterminé par l'équation suivante:

$$\eta = \frac{\Gamma_{réel}}{\Gamma_{théorique}} \times 100$$

Pour cela, nous devons avoir accès aux taux de recouvrement réel ($\Gamma_{\text{réel}}$) et théorique ($\Gamma_{\text{théorique}}$) du polymère. Le taux de recouvrement théorique est défini par la quantité d'électricité utilisée lors de la polymérisation ($Q_{\text{mesurée}}$) :

$$\Gamma_{\text{théorique}} (\text{mol.cm}^{-2}) = \frac{Q_{\text{mesurée}} (\text{C})}{n' F (\text{Cmol}^{-1}) S (\text{cm}^2)}$$

Où n' : nombre d'électrons nécessaires à la polymérisation (2,33 soit 2 électrons par monomère pour la polymérisation, et 0,33 électrons par monomère pour l'oxydation du film formé)

F : constante de Faraday

S : surface de l'électrode

Le taux de recouvrement réel de l'électrode est obtenu à partir de l'électroactivité du polypyrrole en intégrant ce signal en voltampérométrie cyclique pour chaque électrode après leur transfert dans un électrolyte exempt de monomère.

$$\Gamma_{\text{réel}} (\text{mol.cm}^{-2}) = \frac{Q_{\text{intégré}} (\text{C})}{nF (\text{Cmol}^{-1}) S (\text{cm}^2)}$$

Où :

$Q_{\text{intégré}}$: quantité d'électricité intégrée sous le signal du poly(pyrrole-biotine)

n : nombre d'électrons échangés par le système (0,33)

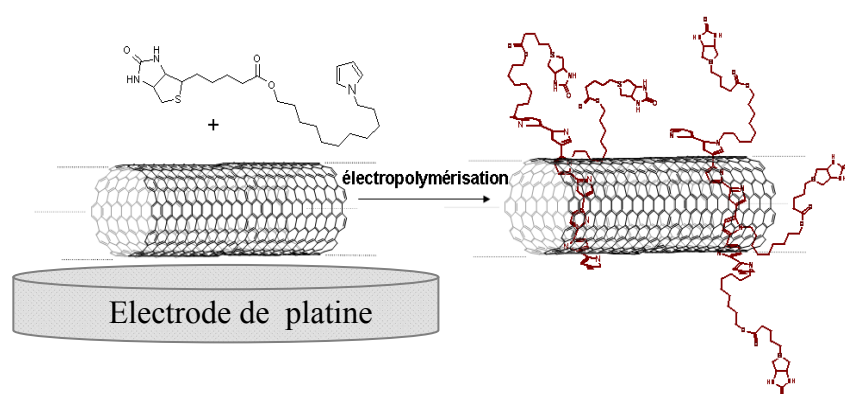
Les électrolyses sont effectuées au potentiel contrôlé de 0,85 V jusqu'à l'obtention d'une charge anodique ($Q_{\text{mesurée}}$) de 0,5 mC pour une électrode de platine ayant 5 mm de diamètre. Le **Tableau III-1** regroupe les différents résultats obtenus lors de l'électro-polymérisation du pyrrole et du pyrrole biotine.

Ce résultat (14%) est similaire à ceux déjà obtenus pour des films de polypyrrole N-substitués par des groupements organiques ou organo-métalliques [85, 86].

Tableau III-1: Electropolymérisation du pyrrole et du pyrrole-biotine dans l'acétonitrile + 0,1 M TBAP sur électrode de platine (5 mm de diamètre) à potentiel contrôlée ($E=0,85$ V)

| | $Q_{\text{polymérisation}}$ (C) | $Q_{\text{intégrée}}$ (C) | $\Gamma_{\text{réel}}$ (mol cm^{-2}) | $\Gamma_{\text{théorique}}$ (mol cm^{-2}) | η (%) |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------|
| Polypyrrole | $5 \cdot 10^{-4}$ | $3,25 \cdot 10^{-5}$ | $5,2 \cdot 10^{-9}$ | $11,32 \cdot 10^{-9}$ | 46 |
| Poly(pyrrole-biotine) | $5 \cdot 10^{-4}$ | $9,91 \cdot 10^{-6}$ | $1,58 \cdot 10^{-9}$ | $11,32 \cdot 10^{-9}$ | 14 |

Une stratégie a consisté à réaliser des copolymères polypyrroliques afin de faciliter l'électropolymérisation du pyrrole-biotine. Ainsi l'association du pyrrole-biotine et d'un autre monomère plus hydrophile, tel que le pyrrole-lactobioamide [87], ou ayant des capacités d'électropolymérisation plus importantes en formant des complexes tris bipyridine-pyrrole de ruthénium (II) [85], a permis, à partir de ces mélanges, des polymérisations beaucoup plus faciles. Des travaux ont été aussi effectués en électropolymérisant du pyrrole sur des nanotubes de carbone [88-90]. Pour ma part, je me suis intéressée à améliorer la conductivité du poly(pyrrole-biotine) et donc à la polymérisation du monomère en électropolymérisant du pyrrole-biotine sur des dépôts de $3 \times 20 \mu\text{L}$ de la dispersion de nanotubes de carbone sur une électrode de platine selon le protocole indiqué au Chapitre II (Schéma III-3).

**Schéma III-3:** Présentation schématique de la fonctionnalisation des SWCNTs par électropolymérisation du pyrrole-biotine.

Les balayages successifs de potentiel entre 0 et 0,6 V entraînent une augmentation continue des pics anodiques et cathodiques (Figure III-3-A). On constate, néanmoins, que les SWCNTs induisent l'apparition d'un second système réversible à 0,075 V. Ce dernier est

probablement dû à une modification de l'électroactivité d'une partie du film par les nanotubes de carbone [91].

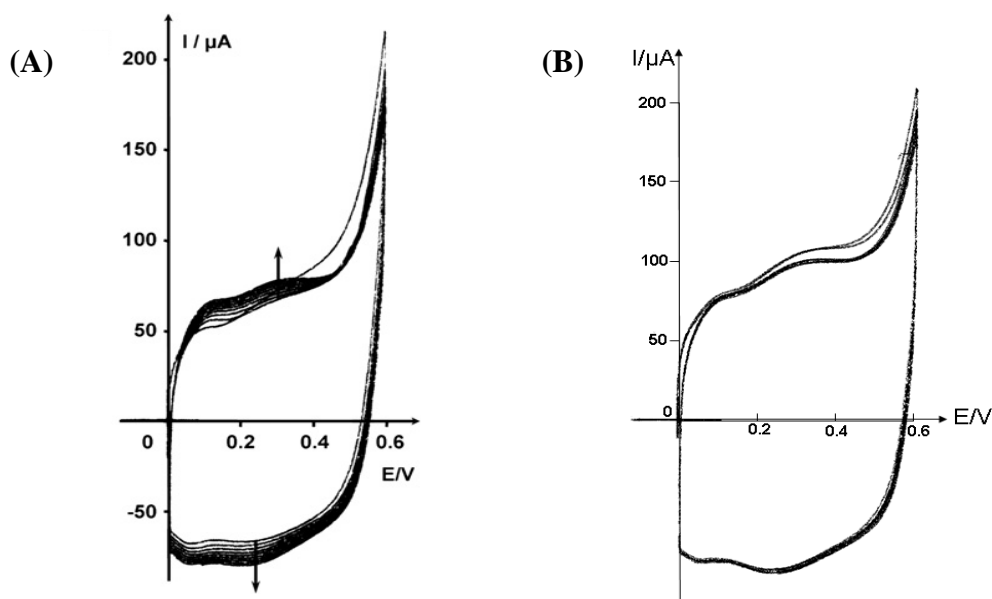


Figure III-3: (A) Electro-polymérisation du pyrrole-biotine (2 mM dans CH_3CN + 0,1 M TBAP) par balayage successif en potentiel entre 0 et 0,6 V vs 10 mM Ag^+/Ag sur l'électrode Pt/SWCNT (3x20 μL). (B) Caractérisation par voltampérométrie cyclique de l'électrode modifiée dans CH_3CN exempt de monomère.

Bien que le courant capacitif de l'électrode Pt/SWCNT soit évidemment important, une nette augmentation du courant d'oxydation (x 50) et du courant de réduction (x 42) liés à l'apparition du signal du polypyrrole est observée par rapport à l'électro-polymérisation du pyrrole-biotine sur une électrode de platine nue (Tableau III-2). Ceci indique le rôle bénéfique des nanotubes lors du processus d'électro-polymérisation en termes de conductivité et d'augmentation de la surface. Après transfert dans une solution exempte de monomère, le voltampérogramme de l'électrode Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine) exhibe l'électroactivité du polypyrrole, démontrant ainsi la bonne stabilité des SWCNTs adsorbés à la surface de l'électrode (Figure III-3-B).

Tableau III-2: Comparaison des courants et des potentiels d'oxydation et de réduction du poly(pyrrole-biotine) lors de l'électro-polymérisation sur une électrode de platine nue et sur Pt/SWCNT

| | Poly(pyrrole-biotine) sur Pt | Poly(pyrrole-biotine) sur Pt/SWCNT |
|------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| $E_{\text{oxydation}}$ | 0,33 V | 0,1375 V 0,325 V |
| $I_{\text{oxydation}}$ | 1,92 μA | 76,92 μA 96,15 μA |
| $E_{\text{réduction}}$ | 0,26 V | 0,075 V 0,25 V |
| $I_{\text{réduction}}$ | -2,3 μA | -84,61 μA -96,15 μA |

III. Caractérisation des films de poly(pyrrole-biotine) par fluorescence

Afin de juger le succès de la phase d'immobilisation des groupements biotine sur les nanotubes de carbone suite à l'électro-polymérisation du pyrrole-biotine, nous effectuons des mesures de fluorescence. La microscopie à fluorescence fait désormais partie des méthodes de recherche les plus utilisées en biologie et dans le milieu médical [92-95]. Le microscope est équipé de filtres d'excitation, qui permettent de sélectionner les longueurs d'ondes qui vont exciter les espèces fluorescentes et des filtres d'émission (d'arrêt) qui vont permettre d'éliminer, lors de l'observation, certaines longueurs d'ondes émises par ces espèces en réponse à l'excitation. Ce type de microscope, permet de visualiser la fluorescence émise par des marqueurs fluorescents et permet ainsi des études de matériaux et de surfaces. En effet, des molécules peuvent être marquées à l'aide d'un fluorophore, permettant de suivre la localisation des éléments marqués, et donc de déceler leur interaction et leur fixation sur des surfaces [96-98]. Afin de déterminer la présence de biotines électropolymérisées sur le dépôt de SWCNTs et leur biodisponibilité, nous avons utilisé une streptavidine fluorescente capable de s'ancrer sur des motifs biotines. La streptavidine est marquée par la fluorescéine, un fluorophore capable de réémettre une lumière fluorescente verte à 525 nm lorsqu'elle est excitée par une lumière bleue à 490 nm [99]. Le filtre d'excitation ainsi que le filtre d'émission doivent être spécifiques du fluorophore utilisé. Le filtre utilisé dans notre étude est le FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate, dérivé de la fluorescéine) sur un microscope Olympus BX 61. Son principe de fonctionnement est montré au Schéma III-4.

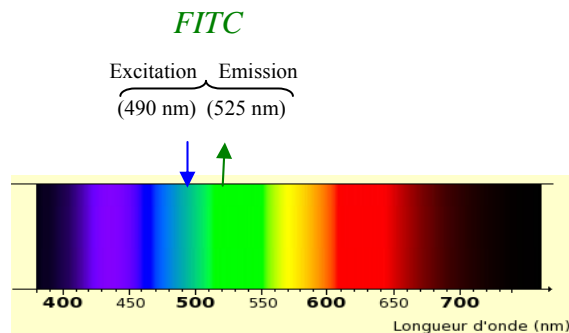


Schéma III-4: Principe de fonctionnement du filtre FITC avec le fluorophore fluorescéine.

(A)



(B)

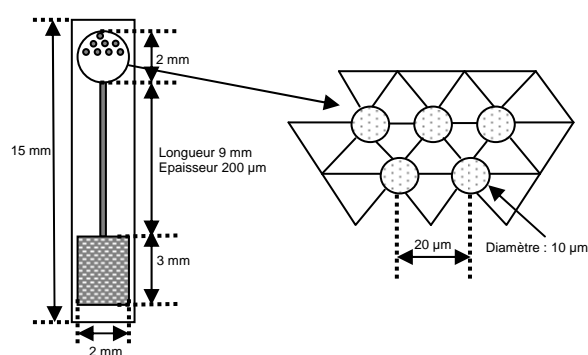


Schéma III-5: Microscope à fluorescence Olympus BX 61 (A) et Description des microélectrodes (B).

Dans ce but, un réseau de microélectrodes est modifié par un dépôt de NTCs puis par un film de poly(pyrrole-biotine), les microélectrodes étant toutes connectées entre elles. Ces microélectrodes de platine ont un diamètre de 10 µm et 150 nm d'épaisseur, l'écart entre deux microélectrodes étant de 20 µm (Schéma III-5). Le film de poly(pyrrole-biotine) est obtenu par électro-polymérisation du pyrrole biotine (4 mM) avec une charge de 0,1 mC. L'ensemble des microélectrodes modifiées par des nanotubes biotinylés est incubé dans une solution aqueuse de streptavidine-fluorescéine (0,5 mg mL⁻¹) pendant 20 min à l'obscurité. Le réseau est ensuite rincé avec du tampon phosphate 0,1 M (pH 7) puis à l'eau désionisée pour éliminer l'adsorption non spécifique des protéines.

La Figure III-4 indique clairement une fluorescence importante à la surface de chaque microélectrode, démontrant ainsi la présence de biotines électropolymérisées et la possibilité pour ces dernières de développer des interactions affines avec la streptavidine, et donc d'immobiliser cette protéine à la surface des SWCNTs. Le halo de fluorescence entourant les microélectrodes indique, pour sa part, une électropolymérisation des biotines sur les NTCs

adsorbés entre les microélectrodes, corroborant ainsi la nature conductrice de ces nanotubes de carbone.

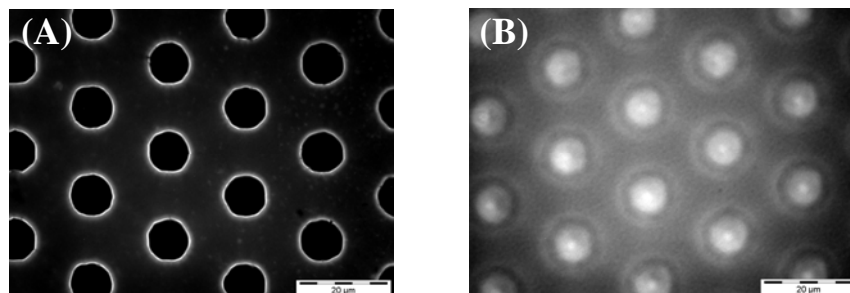


Figure III-4: Microélectrodes visualisées en microscope à fluorescence ($\times 100$) suite à une incubation avec la streptavidine-fluorescéine. Pt nue (A), Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine) (B).

IV. Caractérisation des films de poly(pyrrole-biotine) par microscopie électronique à balayage

Afin de confirmer l'électropolymérisation de la biotine sur les nanotubes, des dépôts de nanotubes fonctionnalisés ont été analysés par microscope électronique à balayage après incubation dans une solution aqueuse d'avidine.

La **Figure III-5-A** montre un dépôt de SWCNTs suite à l'électropolymérisation du pyrrole-biotine (0,1 mC à 0,85 V). Cet échantillon de nanotubes fonctionnalisés présente le même aspect que les nanotubes non modifiés bien que les agrégats paraissent plus resserrés. La **Figure III-5-B** montre les images MEB obtenues suite à une incubation du dépôt de SWCNT/poly(pyrrole-biotine) dans l'avidine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Les filaments de nanotubes de carbone deviennent plus larges et enveloppés par une couche d'avidine. Ceci montre l'ancrage de la protéine avidine sur les parois des nanotubes fonctionnalisés par la biotine.

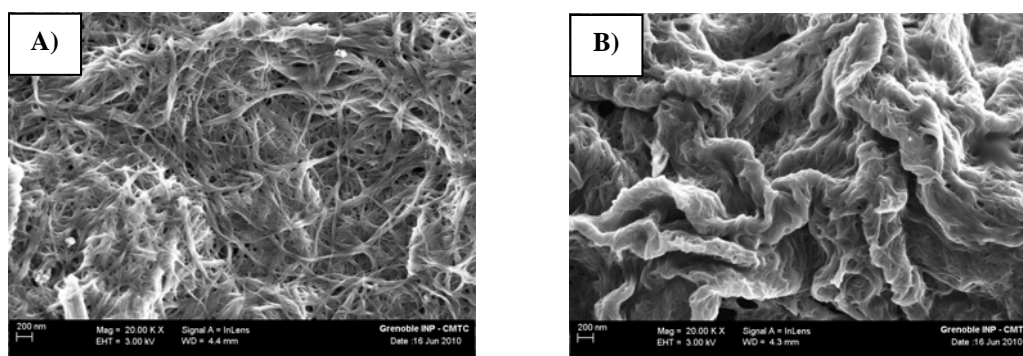
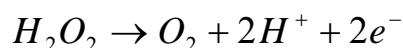
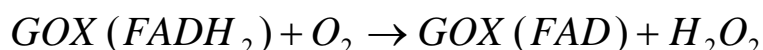
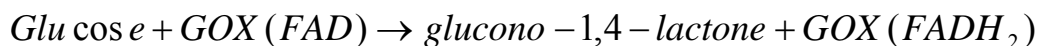


Figure III-5: Images MEB caractéristiques des échantillons de SWCNT/poly(pyrrole-biotine) avant (A) et après (B) ancrage de l'avidine

V. Biocapteurs à glucose à base de poly(pyrrole-biotine) et de SWCNT

La technique d'immobilisation utilisant l'affinité entre l'avidine et la biotine permet la formation de monocouches stables de protéines biotinylées à la surface de l'électrode modifiée par un polymère biotinylé via un pont avidine. Cette fixation, normalement, n'altère pas l'activité et la spécificité biologique des protéines. Les couches auto assemblées obtenues ont été réalisées par l'intermédiaire de molécules d'avidine. En outre, ce système d'affinité permet la construction de multicouches par auto-assemblage successif d'avidine et de protéine biotinylée. L'élaboration de biocapteurs enzymatiques est ainsi entreprise avec la glucose oxydase comme enzyme modèle.

La glucose oxydase est une enzyme spécifique du β -glucose. En présence de O_2 , elle catalyse l'oxydation du glucose en glucono-1,5-lactone (qui s'hydrolyse spontanément en acide gluconique) et génère du peroxyde d'hydrogène. L'eau oxygénée est oxydée à la surface d'une électrode de platine maintenue au potentiel de 0,6 V vs l'électrode au calomel saturée (ECS). L'intensité du courant anodique est proportionnelle à la concentration de H_2O_2 et donc fonction de la concentration de glucose. Au cours de la réaction enzymatique, l'oxydation du glucose entraîne la réduction de la flavine adénine dicluotide (FAD), le cofacteur de la GOX, en $FADH_2$. $FADH_2$ est ensuite oxydée par O_2 conduisant à FAD et H_2O_2 [100, 101].



Le principe de fonctionnement du biocapteur à glucose à base de glucose oxydase est illustré schématiquement au **Schéma III-6**.

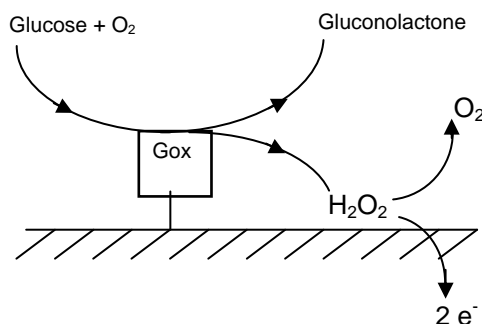


Schéma III-6: Schéma de principe de fonctionnement du biocapteur ampérométrique à glucose à base de glucose oxydase

V.1. Biocapteur de référence Pt/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-biotine

On se propose de réaliser un biocapteur à glucose à base de poly(pyrrole-biotine), en premier lieu sur une électrode de platine nue afin de mettre en évidence l'importance des nanotubes de carbone sur les performances de nos biocapteurs. L'électropolymérisation de pyrrole-biotine (4 mM dans CH₃CN) à la surface d'une électrode de platine est effectuée au potentiel de 0,85 V pour une charge de 0,5 mC. L'électrode recouverte par le film de poly(pyrrole-biotine) est incubée dans 20 µL d'avidine (0,5 mg mL⁻¹ dans un tampon phosphate à pH 7) pendant 20 minutes. Suite à deux lavages successifs dans le tampon phosphate, l'électrode est ensuite incubée dans 20 µL de glucose oxydase biotinylée, GOX-B, (0,5 mg mL⁻¹) pendant 20 minutes. L'électrode obtenue (**Schéma III-7**) par assemblage des différentes bio-couches est rincée deux fois à l'aide d'un tampon phosphate (pH 7) afin d'éliminer les protéines non-spécifiquement adsorbées.

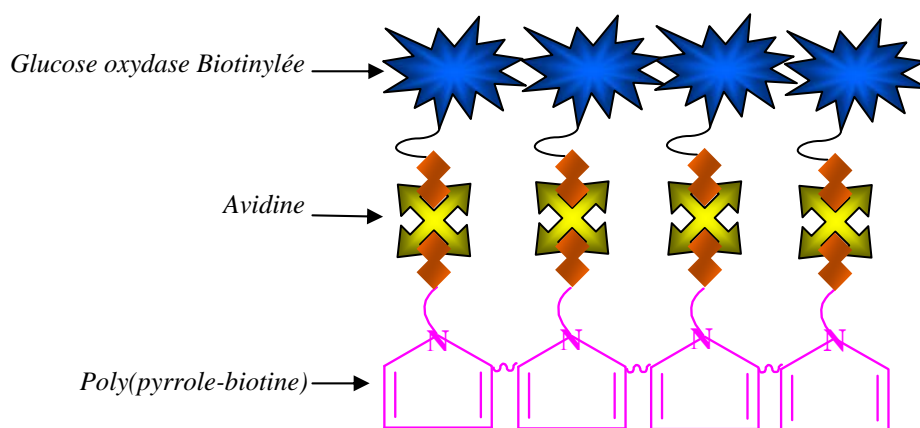


Schéma III-7: Biocapteur à base de poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-biotine

La caractérisation des performances analytiques de cette bioélectrode pour la détection du glucose a été réalisée par des mesures ampérométriques dans un tampon phosphate (pH 7) par application d'un potentiel constant de 0,6 V vs ECS permettant l'oxydation de H₂O₂ enzymatiquement généré. La réponse du biocapteur se traduit donc par une augmentation de l'intensité du courant lorsque la concentration de glucose en solution augmente. Il faut noter que les solutions de glucose sont préparées dans un tampon phosphate, et stockées 24 heures avant les mesures électrochimiques, afin de permettre l'équilibre de mutarotation du glucose.

On caractérisa notre biocapteur ampérométrique par :

- La sensibilité, définie comme la pente de la partie linéaire de la courbe de variation du courant en fonction de la concentration en substrat.

- Le domaine de linéarité, qui correspond à la gamme de concentration de glucose induisant une variation linéaire de la réponse du biocapteur.
- Le seuil de détection, c'est la valeur de concentration entraînant une variation du signal égale à trois fois la valeur du bruit de fond.
- Le temps de réponse, qui correspond au temps nécessaire pour que la réponse du biocapteur se stabilise à une nouvelle valeur après une injection de glucose.
- La constante de Michaelis apparente K_M , qui correspond à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre une intensité de courant égale à la moitié du courant maximum I_{max} . Il faut souligner que cette constante représente la cinétique du biocapteur et non pas de l'enzyme seule. Malgré tout, la détermination du K_M^{app} permet d'apporter des éclaircissements sur le fonctionnement du biocapteur.

En effet, des valeurs de K_M^{app} très faibles traduisent une forte affinité de l'enzyme et de son environnement pour son substrat. Au contraire, des valeurs élevées de K_M^{app} par rapport à la valeur du K_M de l'enzyme en solution, illustrent fréquemment des contraintes diffusionnelles des substrats et des produits de la réaction enzymatique au sein du matériau du biocapteur. Cette augmentation peut également refléter une altération de l'enzyme due à son immobilisation.

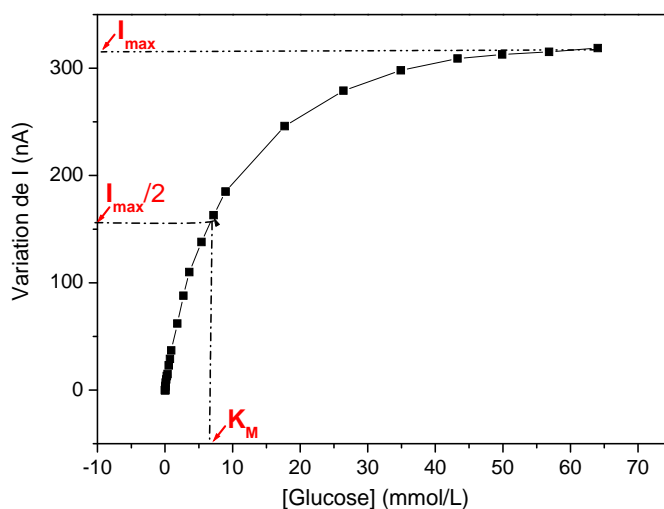


Figure III-6: Courbes d'étalonnage du biocapteur Pt/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B pour le dosage du glucose à 0,6 V/ECS dans un tampon phosphate (pH 7)

La **Figure III-6** montre la réponse du courant anodique du biocapteur en fonction de la concentration en glucose pour le biocapteur à base de poly(pyrrole-biotine) sur électrode de platine nue. La sensibilité du biocapteur est de $0,15 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ avec un domaine de linéarité

allant de 0,054 à 5,4 mmol.L⁻¹. La densité de courant maximale est de 1,6 $\mu\text{A cm}^{-2}$ et la valeur de K_m^{app} est de 7,15 mmol L⁻¹. Cette valeur de K_m^{app} est en bon accord avec celle déjà obtenue pour des biocapteurs à glucose et plus faible que la valeur de K_m de l'enzyme libre en solution (33 mM) [102]. Il apparaît que les réponses ampérométriques sont rapides puisque 90% de la réponse totale est obtenue en seulement 3 secondes, la stabilisation du courant et donc la réponse complète étant en moyenne enregistrée après 10 secondes. Il faut également souligner l'excellente stabilité du courant après la réponse, ce qui illustre la stabilité de la couche biologique.

La forme de la courbe de calibration est semblable à celle d'une courbe décrivant une catalyse enzymatique de type Michaelis Menten. La limitation de la réponse du biocapteur peut être attribuée, soit à la saturation des sites actifs de la protéine, soit à la limitation de la réaction par la concentration en solution de l'oxygène moléculaire. En effet, quand la quantité de substrat est suffisante pour saturer l'enzyme et la transformer totalement en complexe enzyme-substrat, la vitesse devient alors insensible à une augmentation de la concentration en substrat.

V.2. Biocapteur Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-biotine

V.2.1. Effet des nanotubes de carbone

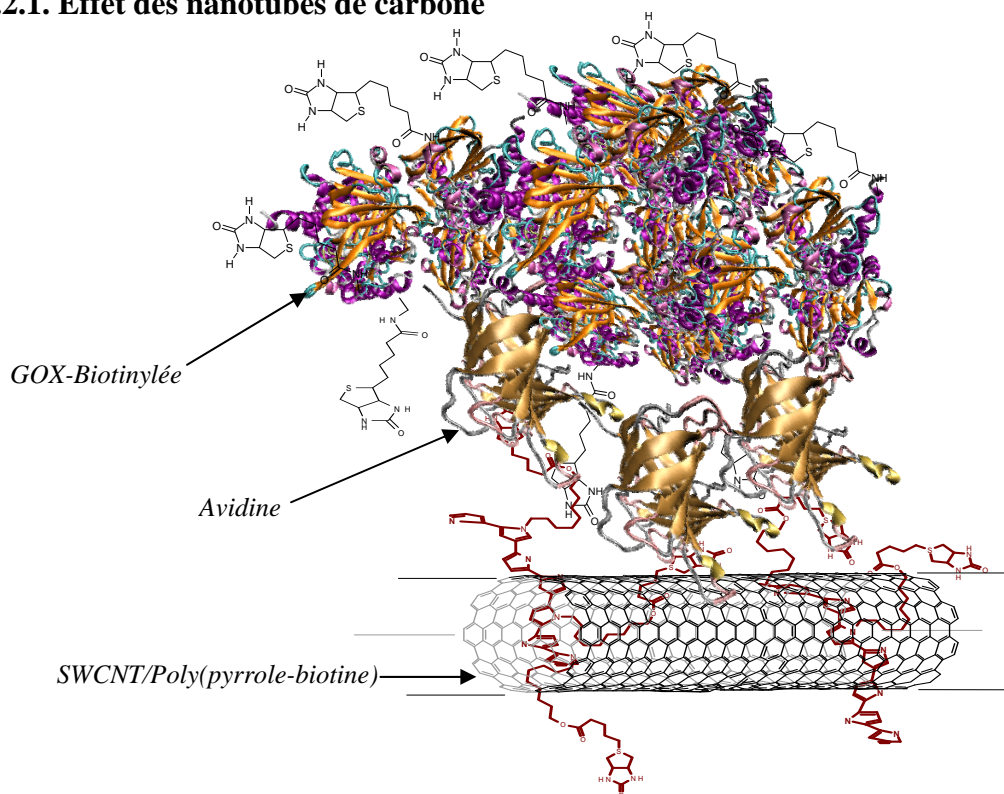


Schéma III-8: Biocapteur Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-biotine

On se propose par la suite de réaliser des biocapteurs à glucose à base de poly(pyrrole-biotine) électrogénérés sur une électrode de platine recouverte de 2x20 μL de nanotubes de carbone. Les dépôts de nanotubes sont réalisés à partir de la dispersion de concentration 0,1 mg mL^{-1} préparée selon le protocole décrit au **Chapitre II**. L'électro-polymérisation est effectuée au potentiel de 0,85 V pour une charge de 0,5 mC identique à celle utilisée dans le cas de l'électrode de Pt nue. Dans ces conditions, la même quantité de film de poly(pyrrole-biotine) est électro-générée sur les deux types d'électrodes. L'électrode recouverte par le film de nanotubes de carbone et de poly(pyrrole-biotine) est incubée dans 20 μL d'avidine (0,5 mg mL^{-1} préparée dans le tampon phosphate à pH 7) pendant 20 minutes. L'électrode est ensuite incubée dans 20 μL de glucose oxydase biotinylée (0,5 mg mL^{-1}) pendant 20 minutes. Chaque étape d'incubation est suivie de deux rinçages avec un tampon phosphate (pH 7) afin d'éliminer les entités non adsorbées.

La configuration du biocapteur est représentée au **Schéma III-8**. La caractérisation analytique des performances de ce biocapteur pour la détection du glucose a été réalisée, comme précédemment, en appliquant un potentiel de 0,6 V vs ECS dans un tampon phosphate (pH 7).

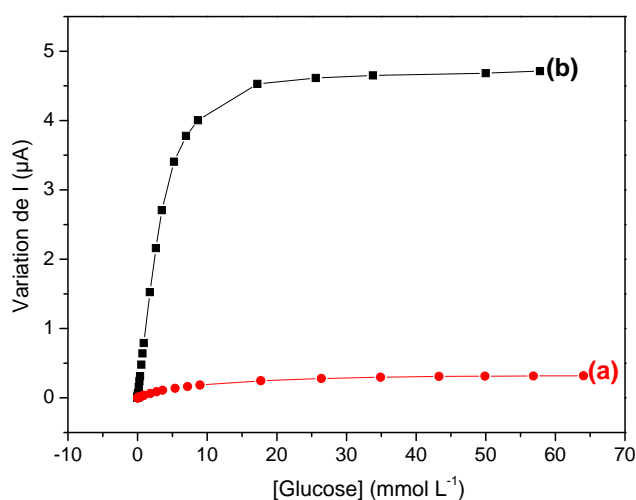


Figure III-7: Courbes d'étalonnage des biocapteurs *Pt/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B* (a) et *Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B* (b) vis-à-vis de la détection du glucose. Potentiel 0,6 V vs ECS dans un tampon phosphate (pH 7)

Tableau III-3: Caractéristiques des biocapteurs à glucose Pt/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B et Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B

| | Sensibilité (mA M ⁻¹ cm ⁻²) | Domaine de linéarité (mmol.L ⁻¹) | I _{max} (μAcm ⁻²) | K _M apparent (mmol.L ⁻¹) | t (s) |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------|
| Poly(pyrrole-biotine) sur Pt | 0,15 | 5,4 10 ⁻² à 5,4 | 1,6 | 7,15 | 5 |
| Poly(pyrrole-biotine) sur Pt/SWCNT | 4,1 | 7,3 10 ⁻³ à 3,5 | 23,9 | 3,28 | 8 |

La **Figure III-7** présente les courbes d'étalonnage des biocapteurs à glucose à base de poly(pyrrole-biotine) électrogénérés sur une électrode de platine nue et sur une électrode de platine recouverte par des nanotubes de carbone. En présence de nanotubes de carbone (2x20 μL), la sensibilité du biocapteur augmente considérablement atteignant 4,1 mA M⁻¹ cm⁻² pour un domaine de linéarité de 7,3 10⁻³ à 3,5 mmol L⁻¹ avec une densité de courant maximum de 23,9 mA cm⁻². La comparaison des résultats obtenus en présence et absence des SWCNTs indique que les nanotubes induisent une augmentation de la sensibilité et du courant maximum par respectivement facteurs 26 et 15 (**Tableau III-3**). Ceci indique que l'effet volumique des nanotubes entraîne l'augmentation de la surface couverte par le film de poly(pyrrole-biotine) et donc une augmentation de la quantité de glucose oxydase accrochée [103].

V.2.2. Optimisation du nombre de couches de nanotubes de carbone

Puisque les nanotubes de carbone entraînent une nette amélioration des performances des biocapteurs à glucose à base de poly(pyrrole-biotine), je me suis intéressée à l'optimisation de la quantité de nanotubes déposée afin de mieux connaître les potentialités et les limitations de ce concept de structuration 3D. Les dépôts de nanotubes sont réalisés par adsorption de volume constant (20 μL) de la dispersion de nanotubes (0,1 mg mL⁻¹) préparée selon le protocole décrit au **Chapitre II**. Chaque étape est suivie d'un séchage sous vide. L'électro-polymérisation du pyrrole-biotine sur les nanotubes de carbone est effectuée à potentiel de 0,85 V, la charge anodique étant maintenue constante (0,5 mC).

Les réponses ampérométriques des différentes configurations de biocapteurs (2x20 μL, 3x20 μL, 4x20 μL) en fonction de la concentration de glucose sont illustrées à la **Figure**

III-8. La sensibilité de ces biocapteurs est respectivement de 4,1 puis 5,1 et 1,76 mA M⁻¹ cm⁻² avec une densité de courant maximum de 23,9 puis 33,3 et 16 mA cm⁻². On constate d'après le **Tableau III-4** une augmentation de la sensibilité ainsi que du courant maximum à saturation en substrat suite au dépôt de 3x20 µL de nanotubes de carbone. Par contre, la sensibilité ainsi que la densité de courant maximum à saturation en substrat I_{\max} diminuent pour le biocapteur qui correspond à un dépôt de 4x20 µL de nanotubes de carbone. Cet effet peut être attribué au fait qu'un dépôt plus dense de nanotubes entraîne une augmentation de la distance entre l'enzyme et l'électrode et donc une augmentation des contraintes diffusionnelles pour la perméation du peroxyde d'hydrogène généré par l'enzyme. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation de la valeur de K_M^{app} (5,3 mmol L⁻¹) avec l'augmentation de la quantité de nanotubes déposée.

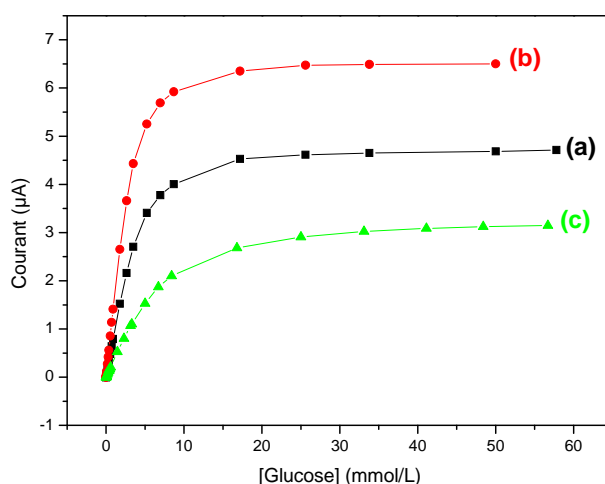


Figure III-8: Courbes d'étalonnage pour les biocapteurs Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B vis-à-vis du glucose élaborés sur des dépôts de 2x20 µL (a), 3x20 µL (b) et 4x20 µL (c) de la dispersion de nanotubes de carbone. Potentiel 0,6 V/ECS dans un tampon phosphate (pH 7)

Tableau III-4: Caractéristiques des biocapteurs à glucose Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B en fonction du nombre de couches de SWCNT

| | Sensibilité (mA M ⁻¹ cm ⁻²) | Domaine de linéarité (mmoL.L ⁻¹) | I_{\max} (µAcm ⁻²) | K_M apparent (mmoL.L ⁻¹) | t (s) |
|---------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|-------|
| 2x20 µL de SWCNT | 4,1 | 7,3 10 ⁻³ à 3,5 | 23,9 | 3,28 | 8 |
| 3x20 µL de SWCNT | 5,1 | 5,32 10 ⁻³ à 2,64 | 33,3 | 2,3 | 10 |
| 4x20 µL de SWCNT | 1,76 | 8,6 10 ⁻³ à 3,14 | 16 | 5,3 | 15 |

L'accroissement de l'épaisseur du dépôt entraîne également une fixation de l'enzyme plus loin de l'électrode. Ainsi une plus grande partie de H_2O_2 généré à l'interface dépôt-solution pourrait diffuser dans la solution au lieu d'être détectée à la surface de l'électrode (**Schéma III-9**).

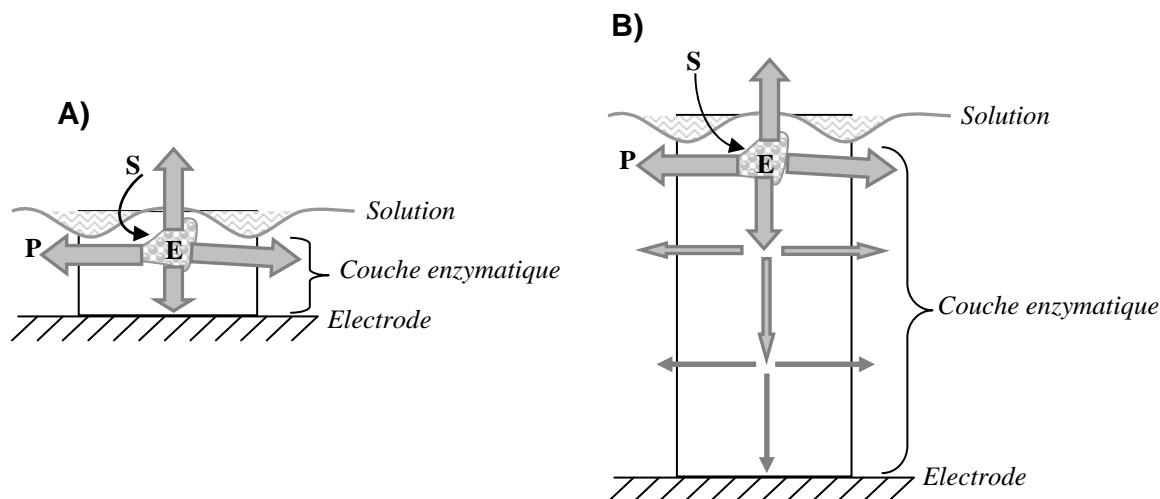


Schéma III-9: Principe de fonctionnement d'un biocapteur en fonction de l'épaisseur de la couche déposée. (A) Couche fine, (B) Couche épaisse

V.2.3. Réalisation d'architectures tridimensionnelles à base de couches de nanotubes de carbone

Il est rapporté que la forte interaction entre l'avidine et la biotine permet l'obtention d'architectures tridimensionnelles parfaitement structurées composées de couches alternées d'avidine et d'enzymes biotinylées [65]. Afin de vérifier la validité de ce concept pour la fonctionnalisation de SWCNTs, j'ai entrepris la formation d'une multi-couche de glucose oxydase à la surface du dépôt de SWCNTs optimum ($3 \times 20 \mu\text{L}$) précédemment déterminé. L'élaboration de la structure tridimensionnelle est effectuée par incubations successives du dépôt de SWCNT/poly(pyrrole-biotine) dans $20 \mu\text{L}$ d'avidine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) puis dans $20 \mu\text{L}$ de glucose oxydase-biotine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Les multi-couches sont obtenues en répétant ce processus d'incubation (**Schéma III-10**). En utilisant ce procédé simple et rapide, nous avons fixé quatre couches d'enzymes à la surface de l'électrode. La caractérisation des performances analytiques de cette bio-architecture pour la détection du glucose a été réalisée comme précédemment par des mesures ampérométriques.

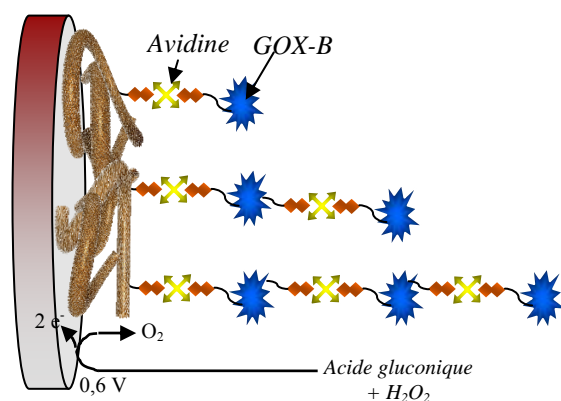


Schéma III-10: Structuration tridimensionnelle du biocapteur à glucose à base de SWCNT/poly(pyrrole-biotine)

La **Figure III-9** montre les courbes d'étalonnage du glucose des biocapteurs basés sur une, deux, trois et quatre couches d'avidine/GOX-B, ainsi que l'évolution du courant maximum en fonction du nombre de couches d'avidine/GOX-B déposées pour une concentration de 40 mM en glucose. Comme attendu, l'augmentation linéaire du courant maximum avec le nombre d'incubations réalisées reflète l'augmentation de la quantité de GOX-B immobilisée. Par contre, la sensibilité du biocapteur au glucose ne change pas en fonction du nombre de couches d'enzymes et reste égale à $5,1 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Une hypothèse serait que l'augmentation de sensibilité due à l'accroissement de la quantité d'enzyme immobilisée est contrebalancée par l'augmentation des contraintes diffusionnelles et de l'épaisseur du dépôt qui, eux, entraînent une diminution de la sensibilité et une augmentation de K_M^{app} .

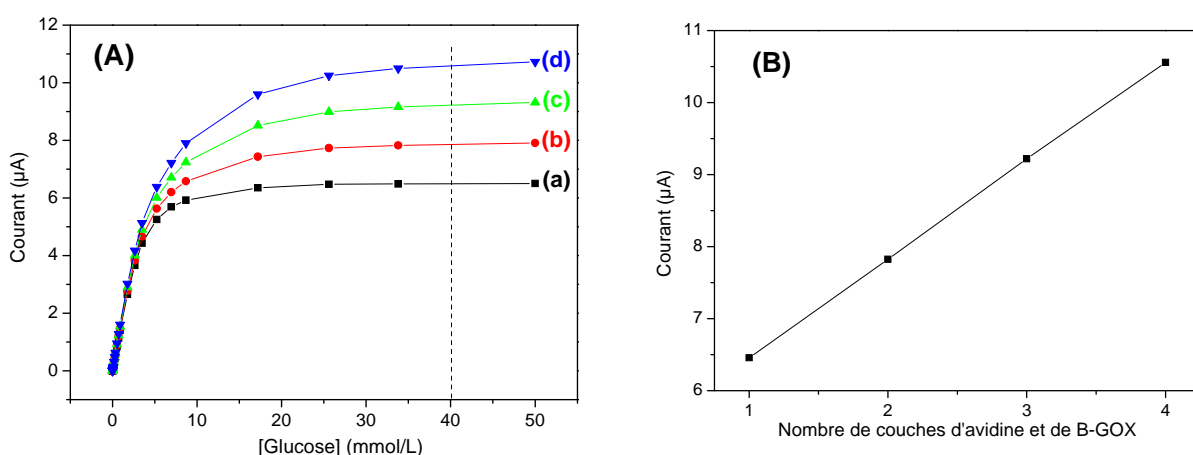


Figure III-9: (A) Courbes d'étalonnage pour le glucose enregistrées avec des biocapteurs Pt/SWCNT (3x20 µL)/ poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B présentant une (a), deux (b), trois (c) et quatre (d) couches de GOX-B. (B) Courbes de variation de la réponse du biocapteur à 40 mM en glucose en fonction du nombre de couches de GOX-B. Potentiel 0,6 V/ECS dans un tampon phosphate (pH 7)

Tableau III-5: *Caractéristiques des biocapteurs à glucose Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine)/avidine/GOX-B en fonction du nombre de couches d'avidine/GOX-B*

| Nombre d'incubations avec GOX-B | Sensibilité (mA M ⁻¹ cm ⁻²) | Domaine de linéarité (mmoL.L ⁻¹) | I _{max} (μAcm ⁻²) | K _M apparent (mmoL.L ⁻¹) | t (s) |
|---------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-------|
| 1 | 5,1 | 5,32 10 ⁻³ à 2,64 | 33,3 | 2,3 | 10 |
| 2 | 5,1 | 5,39 10 ⁻³ à 2,64 | 40,2 | 2,81 | 17 |
| 3 | 5,1 | 7,3 10 ⁻³ à 2,64 | 47,3 | 3,73 | 22 |
| 4 | 5,1 | 9,21 10 ⁻³ à 2,64 | 54,6 | 3,93 | 30 |

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé une nouvelle stratégie qui consiste à immobiliser la glucose oxydase sur un film de nanotubes de carbone en mettant à profit la forte interaction spécifique "avidine-biotine". Cette liaison non covalente entre l'avidine et la biotine a conduit de manière efficace à immobiliser la glucose oxydase biotinylée sur un film de poly(pyrrole-biotine) déposé sur une couche de nanotubes de carbone. Il est important de souligner également que la réalisation d'architectures tridimensionnelles à base de différentes couches de glucose oxydase biotinylée est rendue possible. Cette technique d'assemblage a permis le développement d'un biocapteur de glucose évalué par mesures ampérométriques. Les électrodes préparées ultérieurement sont obtenues avec un dépôt de 3x20 μL de nanotubes de carbone.

Références bibliographiques du chapitre III

- [1] L.Olmedo, P.Hourquebie, F.Jousse, *Synthetic Metals*, **1995**, 69, 205
- [2] Peter R.Teasdale, Gordon G.Wallence, *Reactive Polymers*, **1995**, 24, 157
- [3] Lu Gewu, Chen Feng'en, Wu Xufeng, Qu Liangti, Zhang Jiaxin, Shi Gaoquan, *Chinese Science Bulletin*, **2005**, 50, 1673
- [4] Chih-Chao Yen, *Journal of Applied Polymer Science*, **1996**, 60, 605
- [5] Chih-Chao Yen, *Journal of Applied Polymer Science*, **1999**, 71, 1361
- [6] C.Richad, H.Korri-Youssoufi, A.Yassar, *Synthetic Metals*, **2001**, 121, 1261
- [7] Juan-Carlos Vidal_, Esperanza Garcia-Ruiz, and Juan-Ramon Castillo, *Microchim. Acta*, **2003**, 143, 93
- [8] Alejandro L. Briseno, Shubo Han, Iris E. Rauda, and Feimeng Zhou, *Langmuir*, **2004**, 20, 219
- [9] Xia Youyi, Lu Yun, *Polymer Composites*, **2010**, 31, 340
- [10] Agata Michalska, Marcin Wojciechowski, Ewa Bulska, Krzysztof Maksymiuk, *Talanta*, **2010**, 82, 151
- [11] Xianjun Wang, Magnus Berggren, Olle Inganas, *Langmuir*, **2008**, 24, 5942
- [12] Ernő Lindner et Róbert E. Gyurcsányi, *J Solid State Electrochem*, **2009**, 13, 51
- [13] Murat Ates, A. Sezai Sarac, *Progress in Organic Coatings*, **2009**, 66, 337
- [14] Olivier Stephan, Jean-Claude Vial, *Synthetic Metals*, **1999**, 106, 115
- [15] Serge Cosnier, Robert S.Marks, Jean-Paul Lellouche, Karine Perie, Daniel Fologea, Sabine Szunterits, *Electroanalysis*, **2000**, 12, 1107
- [16] Zarini Muhammad Tahir, Evangelyn C. Alocilja, Daniel L. Grooms, *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 20, 1690
- [17] L.Coche-Guerente, S.Cosnier, C.Innocent, P.Mailley, *Analytica Chimica Acta*, **1995**, 311, 23
- [18] Serge Cosnier, Ionel Catalin Popescu, *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 319, 145

-
- [19] J-L.Besombes, S.Cosnier, P.Labbé, *Talanta*, **1997**, 44, 2209
- [20] Serge Cosnier, Bruno Galland, Chantal Gondran, Arielle Le Pellec, *Electroanalysis*, **1998**, 10, 808
- [21] Serge Cosnier, *Biosensors and Bioelectronics*, **1999**,14, 443
- [22] Serge Cosnier, C.Gondran, A.Senillou, *Synthetic Metals*, **1999**, 102, 1366
- [23] S.Cosnier, J.J.Fombon, P.Labbé, D.Limosin, *Sensors and Actuators B*, **1999**, 59, 134
- [24] Serge Cosnier, C.Gondran, A.Senillou, *Synthetic Metals*, **1999**, 102, 1366
- [25] Serge Cosnier, Chantal Gondran, Karine Gorgy, Rudolf Wessel, Franz-Peter Montforts, Michael Wedel, *Electrochemistry communications*, **2002**, 4, 426
- [26] S.Da Silva, D.Shan, S.Cosnier, *Sensors and Actuators B*, **2004**, 103, 397
- [27] Serge Da Silva, Serge Cosnier, M.Gabriela Almeida, José J.G.Moura, *Electrochemistry Communications*, **2004**, 6, 404
- [28] Pascal Mailley, Edward A.Cummings, Sophie Mailley, Serge Cosnier, Brian R.Eggins, Eric McAdams, *Bioelectrochemistry*, **2004**, 63, 291
- [29] A.Ramanavicius, A.Ramanaviciene, A.Malinauskas, *Electrochimica Acta*, **2006**, 51, 6025
- [30] Pola Goldberg-Oppenheimer, Serge Cosnier, Robert S.Marks, Oren Regev, *Talanta*, **2008**, 75, 1324
- [31] T.Konry, Y.Heyman, S.Cosnier, K.Gorgy, R.S.Marks, *Electrochimica Acta*, **2008**, 53, 5128
- [32] Maria A.Carvalho de Medeiros, Karine Gorgy, Alain Deronzier, Serge Cosnier, *Materials Science and Engineering C*, **2008**, 28, 731
- [33] H. Barhoumi, A. Maaref, S. Cosnier, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *ITBM-RBM*, **2008**, 29, 192–201
- [34] C.L.Aravinda, Serge Cosnier, Wilfred Chen, Nosang V.Myung, Ashok Mulchandani, *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24, 1451
- [35] Fabien Giroud, Karine Gorgy, Chantal Gondran, Serge Cosnier, Daniel G. Pinacho, M.-Pilar Marco, Francisco J. Sanchez-Baeza, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 8405
- [36] Imen Hafaid, Syrine Chebil, Hafsa Korri-Youssoufi, François Bessueille, Abdelhamid Errachid, Zina Sassi, Zulfiquir Ali, Adnane Abdelghanie, Nicole Jaffrezic-Renault, *Sensors and Actuators B*, **2010**, 144, 323

-
- [37] Jessica Baur, Chantal Gondran, Michael Holzinger, Eric Defrancq, Hubert Perrot, Serge Cosnier, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 1066
- [38] Chantal Gongran, Maylis Orio, David Rigal, Bruno Galland, Laurent Bouffier, Tioga Gulon, Serge cosnier, *Electrochemistry communications*, **2010**, 12, 311
- [39] P. Godillot, H. Korri-Youssoufi, P. Srivastava, A. El Kassmi, F. Garnier, *Synthetic Metals*, **1996**, 33, 117
- [40] H. Korri-Youssoufi, I. Godillot, P. Srivastava, A. El Kassmi and F. Garnier, *Synthetic Metals*, **1997**, 84, 169
- [41] H.Korri-Youssoufi, B.Makrouf, A.Yassar, *Synthetic Metals*, **2001**, 119, 131
- [42] H.Korri-Youssoufi, B.Makrouf, *Synthetic Metals*, **2001**, 119, 265
- [43] Hafsa Korri-Youssoufi, Bouchra Makrouf, *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 469, 85
- [44] H.Q.A.Lê, S.Chebil, B.Makrouf, H.Sauriat-Dorizon, B.Mandrand, H. Korri-Youssoufi, *Talanta*, **2010**, 81, 1250
- [45] Remy Ricoux, Hafsa Korri-Youssoufi, Jean-Pierre Mahy, *Journal of Biological Sciences*, **2005**, 5, 44
- [46] H. Korri-Youssoufi, N. Desbenoit, R. Ricoux, J.-P. Mahy, S. Lecomte, *Materials Science and Engineering C*, **2008**, 28, 855
- [47] H. Korri-Youssoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, and A. Yassar, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7388
- [48] Francis Garnier, Hafsa Korri-Youssoufi, Pratima Srivastava, Bernard Mandrand, Thierry Delair, *Synthetic Metals*, **1999**, 100, 89
- [49] H.Korri-Youssoufi, A.Yassar, *Biomacromolecules*, **2001**, 2, 58
- [50] Chaker Tlili, Hafsa Korri-Youssoufi, Laurence Ponsonnet, Claude Martelet, Nicole Jaffrezic-Renault, *Talanta*, **2005**, 68, 131
- [51] Chaker Tlili, Nicole J. Jaffrezic-Renault, Claude Martelet, Hafsa Korri-Youssoufi, *Materials Science and Engineering C*, **2008**, 28, 848
- [52] Joseph Wang, Chen, Lin Shi Ping, Shan Meng, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1989**, 273, 231
- [53] W. Cahalane, M. M. Labes, *Chemistry of Materials*, **1989**, 1, 519
- [54] Eeva-Liisa Kupila, Jouko Kankare, *Synthetic Metals*, **1995**, 74, 241
- [55] David A.Kaplin, Syed Qutubuddin, *Polymer*, **1995**, 36, 1275

-
- [56] Ming Zhou, Markus Pagels, Beate Geschke, Jurgen Heinze, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 10065
- [57] A. Peigney, C. Laurent, E. Flahaut, R. R. Bacsa, A. Rousset, *Carbon*, **2001**, 39, 507
- [58] R. Saito, M. Fujita, M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, *Appl. Phys. Lett.*, **1992**, 60, 2204
- [59] J. W. Mintmire, B. I. Dunlap, C. T. White, *Phys. Rev. Lett.*, **1992**, 68, 631
- [60] S. Iijima, C. Brabec, A. Maiti, J. Bernholc, *Journal of Chemical Physics*, **1996**, 104, 2089
- [61] V. N. Popov, V. E. Van Doren, M. Balkanski, *Physical Review B*, **2000**, 61, 3078
- [62] Serge Cosnier, Margarita Stoytcheva, Anne Senillou, Hubert Perrot, Rosa P.M.Furriel, Francisco Leone, *Anal Chem*, **1999**, 71, 3692
- [63] Serge Cosnier, Arielle Lepellec, *Electrochimica Acta*, **1999**, 44, 1833
- [64] Robert S.Marks, Andres Novoa, David Thomassey, Serge Cosnier, *Anal Bioanal Chem*, **2002**, 374, 1056
- [65] S.Cosnier, C.Gondran, *Analisis*, **1999**, 27, 558
- [66] A. F. Diaz, K. Keiji Kanazaw, *J.C.S. Chem. Comm*, **1979**, 373, 635
- [67] P.AUDEBERT, and P.HAPIOT, *Synthetic Metals*, **1995**, 75, 95
- [68] P.Audebert, J.M.Catel, G.Le Coustumer, V.Duchenet, P.Hapiot, *Journal of physical Chemistry*, **1995**, 99, 11923
- [69] G.A.Wood, J.O.Iroh, *Synthetic Metals*, **1996**, 80, 73
- [70] Sabouraud Guillaume; Sadki Said; Brodie Nancy; *Chemical Society Reviews*, **2000**, 29, 283
- [71] J.Heinze, Topics in Current Chemistry, *Electrochemistry IV*, **1990**, 152, 1
- [72] P.Novak, and W.Vielstich, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial chemistry*, **1991**, 300, 99
- [73] R.Bilger, J.Heinze, *Synthetic Metals* , **1991**, 43, 2893
- [74] M.Yamaura, T. Hagiwara, K. Iwata, *Synthetic Metals*, **1988**, 26, 209
- [75] Amiel M. Farrington and Jonathan M. Slater, *Electrounalysis*, **1991**, 9, 843
- [76] Benjamin P.J. de Lacy Costello, Norman M. Ratcliffe, Pennadam S. Sivanand, *Synthetic Metals*, **2003**, 139, 43

-
- [77] Nurcan S. Tuzun, Fatma Bayata, A. Sezai Sarac, *Journal of Molecular Structure: Theochem*, **2008**, 857, 95
- [78] Kai Zhang, Bernd Tieke, John C. Forgie, Peter J. Skabara, *Macromol. Rapid Commun.*, **2009**, 30, 1834
- [79] A.F.Diaz, A.Martinez, K.K.Kanazawa, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1981**, 130, 181
- [80] A. F. Diaz, J. Castillo, K. K. Kanazawa, J. A. Logan, M. Salmon, O. Fajardo, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1982**, 133, 233
- [81] Manuel Salmon, Ma Eugenia Carbajal, Martha Aguilar, Miguel Saloma, Juan Carlos Juárez, *Journal of Chemical Society, Chemical Communication*, **1983**, 24, 1532
- [82] Manuel Salmon, Ma. Eugenia Carbajal, and Juan Carlos Jurez, *Journal of Electrochemical Society: Electrochemical Science and Technology*, **1984**, 131, 1802
- [83] F.Diaz, Juan I.Castillo, *Journal of Chemical Society*, **1980**, 9, 397
- [84] Serge Cosnier, Chantal Gondran, Arielle Lepellec, Anne Senillou, *Analytical Letters*, **2001**, 34, 61
- [85] Naoufel Haddour, Serge Cosnier, Chantal Gondran, *Chem.Commun*, **2004**, 21, 2472
- [86] Naoufel Haddour, Serge Cosnier, Chantal Gondran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5752
- [87] Rodica E.Ionescu, Chantal Gondran, Levi A. Gheber, Serge Cosnier, Robert S. Marks, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 6808
- [88] Nanda Gopal Sahoo, Yong Chae Jung, Hyang Hwa So, Jae Whan Cho, *Synthetic metals*, **2007**, 157, 374
- [89] Mawell C.Kum, Kanchan A.Joshi, Wilfred Chen, Nosang V.Myung, Ashok Mulchandani, *Talanta*, **2007**, 74, 370
- [90] Serge Cosnier, Rodica E. Ionescu and Michael Holzinger, *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 5129
- [91] Ming Zhou, Jurgen Heinze, *Electrochimica Acta*, **1999**, 44, 1733
- [92] T. Fujii and M. Suzuki, H. Yamada and K. Nakayama, *Thin Solid Films*, **1994**, 243, 407
- [93] Takafumi Yamada, Rehana Afrin, Hideo Arakawa, Atsushi Ikai, *FEBS Letters*, **2004**, 569, 59
- [94] Takaaki Kanemaru, Kazuho Hirata, Shin-ichi Takasu, Shin-ichiro Isobe, Keiji Mizuki, Shuntaro Mataka, Kei-ichiro Nakamura, *Ultramicroscopy*, **2009**, 109, 344

- [95] Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, Kentaro Uesugi, Yoshio Suzuki, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, **2010**, 616, 261
- [96] L.M. Torres Rodriguez, A. Roget, M. Billon, T. Livache, G. Bidan, *Chem. Comm.*, **1998**, 18, 1993
- [97] Shifang Zhang, Charles Ma, and Martin Chalfie, *Cell*, **2004**, 119, 137
- [98] K. H. S. Arun¹, C. L. Kaul, P. Ramarao, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **2005**, 51, 1
- [99] Rimane Aoun, Ali Yassin, Mouhieddine El Jamal, Ali Kanj, Joelle Rault-Berthelot, Cyril Poriel, *Synthetic Metals*, **2008**, 158, 790
- [100] J. Rubio Retama, E. Lopez Cabarcos, D. Mecerreyes, B. Lopez-Ruiz, *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, 20, 1111
- [101] Pierre Fabry, Chantal Gondran, Capteurs électrochimiques Fonctionnement, utilisation, conception
- [102] Serge Cosnier, Sabine Szunerits, Robert S. Marks, Andres Novoa, Laurence Puech, Emile Perez, Isabelle Rico-Lattes, *Electrochemistry Communications*, **2000**, 2, 851
- [103] M. Gao, L. Dai, G. G. Wallace, *Synthetic Metals*, **2003**, 137, 1393

Chapitre IV :

*Application des nanotubes
de carbone aux
biocapteurs à base de
pyrène-biotine*

Chapitre IV

Application des nanotubes de carbone aux biocapteurs à base de pyrène-biotine

Introduction

L'utilisation des nanotubes de carbone comme matériau d'électrode pour la détection biomoléculaire a permis de réaliser une révolution dans le monde des biocapteurs. Conscients de cet état de fait, et désireux d'un axe original, nous avons décidé de concentrer nos recherches sur l'utilisation des SWCNTs comme élément d'échafaudage pour construire des bio-assemblages tridimensionnels en privilégiant principalement la fonctionnalisation spécifique des nanotubes de carbone. Dans ce but, je me suis particulièrement intéressée aux interactions non-covalentes entre le pyrène et les SWCNTs à base d'empilements par interactions π [1].

Dans ce chapitre, nous allons présenter différentes techniques d'accrochage des pyrènes fonctionnalisés par la biotine sur des nanotubes de carbone, à savoir l'adsorption par interaction π des dérivés pyréniques sur des nanotubes dispersés en solution ou déposés à la surface de l'électrode, et l'électropolymérisation de ce pyrène soit en solution soit adsorbé. Suivant ces différentes stratégies, nous avons ensuite exploité l'affinité avidine-biotine pour immobiliser une glucose oxydase biotinylée et ainsi développer des biocapteurs à glucose.

I. Synthèse et caractérisation du pyrène-biotine: biotinoate de 4-(pyren-1-yl) butyle (biotin-4-pyren-1-yl-butyl ester)

I.1. Synthèse du pyrène-biotine

Le pyrène-biotine est synthétisé suivant le schéma réactionnel (**Schéma IV-1**) en dissolvant du pyrène butanol (Composé I) (280 mg ; 1 mmol) dans 20 mL de diméthylformamide DMF sous une atmosphère d'argon. Les agents de couplage sont ensuite ajoutés à la solution : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC ; 280 mg ; 1,35 mmol), et diméthylaminopyridine (DMAP ; 100 mg ; 4,2 mmol), ainsi que la biotine (Composé II) sous forte agitation (0,250 g ; 1 mmol). L'évolution de la réaction est contrôlée par chromatographie sur couche mince avec un mélange de solvants CH₂Cl₂ /EtOH (95 : 5).

Après une semaine de temps réactionnel, le solvant est évaporé, conduisant à un solide jaune soluble dans CH₂Cl₂. Le pyrène-biotine est ensuite purifié par flash chromatographie (phase mobile CH₂Cl₂/ EtOH 95:5) sur un gel de silice avec des particules de dimension 60 µm comme phase stationnaire. Le rendement de la réaction est de 40%.

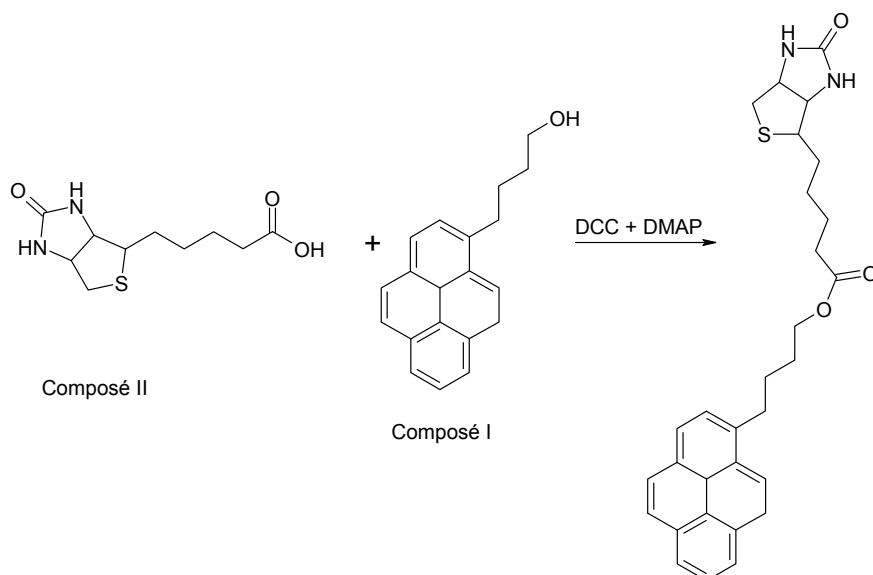


Schéma IV-1: Synthèse du pyrène-biotine.

I.2. Caractérisation du pyrène biotine

I.2.1. Caractérisations spectroscopiques

Le pyrène-biotine synthétisé (**Schéma IV-2**) est ensuite caractérisé par résonance magnétique nucléaire RMN. Les résultats sont donnés ci-dessous :

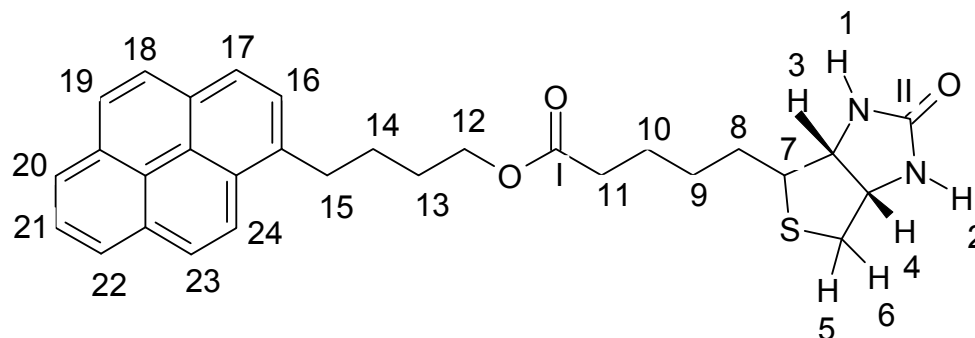


Schéma IV-2: Structure Chimique du pyrène-biotine synthétisé.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δppm = 8.23 ppm (d, 1H, **16**), 8.17 ppm (dd, 1H, **21**), 8.15 ppm (d, 1H, **24**), 8.11 (2d, 2H, **18** et **23**), 8.02 ppm (2 d, 2H, **17** et **22**), 8.00 ppm (d, 1H, **19**), 7.85 (d, 1 H, **20**), 5.52 (s, 1H, **2**), 5.12 (s, 1H, **1**), 4.25 (m, 1H, **3**), 4.05 (m, 1H, **4**), 3.35 (t, 2H, **12**), 2.92 (td, 1H, **7**), 2.72 (dd, 1H, **6**), 2.6 (d, 1H, **5**), 2.27 (t, 2H, **11**), 1.90-1.23 (m, 12 H, **8-10** et **13-15**).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δppm = 173.7 (1C, **II**), 163.4 (1C, **I**), groupements pyrène (16C): 136.3 (1C), 131.4 (1C), 130.8 (1C), 129.8 (1C), 128.5 (1C), 127.4 (1C), 127.3 (1C), 127.2 (1C), 126.6 (1C), 125.8 (1C), 125.1 (1C), 125.0 (1C), 124.9 (1C), 124.8 (1C) 124.7 (1C), 123.2 (1C); 64.2 (1C, **4**), 61.7 (1C, **3**), 60.0 (1C, **7**), 55.2 (1C, **5**), 40.4 (1C, **12**), 33.9 (1C, **11**), 33.0 (1C, **10**), 28.6 (1C, **8**), 28.2 (1C, **15**), 28.1 (2C, **14**), 28.1 (2C, **13**), 24.7 (1C, **9**).

I.2.2. Caractérisation UV Visible

Ce paragraphe présente la caractérisation du pyrène-biotine synthétisé par des mesures d'absorption, afin de le comparer au pyrène non fonctionnalisé et de connaître l'influence de la fonctionnalisation sur les propriétés des pyrènes.

La **Figure IV-1** présente le spectre d'absorption en solution du pyrène avant et après fonctionnalisation par la biotine. Ce spectre est tout à fait semblable à ceux décrits dans la littérature pour le pyrène en solution [2]. Le spectre du pyrène non fonctionnalisé présente une série de pics situés à 335, 319 et 305 nm, une autre série de pics à 272, 261 et 251 nm puis une troisième série située à 240 et 230 nm. Ces bandes correspondent à une transition $\pi\text{-}\pi^*$ des groupements pyrènes [3]. Les spectres des pyrènes fonctionnalisés par la biotine montrent les mêmes séries de pics mais décalées de quelques nanomètres vers le rouge à 342, 326,

310 nm, puis à 275, 265 et 255 nm et enfin à 245, 235 nm. Ce déplacement de bandes a pour origine la mono-substitution des molécules pyrène par la biotine. Le déplacement bathochrome est révélateur de l'abaissement de l'écart énergétique, entre la HOMO (*High Occupied Molecular Orbital*) et la bande de valence induite par l'insertion d'une mono-substitution.

Le coefficient d'extinction molaire correspondant au maximum d'absorption situé à 240 nm est d'environ $\epsilon=62,74 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dans le cas du pyrène non fonctionnalisé, et de $\epsilon=75,55 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dans le cas du pyrène-biotine pour une absorption à 245 nm ce qui correspond aux valeurs reportées dans la littérature pour les pyrènes monosubstitués [4].

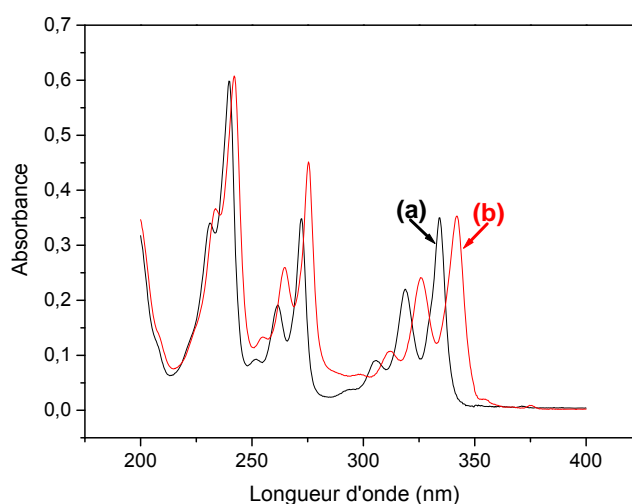


Figure IV-1: Spectres d'absorbance du pyrène (a) et du pyrène-biotine (b) à une concentration de $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ dans l'acétonitrile.

I.2.3. Caractérisation par émission

La molécule de pyrène est constituée de quatre cycles aromatiques qui lui confèrent des propriétés de fluorescence [5-10] ; nous avons donc examiné l'influence sur la fluorescence de sa modification par la biotine.

Le spectre d'émission du pyrène-biotine dans l'acétonitrile a été enregistré par excitation à 245 nm correspondant au maximum d'absorption $S_0 \rightarrow S_1$ de la molécule de pyrène-biotine [11] avec une fente de 2,5 mm et pour une concentration de $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Le spectre d'émission du pyrène suite à la fonctionnalisation par la biotine est constitué de trois pics à 376, 397 et 418 nm (Figure IV-2-A). On observe les mêmes pics que pour le pyrène non fonctionnalisé mais légèrement décalés [2]. Ce type d'émission, décalée vers le rouge par

rapport à l'émission intrinsèque, pourrait être provoquée par une interaction intramoléculaire entre les cycles aromatiques du pyrène et le motif biotine [12].

Le spectre (**Figure IV-2-B**) comporte une bande supplémentaire large centrée vers 481 nm lorsque la concentration en solution augmente jusqu'à 2 mM, mais l'intensité globale diminue. Il s'agit de molécules, entre lesquelles existe une interaction similaire à celle responsable de la formation d'excimères, deux molécules voisines formant un dimère à l'état excité [13-16]. Il apparaît donc que le pyrène-biotine fait intervenir des processus photochimiques, à l'origine de la formation d'interactions intramoléculaires. Ces observations soulèvent donc la question de la photochimie du pyrène suite à sa fonctionnalisation [17].

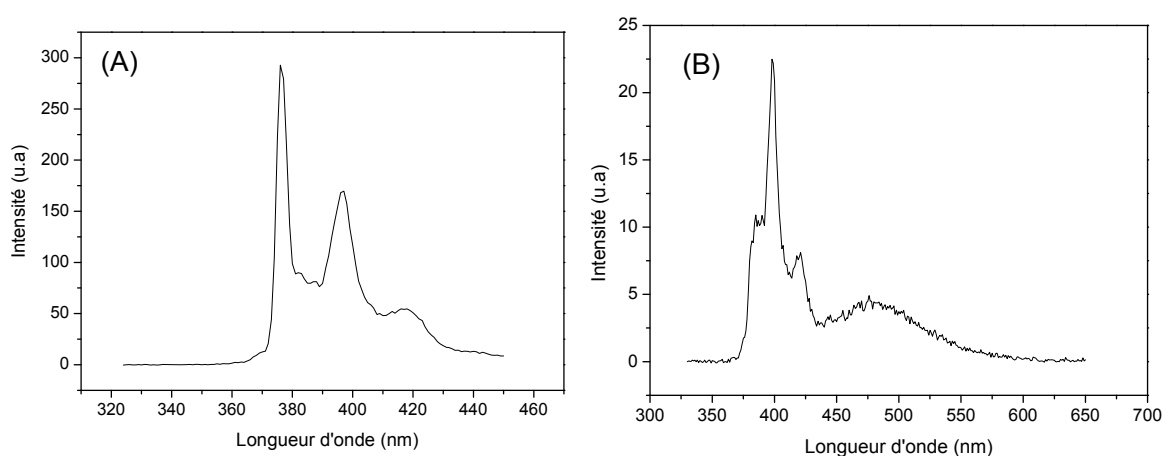


Figure IV-2: Spectres d'émission de luminescence du pyrène-biotine ($\lambda_{ex}=345$ nm) à une concentration de $8 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ (A) et $2 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ (B) dans l'acétonitrile.

I.2.4. Caractérisation électrochimique

Le comportement électroactif d'un film polypyrène est remarquable du fait qu'il présente des propriétés électrochimiques différentes de celles du monomère comme dans le cas du polypyrrole.

L'électro-polymérisation du pyrène non fonctionnalisé (2 mM) dans l'acétonitrile par balayage de potentiel entre 0 et 1,1 V sur une électrode de platine (5 mm de diamètre) a été réalisée afin de déceler les variations apportées par la fonctionnalisation du pyrène par la biotine (**Figure IV-3**). L'électrode de référence est une électrode Ag/Ag⁺ contenant 10 mM de AgNO₃ et 0,1 M de perchlorate de lithium (LiClO₄) dans l'acétonitrile. L'oxydation du monomère est caractérisée par un pic anodique à 0,95 V associé à un pic de réduction à 0,84 V. La faible réversibilité de ce système indique la présence d'une réaction chimique couplée à la réaction d'oxydation électrochimique. Les balayages successifs de potentiel induisent une

augmentation continue des intensités des pics anodique et cathodique, ainsi que l'apparition et la croissance d'un nouveau couple rédox à $E_{1/2} = 0,675$ V. Cette apparition indique la formation d'un film de polypyrène à la surface de l'électrode.

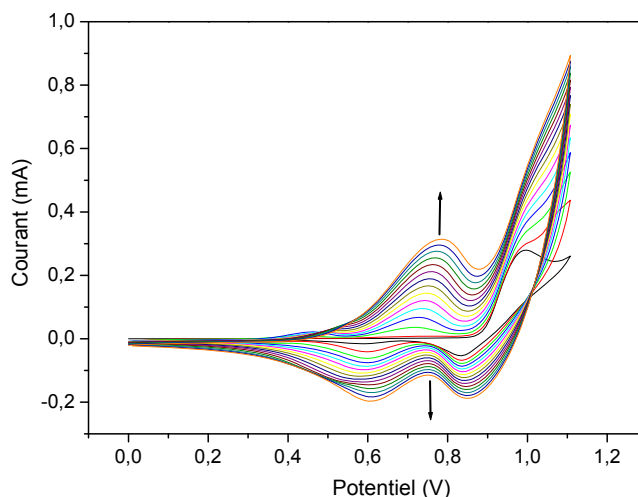


Figure IV-3 : Polymérisation du pyrène (2 mM) dans $CH_3CN + 0,1$ M $LiClO_4$ sur une électrode de Pt nue (diamètre 5 mm) par balayages répétés du potentiel entre 0 et 1,1 V vs 10 mM Ag^+/Ag . 100 m $V s^{-1}$

Le film de polypyrène subit des cycles d'oxydo-réduction, passant de l'état neutre à l'état conducteur dans un domaine de potentiel compris entre 0 et 1,1 V [18-20]. Néanmoins, la conductivité du film de polypyrène est beaucoup plus faible que celle du polypyrrole et elle est estimée entre 10^{-1} et 1 $ohm^{-1} cm^{-1}$ [21]. Un balayage à des potentiels plus élevés induit un phénomène de suroxydation du polymère [22].

Le film de polypyrène résulte de la formation de radicaux cations du pyrène à 0,95 V et de leur couplage radicalaire. Le mécanisme d'électropolymérisation du pyrène est semblable à celui des carbazoles [23-27]. La première étape d'électropolymérisation consiste en la dimérisation par la formation du 1,1'-bipyrène. La polymérisation se poursuit quand le 1,1'-bipyridine est électro-oxydé en son radical cation [28]. Le radical cation 1,1'-dimère va conduire alors à l'un des trimères suivants 1, 1':3', 1'' ou 1, 1':6', 1'' ou 1, 1':8', 1'' ou à une combinaison des trois (Schéma IV-3).

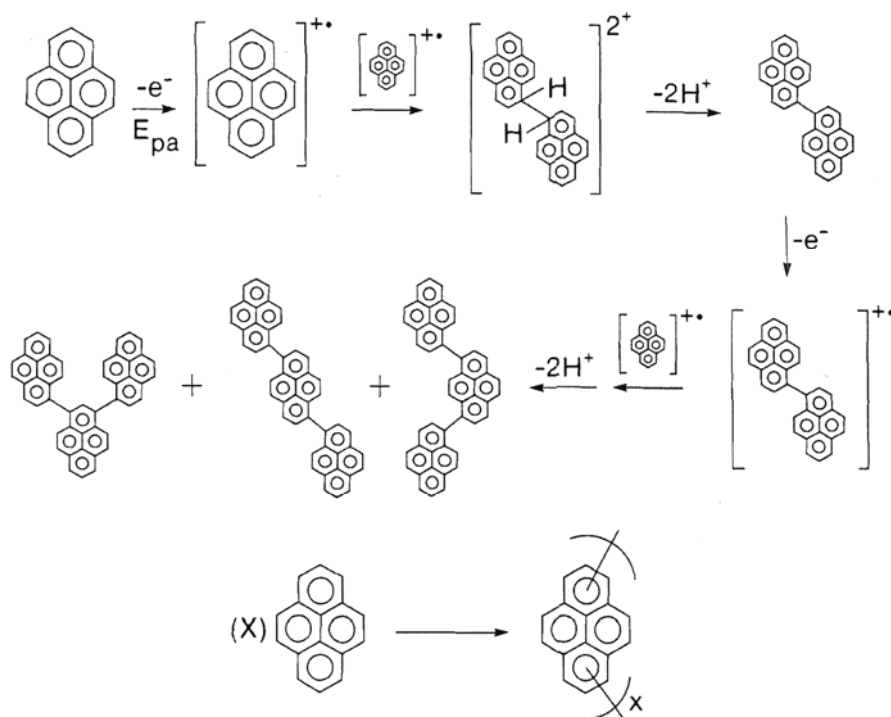


Schéma IV-3: Mécanisme d'électropolymérisation du pyrène [21].

Des calculs d'orbitales moléculaires (INDO) ont montré que les densités d'électrons les plus élevées sont situées en positions 1, 3, 6 et 8 (**Schéma IV-4**). Ces positions sont considérées comme les sites réactifs les plus favorisés lors de la formation du film polymère.

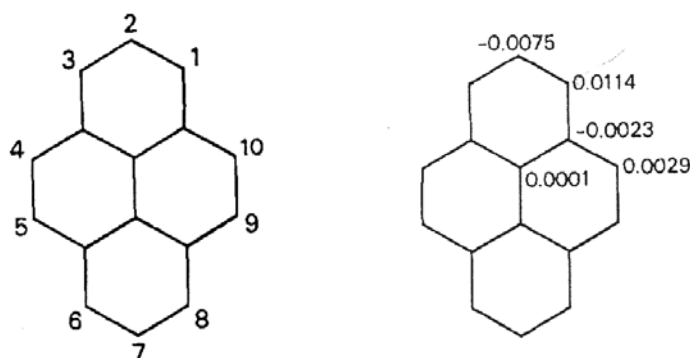


Figure IV-4: Schéma de numérotation du pyrène et densité électronique calculée selon INDO (open shell molecular orbital calculations).

Il a été rapporté que le film polymère fait intervenir 2,31 électrons/molécule [21, 29 et 30] et qu'il contient un contre-ion pour trois unités pyrènes [31].

Le comportement électrochimique du pyrène-biotine (2 mM) dans l'acétonitrile + 0,1 M LiClO₄ a été étudié dans les mêmes conditions expérimentales (**Figure IV-4-A**). Lors

du premier balayage en oxydation entre 0 et 1 V, le monomère exhibe un pic anodique irréversible à 0,8 V qui peut être attribué à l'électro-oxydation du monomère pyrène en son radical cation permettant d'initier l'électropolymérisation.

Par rapport au pyrène, la fonctionnalisation par la biotine entraîne une diminution du potentiel d'oxydation associée à une forte diminution de l'intensité du signal passant de 276,5 à 14,3 μA . De plus, contrairement à la polymérisation du pyrène, les balayages successifs de potentiel entre 0 et 1 V conduisent à une forte diminution du pic anodique dès le deuxième cycle, puis à sa disparition totale, reflétant une passivation de la surface de l'électrode. Cette passivation indique la formation d'un film de poly(pyrène-biotine) empêchant la perméation du monomère.

Par ailleurs, la formation de ce film n'est pas indiquée par l'apparition d'une électroactivité propre à ce film comme observé précédemment avec le polypyrène. Ces phénomènes particuliers pourraient être liés à la faible solubilité de la biotine qui, une fois polymérisée par le pyrène, bloque la diffusion à travers le film.

Après l'étape d'électropolymérisation, le transfert dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ M LiClO}_4$ exempt de monomère, le voltampérogramme de l'électrode modifiée présente un pic d'oxydation à 0,57 V associé à un pic de réduction à 0,22 V (**Figure IV-4-B**). Ces signaux correspondent au film électroactif de poly(pyrène-biotine).

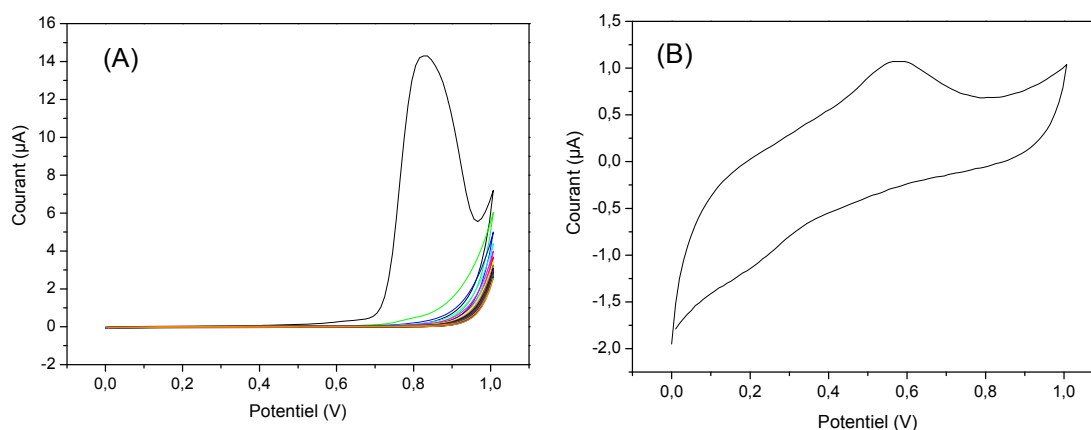


Figure IV-4: (A) Polymérisation par voltampérométrie cyclique du pyrène-biotine (2 mM dans l'acétonitrile) entre 0 et 1 V par rapport à 10 mM Ag^+/Ag sur électrode de Pt (5 mm de diamètre). (B) Caractérisation électrochimique de l'électrode précédemment modifiée dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ M LiClO}_4$. Vitesse de balayage 100 mV s^{-1} .

On se propose de déterminer le rendement d'électropolymérisation du pyrène et du pyrène-biotine pour connaître l'influence de la fonctionnalisation par la biotine sur le

rendement de l'électrolyse. L'électropolymérisation est effectuée par chronoampérométrie à 1,3 V sur électrode de platine nue. Le rendement électrique est déterminé en suivant le même principe que celui décrit au **Chapitre III** pour l'électropolymérisation du pyrrole-biotine. La quantité de monomères électropolymérisée ($\Gamma_{\text{réel}}$) est estimée par intégration de la charge enregistrée sous le signal rédox entre 0 et 1 V en considérant que 2,33 électrons sont consommés par molécule de pyrène (2 électrons pour les couplages radicalaires et 0,33 électrons pour l'oxydation du film formé) lors de l'électrolyse.

D'après les **Tableaux IV-1** et **IV-2**, le rendement de l'électrolyse pour une charge de 0,5 mC cm⁻² chute de 37 à 14 % suite à la fonctionnalisation du pyrène par la biotine et conduit à un film 2,7 fois moins épais. Les essais comparatifs réalisés pour des charges plus importantes à savoir 5 et 12,5 mC cm⁻² confirment nettement cette tendance. Il semblerait donc que la faible solubilité de la biotine combinée à des gênes stériques bloque le processus de polymérisation conduisant ainsi, dans le cas du pyrène-biotine, à des films fins.

Tableau IV-1: *Electropolymérisation du pyrène dans CH₃CN + 0,1 M LiClO₄⁻ sur électrode de platine (5 mm de diamètre) à potentiel contrôlé (E=1,3 V)*

| Q _{polymérisation} (C) | Q _{intégrée} (C) | $\Gamma_{\text{réel}}$ (mol.cm ⁻²) | $\Gamma_{\text{théorique}}$ (mol.cm ⁻²) | η (%) |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------|
| 5 10 ⁻⁴ | 2,57 10 ⁻⁵ | 4,12 10 ⁻⁹ | 11,32 10 ⁻⁹ | 37 |
| 10 ⁻³ | 3,53 10 ⁻⁵ | 5,65 10 ⁻⁹ | 22,65 10 ⁻⁹ | 25 |
| 2,5 10 ⁻³ | 3,37 10 ⁻⁵ | 5,39 10 ⁻⁹ | 56,62 10 ⁻⁹ | 10 |

Tableau VI-2: *Electropolymérisation du pyrène-biotine dans CH₃CN + 0,1 M LiClO₄⁻ sur électrode de platine (5 mm de diamètre) à potentiel contrôlée (E=1,3 V).*

| Q _{polymérisation} (C) | Q _{intégrée} (C) | $\Gamma_{\text{réel}}$ (mol.cm ⁻²) | $\Gamma_{\text{théorique}}$ (mol.cm ⁻²) | η (%) |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------|
| 5 10 ⁻⁴ | 9,47 10 ⁻⁶ | 1,51 10 ⁻⁹ | 11,32 10 ⁻⁹ | 14 |
| 10 ⁻³ | 4,45 10 ⁻⁶ | 7,12 10 ⁻¹⁰ | 22,65 10 ⁻⁹ | 3 |
| 2,5 10 ⁻³ | 6,83 10 ⁻⁶ | 1,1 10 ⁻⁹ | 56,62 10 ⁻⁹ | 2 |

Mon objectif étant la fonctionnalisation des SWCNTs, le comportement électrochimique du pyrène-biotine sur un dépôt de 3x20 μ L de la dispersion de nanotubes de carbone 0,1 mg mL⁻¹ préparée selon le protocole décrit au **Chapitre II** a été examiné (**Schéma IV-5**).

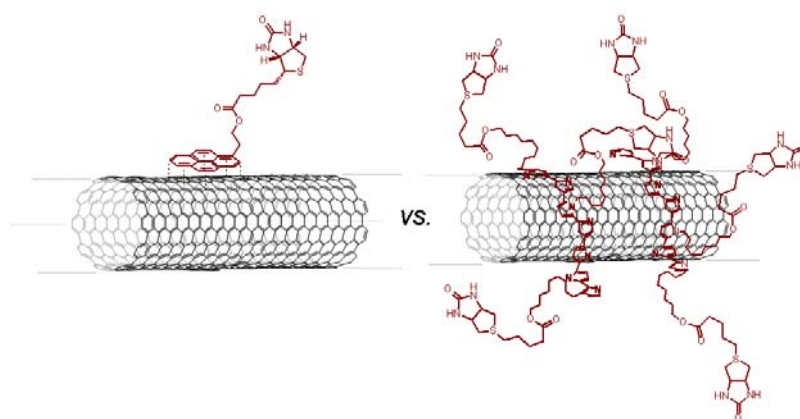


Schéma IV-5: *Fonctionnalisation des nanotubes de carbone par le poly(pyrène-biotine).*

Lors du premier balayage en oxydation entre 0 et 1 V, le voltampérogramme présente un pic irréversible à 0,85 V avec un courant de pic de 131,4 μA qui peut être attribué à l'oxydation du monomère pyrène en son radical cation (**Figure IV-5-A**). Cette augmentation considérable du courant de pic illustre l'augmentation importante de la surface de l'électrode due aux nanotubes. Comme observé avec une électrode de platine nue, des balayages successifs de potentiel entre 0 et 1 V entraînent une diminution brusque du pic anodique à partir du deuxième cycle sans apparition d'un système rédox du polymère. Le transfert dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ M LiClO}_4$ exempt de monomère permet d'observer le système rédox du poly(pyrène-biotine) composé d'un pic d'oxydation et d'un pic de réduction à respectivement 0,55 et 0,21 V.

Ces signaux correspondent au film de poly(pyrène-biotine) obtenu sur une électrode de platine nue mais avec des intensités de pic multipliées par un facteur 7. L'extension anodique du domaine de balayage jusqu'à 1,5 V a été envisagée afin d'améliorer la polymérisation du pyrène-biotine. Les balayages répétitifs de potentiel entre 0 et 1,5 V indiquent, lors du premier cycle, l'apparition d'un second pic d'oxydation irréversible à 1,34 V avec une intensité de 539 μA , qui disparaît progressivement à partir du second cycle (**Figure IV-5-B**). Le transfert dans une solution exempt de monomère conduit au même signal réversible du film polymère. Le second pic à 1,34 V pourrait être attribué à une suroxydation du film polymère formé, permettant un transfert d'électron plus complexe des dimères couplés et des espèces mono-oxydés par analogie avec le mécanisme d'électropolymérisation des carbazoles [23]. La persistance du signal rédox réversible confirme d'une part la présence du film à la surface de

l'électrode, d'autre part semble indiquer que la deuxième oxydation à un potentiel élevé ne change pas la nature du film.

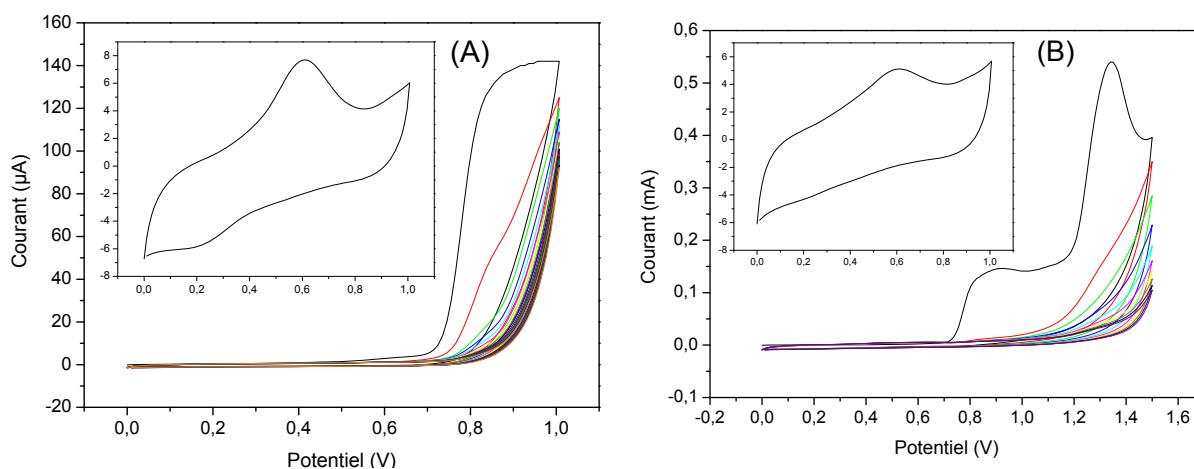


Figure IV-5: Polymérisation du pyrène-biotine (2 mM) dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ M LiClO}_4$ sur une électrode de Pt (5 mm de diamètre) recouverte de SWCNT par balayages de potentiel entre 0 et 1 V (A) et entre 0 et 1,5 V (B). Inset : Caractérisation des électrodes modifiées dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ M LiClO}_4$. Vitesse de balayage 100 mV s^{-1} .

Dans le but de préserver la surface sous-jacente de l'électrode de platine de toute modification et ainsi conserver une sensibilité maximale pour l'oxydation ou la réduction des espèces électroactives, nous avons conçu une stratégie de fonctionnalisation des SWCNTs par des dérivés pyréniques en deux étapes. Cette stratégie est basée sur l'adsorption par interactions π des pyrènes biotines sur les nanotubes puis, après rinçage, sur l'électropolymérisation des pyrènes adsorbés. Des électrodes de platine recouvertes de $3 \times 20 \mu\text{L}$ de la dispersion de nanotubes de carbone ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) ont été trempées dans une solution de pyrène-biotine (2 mM) dans CH_3CN pendant 30 minutes. Après rinçage avec une solution d'acétonitrile + 0,1 M LiClO_4 , des balayages successifs de potentiel entre 0 et 1 V sont appliqués à l'électrode dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ M LiClO}_4$. La **Figure IV-6-A** montre le pic d'oxydation du monomère pyrène-biotine à 0,85 V avec un courant de pic à 6,33 μA qui diminue progressivement à partir du second cycle. On constate par contre dans ce cas, l'apparition, à très faibles intensités, de pics d'oxydo-réduction du poly(pyrène-biotine). Après plusieurs balayages, l'électrode présente un pic d'oxydation à 0,55 V correspondant à l'électroactivité du polypyrène. Toutefois, le pic de réduction associé n'est pas visible (**Figure IV-6-B**). La faiblesse de l'intensité du système lié au squelette polypyrène indique la formation d'un film extrêmement fin de polypyrène sur le dépôt de nanotubes.

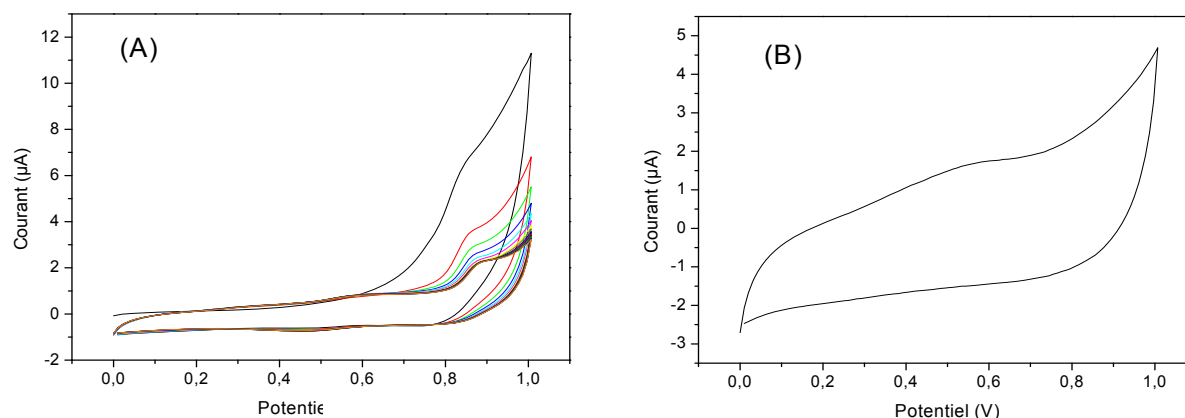


Figure IV-6: (A) Polymérisation par voltampérométrie cyclique dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1 \text{ M LiClO}_4$ des monomères pyrène-biotine adsorbés sur une électrode de Pt/SWCNT par balayage de potentiel entre 0 et 1 V (B) Caractérisation du polymère après plusieurs balayages. Vitesse de balayage 100 mV s^{-1} .

II. Application au développement de biocapteurs à glucose

II.1. Développement du biocapteur de référence à base de poly(pyrène-biotine) sans nanotubes de carbone

Nous avons d'abord optimisé une configuration à base de poly(pyrène-biotine) sur une électrode de platine, le film étant ensuite fonctionnalisé par une enzyme, la glucose oxydase, grâce aux interactions avidine-biotine. Cette électrode modifiée sera ensuite testée vis-à-vis de la détection de glucose, et ses performances serviront de référence pour déterminer l'influence des nanotubes de carbone et des différentes méthodes de fonctionnalisation. L'influence de l'épaisseur de la couche de poly(pyrène-biotine) (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 2,5 mC) sur les performances du biocapteur a montré que la meilleure sensibilité et le courant maximum à saturation en substrat sont obtenus pour une charge de polymérisation de 1,5 mC, le pyrène-biotine étant présent à 2 mM. Des couches plus épaisses de polymère conduisent à une chute de la sensibilité et du I_{max} suite au blocage de la surface. Pour une charge constante, nous avons également examiné l'influence du potentiel appliqué lors de l'électrolyse. La **Figure IV-7** montre la réponse du courant anodique du biocapteur en fonction de la concentration en glucose pour des films élaborés à 0,75 ; 1,25 et 1,3 V. La sensibilité de ces biocapteurs augmente de 0,47 à 0,68 $\text{mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ lors de l'augmentation du potentiel d'électrolyse de 0,75 à 1,3 V. La densité de courant maximum subit la même variation (**Tableau IV-3**).

Ce phénomène simple semble indiquer une polymérisation plus efficace à 1,3 V résultant d'une oxydation plus rapide des pyrènes et donc une concentration locale en radicaux cations plus élevée.

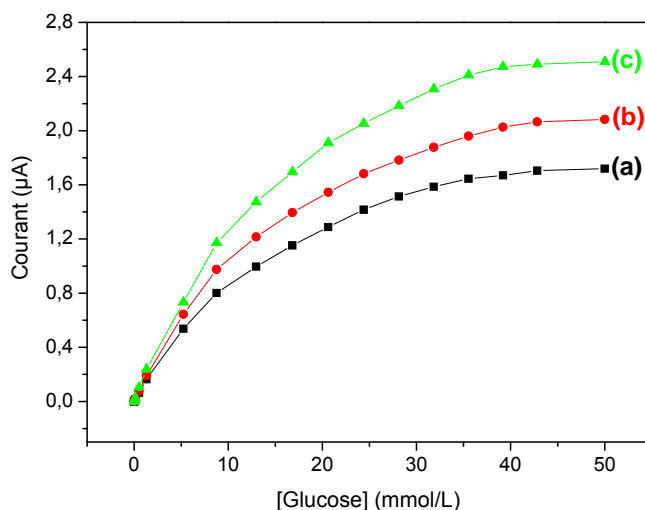


Figure IV-7: Influence du potentiel d'électropolymérisation du poly(pyrène-biotine) sur les performances du biocapteur à glucose qui en résulte. (a) 0,75 V ; (b) 1,25 V et (c) 1,3 V. Potentiel appliqué 0,6 V dans le tampon phosphate 0,1 M (pH 7).

Tableau IV-3: Caractéristiques des biocapteurs à glucose Pt/poly(pyrène-biotine)/avidine/GOX-B pour le dosage du glucose en fonction du potentiel électrogénérateur du film

| Potentiel de polymérisation (Charge 1,5 mC) | Sensibilité ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$) | Domaine de linéarité (mmol L^{-1}) | I_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$) | K_M apparent (mmol L^{-1}) |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0,75 V | 0,47 | $8 \cdot 10^{-4}$ à 8,76 | 8,78 | 10,16 |
| 1,25 V | 0,57 | $8 \cdot 10^{-4}$ à 8,76 | 10,6 | 10,4 |
| 1,3 V | 0,68 | $8 \cdot 10^{-4}$ à 8,76 | 12,8 | 10,16 |

II.2. Caractérisation physico-chimique des différentes étapes de réalisation d'assemblages moléculaires à base de nanotubes de carbone et de pyrène-biotine

Notre approche consiste à réaliser des biocapteurs à base de nanotubes de carbone et de pyrène-biotine en utilisant l'affinité entre l'avidine et la biotine afin de réaliser des bio-assemblages moléculaires tridimensionnels. On utilisera différentes techniques de fonctionnalisation des nanotubes de carbone par le pyrène-biotine (**Schéma IV-6**) à savoir la fonctionnalisation par adsorption en solution, par adsorption à la surface d'une électrode

recouverte de nanotubes, par électropolymérisation dans une solution de monomère ou par adsorption puis électropolymérisation dans une solution exempte de monomère.

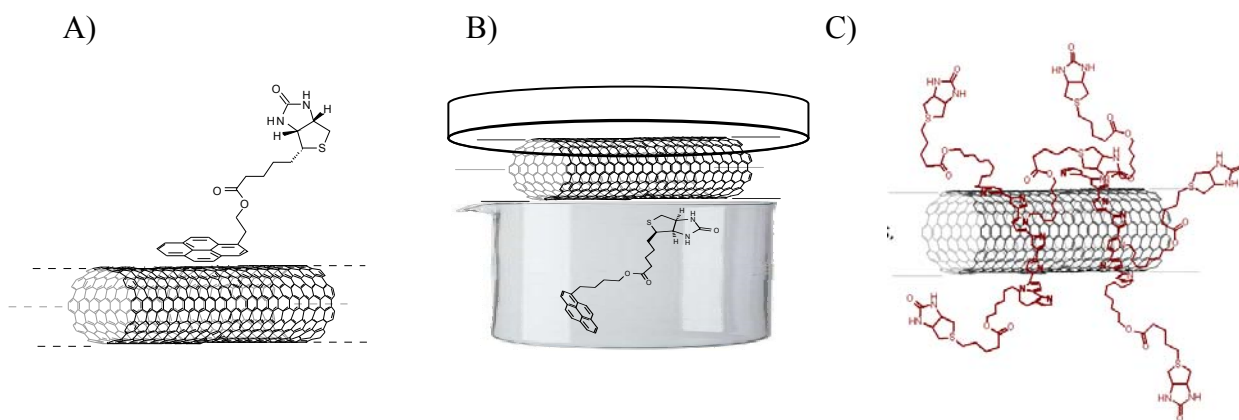


Schéma IV-6: Différentes techniques de fonctionnalisation des nanotubes de carbone par le pyrène-biotine. Fonctionnalisation en solution (A), par trempage (B) et par électropolymérisation (C).

Les différentes électrodes modifiées par les SWCNTs et le pyrène-biotine sont ensuite incubées pendant 20 minutes dans 20 μL d'avidine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) préparée dans le tampon phosphate à pH 7 afin de former une monocouche d'avidine. Cette monocouche permettra l'ancrage de l'enzyme biotinyllée à la surface de l'électrode par incubation dans 20 μL de glucose oxydase biotinyllée ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ dans un tampon phosphate à pH 7) pendant 20 minutes. Les électrodes sont rincées deux fois après chaque étape d'ancrage dans un tampon phosphate (pH 7) sous agitation. Le principe d'élaboration du biocapteur est représenté au [Schéma IV-7](#).

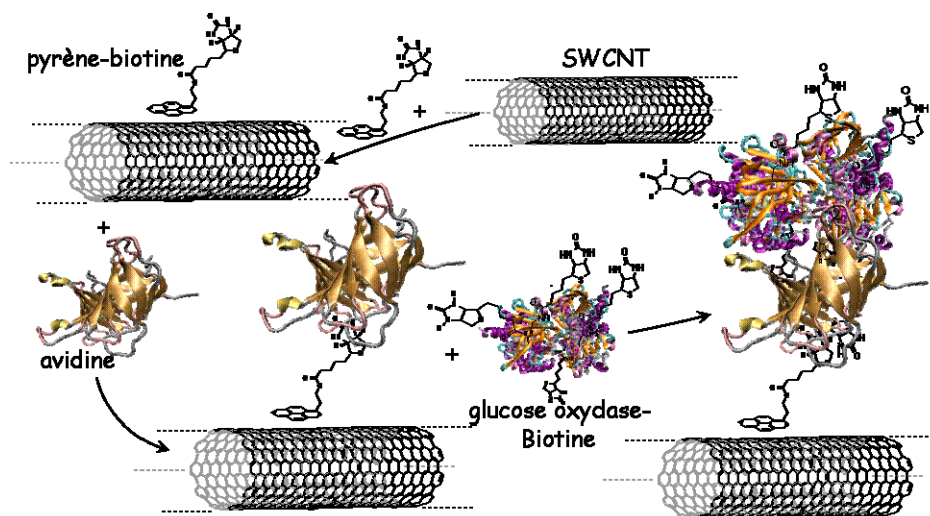


Schéma IV-7: Les étapes d'élaboration du biocapteur à glucose à base de pyrène-biotine.

II.2.1. Assemblage en solution des pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone par interaction π

Pour la fonctionnalisation des nanotubes de carbone par interactions π en solution, les nanotubes produits par le procédé HiPCo et prétraités selon la procédure indiquée au **Chapitre II** sont dispersés dans 150 mL de THF dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes. Après sédimentation des nanotubes non dispersés, la solution est décantée et on ajoute sous agitation 20 mg (40 μmol) de pyrène biotine. Après trois heures d'agitation à température ambiante, la liaison non-covalente est formée à la surface des nanotubes de carbone. La dispersion est filtrée à l'aide d'une membrane PTFE (taille des pores : 0,45 μm) et le filtrat est lavé avec du THF et du CH_2Cl_2 pour éliminer le pyrène-biotine non adsorbé à la surface des nanotubes.

a. Contrôle électrochimique des dépôts de SWCNT-pyrène-biotine

Suite à l'étape de fonctionnalisation des nanotubes de carbone par les groupements pyrène-biotine, il apparaît une différence de solubilité entre les nanotubes fonctionnalisés et ceux non modifiés. Afin d'estimer la quantité de nanotubes déposée sur une électrode de platine, j'ai développé une méthode reliant la charge capacitive induite par un balayage par voltampérométrie cyclique entre 0 et 0,6 V à la quantité de nanotubes de carbone. La fonctionnalisation des électrodes par les SWCNTs s'effectue via l'adsorption de solution de nanotubes de carbone. Ainsi, les dépôts sont réalisés en déposant 20 μL par 20 μL de la dispersion (0,1 mg mL^{-1}) préparée à partir de nanotubes de carbone fonctionnalisés par le pyrène-biotine en solution. La dispersion est homogène et stable après sonication pendant 20 minutes dans un bain à ultrasons. Chaque dépôt de 20 μL est suivi d'un séchage sous vide.

La **Figure IV-8** montre l'évolution de la charge en fonction du volume de nanotubes de carbone déposé sur l'électrode de platine (5 mm de diamètre). L'évolution de la charge est linéaire et augmente avec la quantité de SWCNT-pyrène-biotine comme observé précédemment pour les nanotubes de carbone non modifiés, indiquant la bonne corrélation entre la charge capacitive et la quantité de nanotubes adsorbée à la surface. Les valeurs de la charge et la pente de la courbe sont plus élevées dans le cas des nanotubes de carbone non modifiés que dans le cas des SWCNT-pyrène-biotine. Ceci reflète que la dispersion de SWCNTs non modifiés est plus concentrée que celle des SWCNT-pyrène-biotine. Ceci peut

être expliqué par la diminution de la solubilité des nanotubes de carbone suite à la fonctionnalisation. Visuellement, on constate d'ailleurs que la dispersion de SWCNT-pyrène-biotine est plus claire que celle des nanotubes non fonctionnalisés et que, lors du dépôt sur l'électrode, la couche est plus dense et plus foncée dans le cas des nanotubes non fonctionnalisés. Cette approche constitue une procédure simple pour contrôler la quantité des nanotubes de carbone déposée à la surface de l'électrode, facilitant ainsi la comparaison des différents dépôts et des différentes dispersions.

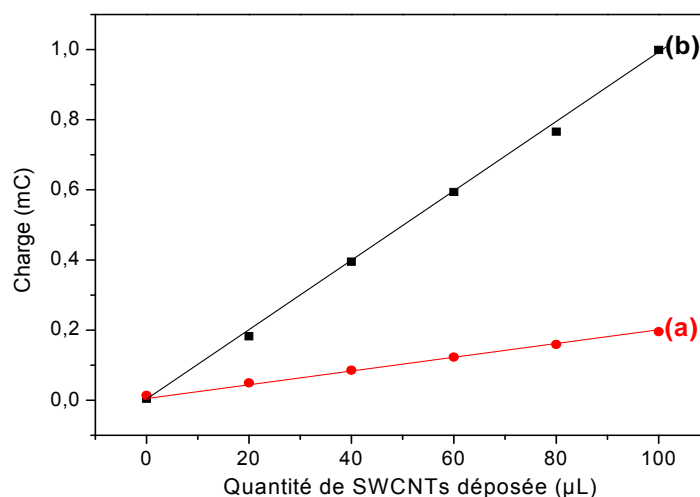


Figure IV-8: Comparaison de la répartition des charges entre les nanotubes prétraités (a) et les SWCNT-pyrène-biotine (b) à partir de la charge capacitive.

b. Présentation de l'ancrage de pyrène-biotine sur les SWCNTs par fluorescence et par microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour confirmer l'immobilisation des groupements pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone par liaison non-covalente, nous avons eu recours, comme dans le cas de l'électropolymérisation du pyrrole-biotine, à des mesures de fluorescence en utilisant la streptavidine modifiée par le fluorophore fluorescéine.

Un réseau de microélectrodes de platine est recouvert par un dépôt de 12 µL (3x4 µL) de la dispersion de nanotubes fonctionnalisés. Ces électrodes sont incubées dans 20 µL de streptavidine-fluorescéine (0,5 mg mL⁻¹) pendant 20 minutes dans l'obscurité. Le réseau est ensuite rincé avec du tampon phosphate (pH 7) puis à l'eau désionisée pour éliminer la streptavidine non immobilisée. Une excitation à une longueur d'onde de 490 nm entraîne une émission dans le vert en présence de la streptavidine fluorescéine.

L'efficacité de l'immobilisation de la streptavidine-fluorescéine sur les films de SWCNT-pyrène-biotine, et donc la biodisponibilité de la biotine, sont démontrées par

l'apparition de la fluorescence à la surface des microélectrodes (**Figure IV-9**). L'immobilisation de la streptavidine est plus localisée dans le cas de l'électro-polymérisation du pyrrole-biotine, le polymère se formant plus facilement à la surface des microspots qu'à celle des SWCNTs. Dans le cas des SWCNT-pyrène-biotine, la fluorescence est largement répartie entre les microélectrodes, indiquant l'ancrage de pyrène-biotine sur la totalité de la surface des SWCNTs.

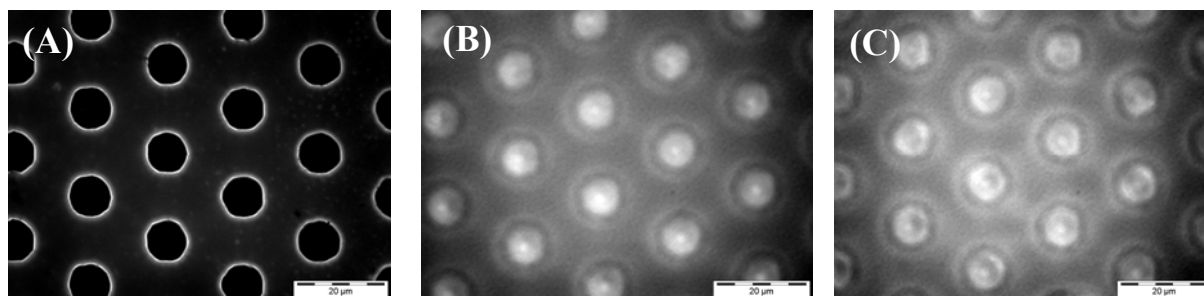


Figure IV-9: *Microélectrodes visualisées en microscope à fluorescence (x100) suite à une incubation dans la streptavidine-fluorescéine. Pt nue (A), Pt/SWCNT/poly(pyrrole-biotine) (B) Pt/SWCNT-pyrène-biotine (C).*

L'ancrage du pyrène-biotine sur les nanotubes a également été examiné par microscope électronique à balayage avant et après incubation avec une solution d'avidine. L'électrode de platine recouverte de SWCNT-pyrène-biotine est incubée dans l'avidine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) pendant 20 minutes. Les images en microscopie à balayage montrent un paquet épais de SWCNTs et de larges fagots présentant un aspect similaire à celui de nanotubes non modifiés (**Figure IV-10**).

Par contre, l'incubation avec de l'avidine conduit à des agrégats plus larges et plus ordonnés avec la même allure filamenteuse que dans le cas précédent, ce qui semble indiquer l'ancrage de la protéine avidine sur les nanotubes fonctionnalisés par la biotine, et l'établissement de liaisons entre les nanotubes via des ponts avidine.

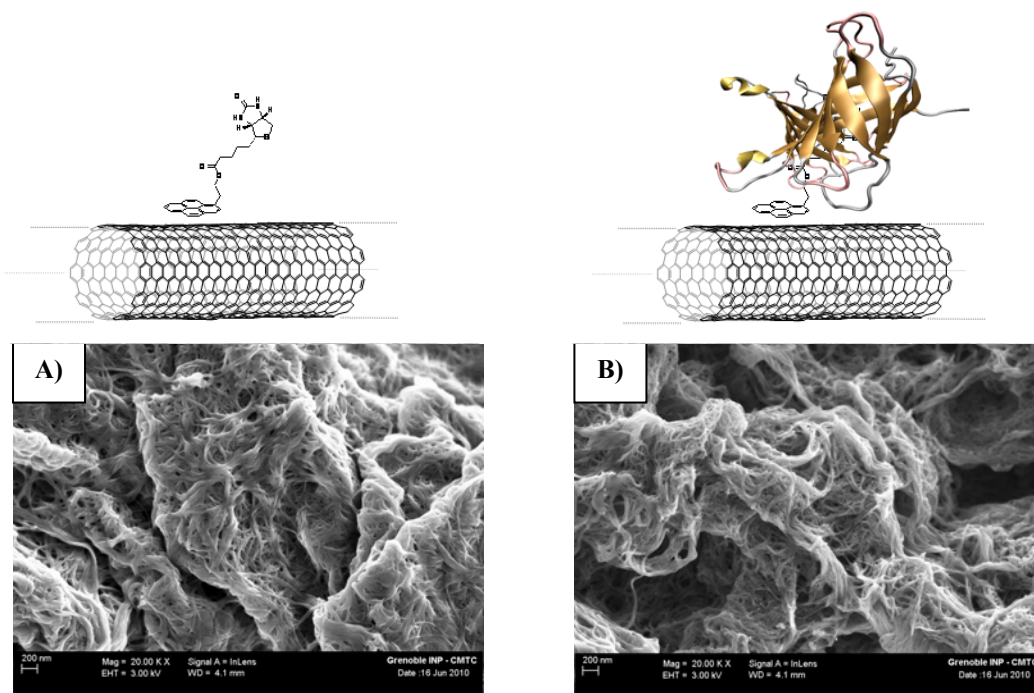


Figure IV-10: Images MEB de dépôts de SWCNT-pyrène-biotine avant (A) et après (B) incubation avec l'avidine.

c. Caractérisation par spectroscopie Raman

La caractérisation par spectroscopie Raman a été effectuée, d'une part afin d'évaluer la qualité structurale des nanotubes de carbone HiPCo suite à la fonctionnalisation non-covalente en solution par le pyrène-biotine, d'autre part afin de déterminer l'influence des différentes étapes d'élaboration du biocapteur sur la qualité structurale des nanotubes de carbone.

Sur le spectre correspondant au dépôt de SWCNT-pyrène-biotine (**Figure IV-11**), la zone des hautes fréquences comporte une bande G possédant deux pics (à 1587 et 1541 cm^{-1}), ainsi qu'une bande D (1325 cm^{-1}) d'intensité relativement faible. Le rapport des surfaces des pics D et G qui est en relation directe avec la formation de défauts sur les parois des nanotubes constituées par des carbonnes hybridés sp^2 augmente, mais légèrement par rapport aux nanotubes non fonctionnalisés (0,046), et devient égale à 0,052. Ceci peut être dû à la sonication additionnelle provoquant des défauts supplémentaires (La surface de la bande D augmente). On a utilisé la position des pics RBM pour déterminer le diamètre des échantillons suite à la fonctionnalisation en se servant de la loi empirique. La distribution de diamètre des nanotubes HiPCO suite à la fonctionnalisation reste très large, identique à celle des nanotubes non-fonctionnalisés, et est comprise entre 0,9 et 1,3 nm. L'ancrage de l'avidine et de la

glucose oxydase biotinylée ne modifie pas clairement les pics des bandes G et D, et le rapport des surfaces D/G reste faible indiquant que les différentes étapes de réalisation du biocapteur ne conduisent pas à la formation de défauts supplémentaires. La distribution du diamètre reste aussi identique suite à l'ancrage de l'avidine et de la glucose oxydase.

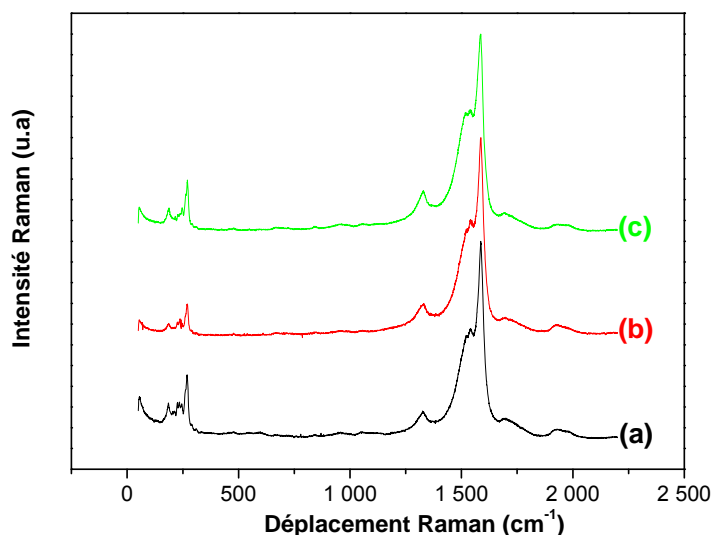


Figure IV-11: Spectres Raman des nanotubes de carbone pour les différentes étapes de construction du biocapteur à glucose. SWCNT-pyrène-biotine (a), Incubation dans l'avidine (b) puis incubation dans GOX-B (c).

d. Caractérisation par la technique de mouillabilité

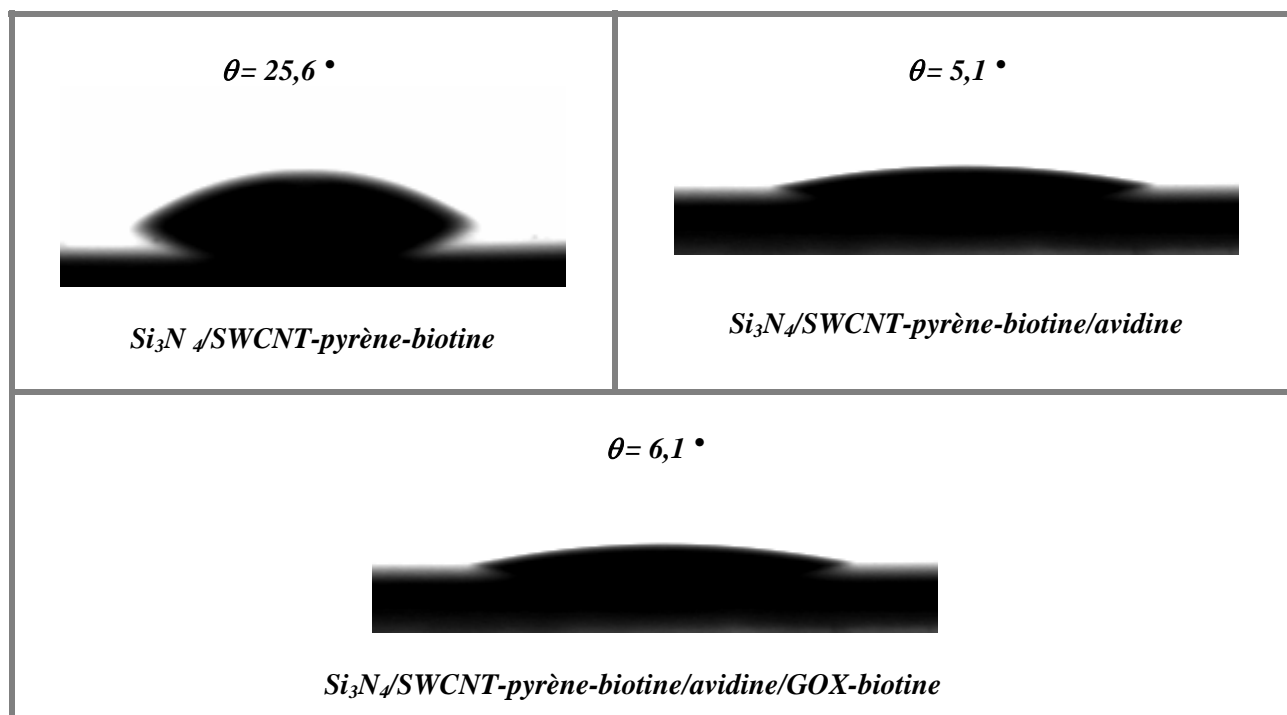
Nous avons également examiné l'évolution de la mouillabilité des nanotubes de carbone suite à leur fonctionnalisation successivement par le pyrène-biotine, l'avidine et la glucose oxydase biotinylée, et déterminé les caractéristiques thermodynamiques au cours de l'élaboration de l'assemblage SWCNT-pyrène-biotine/avidine/biotine-glucose oxydase. Nous utilisons l'eau comme liquide sonde pour caractériser le caractère hydrophile ou hydrophobe de l'électrode après chaque étape d'adsorption. Pour quantifier les propriétés énergétiques de surface relatives aux différents dépôts, nous avons déterminé l'énergie de surface ainsi que ses composantes basiques selon le modèle de Van Oss, ce qui permettra aussi d'accéder aux propriétés chimiques de la surface. Les trois liquides sondes utilisés sont le diiodométhane, le formamide et l'eau afin de comparer les propriétés de surfaces.

Lorsque la surface est couverte par des nanotubes de carbone prétraités mais non-fonctionnalisés, elle est légèrement hydrophobe ($\theta = 38,5^\circ$). La mesure dynamique de l'angle de contact de la surface de l'électrode recouverte de nanotubes de carbone fonctionnalisée par

du pyrène-biotine indique un caractère un peu plus hydrophile ($\theta = 25,6^\circ$) dû au caractère faiblement hydrophile des biotines (**Tableau IV-4**). Suite au dépôt des nanotubes de carbone fonctionnalisés par le pyrène-biotine, l'énergie de surface augmente ($57,4 \text{ mJ m}^{-2}$) par rapport à celle des nanotubes non fonctionnalisés ($55,4 \text{ mJ m}^{-2}$). La composante basique augmente aussi et devient égale à $42,6 \text{ mJ m}^{-2}$. Ceci peut être expliqué par le caractère basique des biotines et confirme le succès de l'ancrage des biotines sur les SWCNTs.

L'adsorption d'une mono-couche d'avidine sur le dépôt de SWCNT-pyrène-biotine conduit à une surface hyper hydrophile caractérisée par un angle de contact égal à 5° . Après incubation avec la glucose oxydase-biotine ($20 \mu\text{L}$), la surface reste hyper hydrophile ($\theta = 6^\circ$). Les résultats d'énergie de surface et ses composantes acides sont donnés dans le **Tableau IV-5** pour chaque étape d'élaboration du biocapteur. Les énergies de surface confirment la haute affinité entre les différentes couches du système "sandwich". Les couches étudiées ont une grande énergie libre de surface ($54,5 \text{ mJ m}^{-2} < \text{Energie libre} < 57,4 \text{ mJ m}^{-2}$). La composante basique élevée suite à l'ancrage de l'avidine peut être due à son caractère basique à pH neutre (le point isoélectrique de l'avidine est de 10,5 [32]). La diminution de la composante basique observée lors de l'adsorption de la couche de glucose oxydase-biotine est sans doute due au faible point isoélectrique de la glucose oxydase ($\text{pI} = 3,8$ [33]).

La caractérisation des nanotubes par mesure d'angle de contact nous a permis de contrôler le changement de mouillabilité suite à leur fonctionnalisation et de suivre l'élaboration du biocapteur via les changements des caractères thermodynamiques : basicité ou acidité et énergie libre de la surface.

Tableau IV-4: Valeurs d'angle de contact et image de la goutte d'eau déposée sur l'électrode Pt/SWCNT-pyrène-biotine/avidine/GOX-B au cours de diverses phases de traitement.**Tableau IV-5 :** Energie de surface et ses composantes selon le modèle de Van Oss pour l'électrode à base de SWCNT-pyrène-biotine suite à chaque étape de biofonctionnalisation.

| Electrode | Θ_{Eau} (°) | Θ_{Form} (°) | Θ_{Diiod} (°) | Energie (mJ/m ²) | γ_{OH^-} (mJ/m ²) |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Si₃N₄/SWCNT</i> | 38,5 | 17,5 | 40,9 | 55,4 | 31,6 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT-pyrène-biotine</i> | 25,6 | 7,7 | 38,8 | 57,4 | 42,6 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT-pyrène-biotine/avidine</i> | 5,1 | 15,6 | 39,5 | 54,5 | 57,6 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT-pyrène-biotine/avidine/GOX-biotine</i> | 6,1 | 9,4 | 48,4 | 57,3 | 54,7 |

II.2.2. Assemblage des pyrène-biotine par interaction π sur électrode recouverte de nanotubes de carbone

On se propose, dans un second lieu, d'accrocher les pyrènes-biotine sur une électrode recouverte de nanotubes de carbone par simple adsorption. Pour cela, 60 μL ($3 \times 20 \mu\text{L}$) de nanotubes de carbone prétraités sont adsorbés sur une électrode de platine selon la procédure

décrite au **Chapitre II**. L'électrode est en suite trempée pendant 20 minutes dans une solution d'acétonitrile contenant du pyrène-biotine (2 mM).

a. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

Avant de réaliser et de caractériser le biocapteur à glucose à base de pyrène-biotine adsorbés sur des nanotubes de carbone, nous nous proposons de vérifier la morphologie des nanotubes de carbone par microscopie à balayage électronique (MEB) suite à l'adsorption des pyrène-biotine. La **Figure IV-12** représente un dépôt de SWCNT ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ dans THF) à la surface d'une électrode de platine. Après trempage de cette électrode dans une solution de pyrène-biotine suivi par un rinçage drastique, l'image MEB ne montre aucune différence entre les nanotubes avant et après modification avec le dérivé pyrène, ce qui confirme que le traitement par adsorption n'affecte pas la morphologie des nanotubes. Par contre, l'ancrage de l'avidine conduit à des agrégats plus larges et plus ordonnés avec une même allure filamenteuse. Il semblerait donc que l'avidine agisse comme un liant entre les nanotubes fonctionnalisés par les biotines en raison de ses quatre sites d'ancrage.

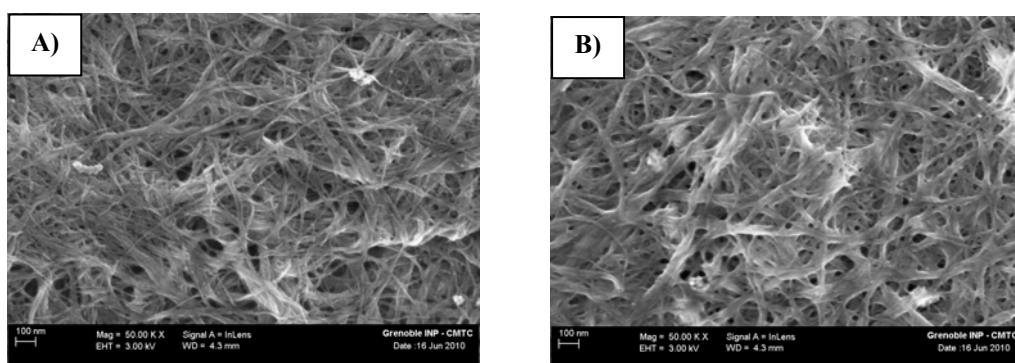


Figure IV-12: Images MEB d'un film SWCNT fonctionnalisé par trempage dans une solution 2 mM de pyrène-biotine avant (A) et après (B) incubation dans l'avidine.

b. Caractérisation par spectroscopie Raman

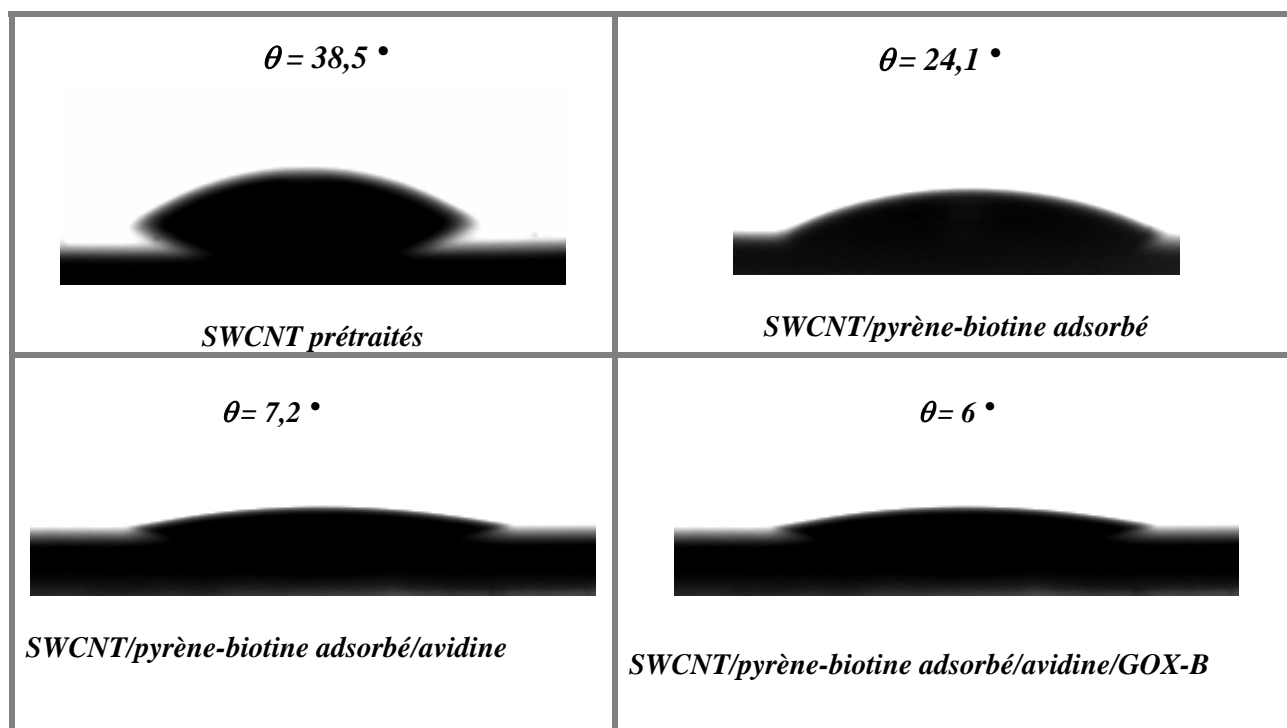
Suite à l'adsorption des pyrènes-biotine sur les nanotubes de carbone, on observe des pics des bandes D et G identiques à ceux des nanotubes de carbone non fonctionnalisés ce qui reflète la nature non-dénaturante de cette méthode douce de fonctionnalisation. Par contre, le rapport des surfaces des bandes D/G diminue légèrement et devient égale à 0,043. Ce phénomène semble indiquer la présence d'interactions π entre les nanotubes de carbone et les

groupements pyrène. Ces groupements adsorbés pourraient colmater les défauts présents sur les parois des tubes. La surface de la bande G augmente entraînant alors une diminution du rapport des surfaces D/G. Lors de l'adsorption de l'avidine et de la glucose oxydase biotinylée, aucune modification des pics D et G n'est observée. Le rapport de surfaces des bandes D/G reste aussi faible et identique à celui obtenu précédemment ce qui semble indiquer l'absence de changement des diamètres des nanotubes HiPCo suite aux différentes étapes de réalisation du biocapteur basé sur l'adsorption du pyrène.

c. Caractérisation par la technique de mouillabilité

On étudiera la caractérisation thermodynamique des nanotubes de carbone suite à l'adsorption du pyrène-biotine puis après chaque étape d'incubation conduisant à la réalisation du biocapteur à glucose. Lorsque la surface est couverte par des nanotubes de carbone prétraités, la surface est légèrement hydrophobe ($\theta = 38,5^\circ$). Suite à l'adsorption du pyrène-biotine, la surface devient plus hydrophile ($\theta = 24,1^\circ$) ce qui confirme la réussite de la phase d'accrochage des pyrènes-biotine aux nanotubes de carbone (**Tableau IV-6**). Il faut noter que l'angle de contact ($24,1^\circ$) est légèrement inférieur à celui enregistré précédemment ($25,4^\circ$) pour le dépôt des nanotubes de carbone fonctionnalisés en solution. Ceci pourrait indiquer une immobilisation plus importante de pyrène-biotine par trempage. L'énergie de surface augmente légèrement ($56,8 \text{ mJ m}^{-2}$) par rapport aux nanotubes non fonctionnalisés ($55,4 \text{ mJ m}^{-2}$). La composante basique augmente aussi légèrement et devient égale à $44,7 \text{ mJ m}^{-2}$.

Comme précédemment, l'ancrage d'une mono-couche d'avidine conduit à une surface plus hydrophile caractérisée par un angle de contact égal à $7,2^\circ$. Cependant, le dépôt d'une couche de glucose oxydase-biotine ne change pas le caractère hydrophile de la surface ($\theta = 6^\circ$). Les résultats d'énergie de surface rassemblés dans le **Tableau IV-7** confirment l'affinité entre les différentes couches du système "sandwich".

Tableau IV-6: Valeurs d'angle de contact et image de la goutte d'eau déposée sur l'électrode Pt/SWCNT/pyrène-biotine adsorbé/avidine/GOX-B au cours de diverses phases de traitement**Tableau IV-7 :** Evolution de l'énergie de surface et de ses composantes selon le modèle de Van-Oss pour une électrode recouverte de SWCNT incubée successivement dans du pyrène-biotine, de l'avidine et de la glucose oxydase biotinylée.

| Electrode | Θ_{Eau} (°) | Θ_{Form} (°) | Θ_{Diiod} (°) | Energie (mJ m ⁻²) | γ_{OH^-} (mJ m ⁻²) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>Si₃N₄/SWCNT</i> | 38,5 | 17,5 | 40,9 | 55,4 | 31,6 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT/pyrène-biotine</i> | 24,1 | 10,5 | 38,1 | 56,8 | 44,7 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT/ pyrène-biotine/avidine</i> | 7,2 | 11,0 | 42,4 | 56,2 | 55,2 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT/ pyrène-biotine /avidine/biotine-glucose oxydase</i> | 6 | 17 | 45 | 55,5 | 48 |

II.2.3. Assemblage par électro-polymérisation du pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone

L'accrochage des pyrènes-biotine est effectué par électro-polymérisation du pyrène-biotine sur une électrode de platine recouverte de nanotubes de carbone (3x20 µL de la

dispersion de nanotubes de carbone prétraités de concentration $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$). L'électrolyse se fait dans une solution d'acétonitrile contenant 2 mM de pyrène-biotine au potentiel imposé de $1,3 \text{ V}$ à une charge de $1,5 \text{ mC}$.

a. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

Suite à l'étape d'électropolymérisation des pyrènes-biotine, l'étude de la morphologie des électrodes qui en résulte a été effectuée par microscopie électronique à balayage (MEB). Une polymérisation électrochimique des groupements pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone ($1,5 \text{ mC}$ à $1,3 \text{ V}$) n'affecte pas la topographie et la morphologie (**Figure IV-13**) quoiqu'un film polymère semble apparaître à la surface des tubes. L'ancrage de l'avidine crée une sorte d'enveloppe autour des nanotubes.

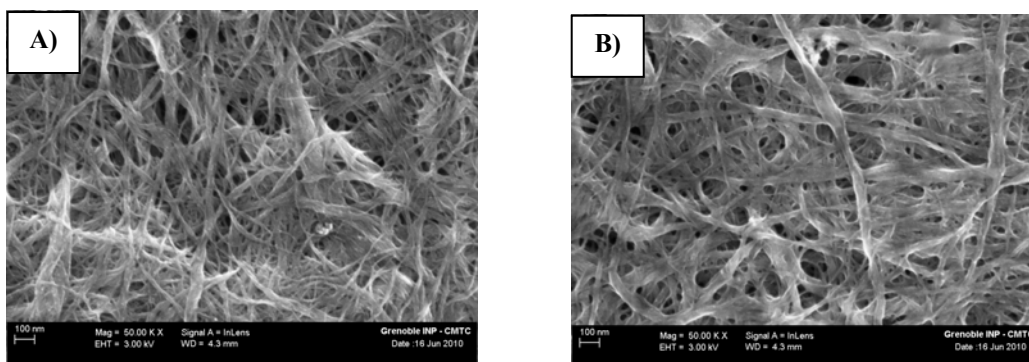


Figure IV-13: Images MEB d'un film de nanotubes de carbone avant (A) et après (B) électropolymérisation du pyrène-biotine dans une solution 2 mM .

b. Caractérisation par spectroscopie Raman

Dans le cas de l'électropolymérisation du pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone, le spectre Raman montre les mêmes pics des bandes D et G que celui des nanotubes non fonctionnalisés. Le rapport de surfaces des bandes D/G obtenu est de $0,041$ ce qui montre que l'électropolymérisation n'affecte pas l'hybridation sp^2 des atomes de carbone formant les parois des tubes. Lors de l'adsorption de l'avidine et de la glucose oxydase, on observe la persistance des pics des bandes D et G qui apparaissent dans la même zone que précédemment. Le même rapport des intensités D/G ainsi que les mêmes diamètres des nanotubes sont obtenus pour les différentes étapes de formation des biocapteurs.

II.3. Réalisation de biocapteurs de glucose basés sur différentes techniques de fonctionnalisation de pyrène-biotine

II.3.1. Biocapteur à base d'assemblage en solution des pyrènes-biotine sur les nanotubes de carbone par interaction π

a. Biocapteur à base de 2x20 μL de SWCNT-pyrène-biotine

On utilisera dans cette partie les nanotubes de carbone fonctionnalisés en solution par le pyrène-biotine pour la conception de biocapteurs à glucose via l'ancrage d'avidine et d'enzyme par interactions affines. Les différentes étapes de réalisation du biocapteur sont décrites au [Chapitre III](#). La [Figure IV-14](#) montre la réponse ampérométrique du biocapteur en fonction de la concentration en glucose.

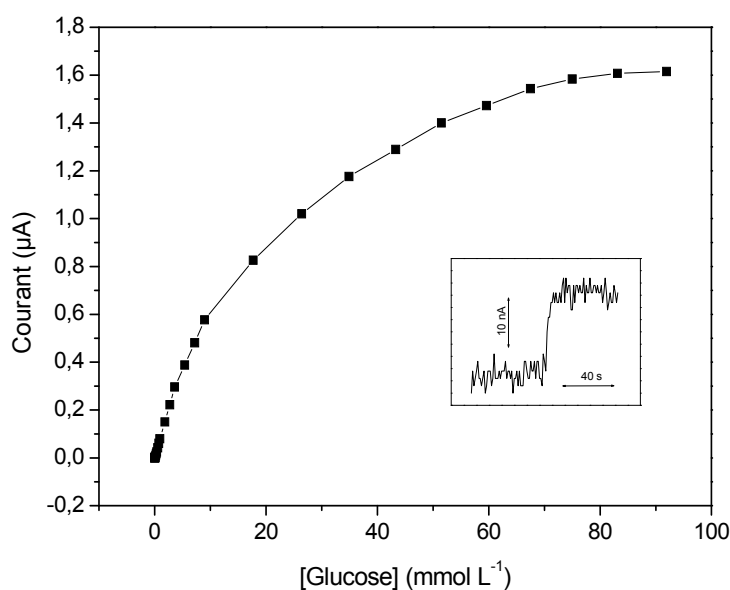


Figure IV-14: Courbe d'étalonnage du biocapteur à glucose à base de 40 μL de la dispersion de SWCNT-pyrène-biotine vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de 0,6 V vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7). **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $5,8 \cdot 10^{-4}$ M.

La sensibilité du biocapteur est de $0,42 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ avec un domaine de linéarité allant de $2 \cdot 10^{-3}$ à $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$. La densité de courant maximum est de $7,8 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ et la valeur du K_M apparent est de $15,53 \text{ mmol L}^{-1}$.

Ces performances démontrent l'ancrage de l'enzyme sur les SWCNTs, mais demeurent inférieures à celles enregistrées pour des films de poly(pyrène-biotine) électrogénérés sur des électrodes de platine. De plus, la valeur élevée du K_M apparent qui se

rapproche de la valeur du K_M en solution de l'enzyme semble indiquer une limitation par la concentration de glucose et non pas par celle d'oxygène. Ceci, généralement, reflète une faible densité d'activité enzymatique à la surface de l'électrode.

b. Influence de la quantité de SWNT-pyrène-biotine immobilisée à la surface de l'électrode

L'influence de la quantité de nanotubes de carbone fonctionnalisés sur les caractéristiques du biocapteur à glucose a été étudiée. Dans ce but, les courbes d'étalonnages de biocapteurs à base de 40 μL , 60 μL et 80 μL de nanotubes de carbone fonctionnalisés en solution par le pyrène-biotine ont été établies. Les dépôts se font 20 μL par 20 μL , puis chaque dépôt est suivi d'une étape de séchage sous vide. La **Figure IV-15** montre la réponse de ces biocapteurs en fonction de la quantité de nanotubes déposée. Il apparaît que la sensibilité au glucose de ces biocapteurs augmente linéairement en fonction de la quantité des nanotubes de carbone déposée. Les trois biocapteurs possèdent la même valeur de la constante apparente de Michaelis-Menten K_M^{app} (15,53 mM) (**Tableau IV-8**). Ceci semble indiquer que l'augmentation du dépôt de nanotubes de 40 à 80 μL n'affecte pas la cinétique du biocapteur et donc ne gêne pas la diffusion du glucose ni celle de H_2O_2 qui est détectée à la surface du platine.

Il faut souligner que le courant maximum augmente proportionnellement à la quantité de nanotubes déposée. Comme I_{max} reflète la quantité d'enzyme immobilisée, l'augmentation du dépôt de nanotubes conduit à une augmentation de la surface disponible pour l'ancrage de l'enzyme.

La meilleure configuration (80 μL) présente une sensibilité et un courant maximum à saturation (19,7 $\mu\text{A cm}^{-2}$) 50 % plus élevés que ceux déjà observés dans des films de poly(pyrène-biotine) (0,68 $\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ et 12,8 $\mu\text{A cm}^{-2}$ respectivement) et un domaine de linéarité plus étendu illustrant à lui seul l'intérêt des SWCNTs dans la fabrication du biocapteur.

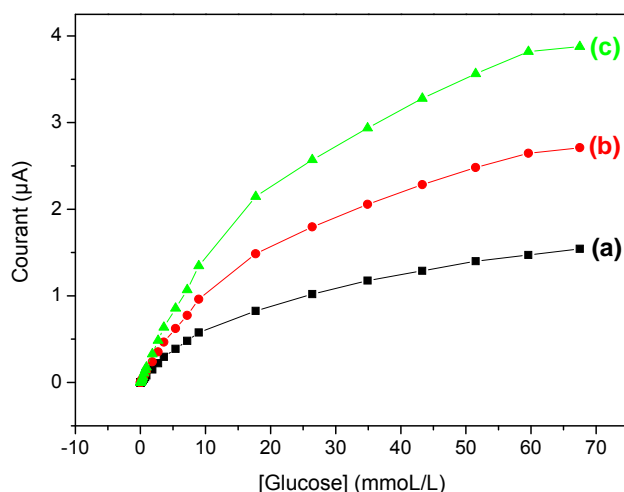


Figure IV-15: Courbes d'étalonnage du biocapteur à glucose à base de $2 \times 20 \mu\text{L}$ (a), $3 \times 20 \mu\text{L}$ (b) et $4 \times 20 \mu\text{L}$ (c) de la dispersion de SWCNT-pyrène-biotine vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de $0,6 \text{ V}$ vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7).

Tableau IV-8: Caractéristiques du biocapteur à glucose Pt/SWCNT-pyrène-biotine/avidine/GOX-B en fonction du nombre de couches de SWCNT-pyrène-biotine.

| Quantité de SWCNT (μL) | Sensibilité ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$) | Domaine de linéarité (mmol L^{-1}) | I_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$) | K_M apparent (mmol L^{-1}) | Temps de réponse (s) |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| 40 μL | 0,42 | $2 \cdot 10^{-3}$ à 3,6 | 7,8 | 15,53 | 18 |
| 60 μL | 0,62 | $2 \cdot 10^{-3}$ à 5,4 | 13,8 | 15,53 | 20 |
| 80 μL | 0,909 | $2 \cdot 10^{-3}$ à 3,6 | 19,7 | 15,53 | 25 |

c. Réalisation de structures tridimensionnelles à base de SWNT-pyrène-biotine

On utilisera dans cette partie la forte interaction entre l'avidine et la biotine afin d'obtenir des architectures tridimensionnelles nano-structurées composées de différentes couches d'enzymes. Ces structures tridimensionnelles sont élaborées sur des dépôts de 40, 60 et 80 μL de SWCNT-pyrène-biotine.

La **Figure VI-16-A** montre les courbes d'étalonnage obtenues pour le biocapteur correspondant au dépôt de 40 μL SWCNT-pyrène-biotine. L'élaboration de la structure tridimensionnelle est effectuée par incubation successive dans 20 μL d'avidine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) puis dans 20 μL de glucose oxydase-biotine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Les multi-couches sont obtenues en répétant ce processus d'incubation dans l'avidine puis dans la glucose oxydase biotinylée comme montré au **Chapitre III**. Nous avons ainsi fixé, par simple incubation, une à cinq couches d'enzyme à la surface de l'électrode. La caractérisation de ces structures

tridimensionnelles pour la détection du glucose est réalisée par des mesures ampérométriques dans un tampon phosphate (pH 7) par application d'un potentiel constant de 0,6 V.

On constate que l'immobilisation de différentes couches d'avidine et de glucose oxydase biotinylée pour un dépôt de 40 μL de SWCNT-pyrène-biotine entraîne une augmentation continue de la sensibilité et du courant maximum. Ceci indique une augmentation continue de la quantité de GOX-B immobilisée avec le nombre de couches d'enzyme déposée et l'absence de contraintes diffusionnelles pour H_2O_2 . Cette augmentation des performances avec l'augmentation du nombre de couches d'enzyme montre l'efficacité et la reproductibilité de l'élaboration de couches successives de protéines (**Tableau IV-9**). Le même type d'expérience est réalisé avec les électrodes modifiées par 60 et 80 μL de SWCNT-pyrène-biotine. L'augmentation du nombre de couches d'enzymes de 1 à 5 induit aussi, pour ces deux biocapteurs, une augmentation continue de la sensibilité et du courant maximum. Les tableaux de valeurs (**Tableau IV-10, 11**) et les courbes d'étalonnages (**Figure IV-16-B et IV-16-C**) résument ces phénomènes.

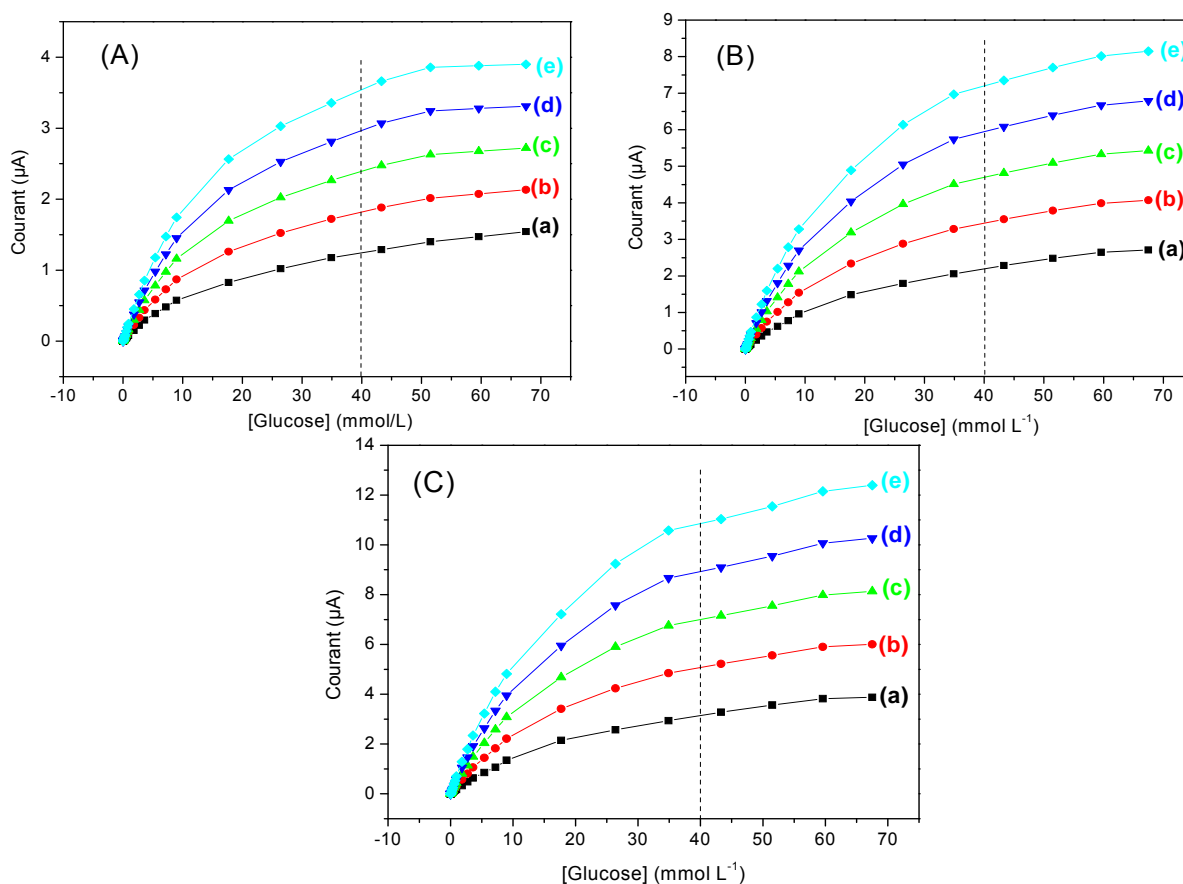


Figure IV-16: Courbes d'étalonnage des biocapteurs à base de 40 μL (A), 60 μL (B) et 80 μL (C) de SWCNT-pyrène-biotine en fonction du nombre de couches d'avidine et de GOX-B pour le dosage de glucose à 0,6 V.

Tableau IV-9: *Caractéristiques du biocapteur à glucose Pt/40 μ L SWCNT-pyrène-biotine/avidine/GOX-B en fonction du nombre de couches de GOX-B.*

| Nombre de couches de GOX-B | Sensibilité (mA M ⁻¹ cm ⁻²) | Domaine de linéarité (mmol L ⁻¹) | I _{max} (μA cm ⁻²) | K _M apparent (mmol L ⁻¹) | Temps de réponse (s) |
|----------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| 1 | 0,42 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 7,8 | 15,53 | 18 |
| 2 | 0,58 | 2 10 ⁻³ à 5,4 | 10,86 | 13,51 | 19 |
| 3 | 0,83 | 2 10 ⁻³ à 2,72 | 13,9 | 12,49 | 21 |
| 4 | 1,02 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 16,9 | 11,48 | 23 |
| 5 | 1,22 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 19,86 | 11,18 | 26 |

Tableau IV-10: *Caractéristiques du biocapteur à glucose Pt/60 μ L SWCNT-pyrène-biotine/avidine/GOX-B en fonction du nombre de couches de GOX-B.*

| Nombre de couches de GOX-B | Sensibilité (mA M ⁻¹ cm ⁻²) | Domaine de linéarité (mmol L ⁻¹) | I _{max} (μA cm ⁻²) | K _M apparent (mmol L ⁻¹) | Temps de réponse (s) |
|----------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| 1 | 0,62 | 2 10 ⁻³ à 5,4 | 13,8 | 15,53 | 20 |
| 2 | 1,08 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 20,73 | 13,51 | 22 |
| 3 | 1,39 | 2 10 ⁻³ à 5,4 | 27,71 | 13,94 | 23 |
| 4 | 1,89 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 34,68 | 13,79 | 25 |
| 5 | 2,3 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 41,59 | 13,5 | 27 |

Tableau IV-11: *Caractéristiques du biocapteur à glucose Pt/80 μ L SWCNT-pyrène-biotine/avidine/GOX-B en fonction du nombre de couches de GOX-B.*

| Nombre de couches de GOX-B | Sensibilité (mA M ⁻¹ cm ⁻²) | Domaine de linéarité (mmol L ⁻¹) | I _{max} (μA cm ⁻²) | K _M apparent (mmol L ⁻¹) | Temps de réponse (s) |
|----------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| 1 | 0,9 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 19,7 | 15,53 | 25 |
| 2 | 1,53 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 30,61 | 14,95 | 27 |
| 3 | 2,15 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 41,7 | 14,52 | 30 |
| 4 | 2,76 | 2 10 ⁻³ à 3,6 | 52,25 | 14,08 | 31 |
| 5 | 3,17 | 2 10 ⁻³ à 5,4 | 63,18 | 14,08 | 36 |

La **Figure IV-17** montre l'évolution du courant d'oxydation de H_2O_2 en fonction du nombre de couche d'avidine et de glucose oxydase biotinylée pour une concentration en glucose de 40 mM. Cette évolution est linéaire pour les dépôts de 40, 60 et 80 μL de SWCNT-pyrène-biotine.

En effet, le modèle électro-enzymatique de Michaelis-Menten, montre que dans la région de la saturation en substrat : $[S]_{sol} \gg K_M$ et $i = \alpha_{corr} z F V_{max}$

Le courant maximum est donc fonction d'une constante V_{max} et de la quantité de glucose oxydase ancrée à la surface de l'électrode.

De plus, l'augmentation de la pente est en bonne corrélation avec la quantité de nanotubes adsorbés à la surface de l'électrode. Ceci démontre la possibilité de moduler la quantité de SWCNTs déposée sur la surface et de contrôler, à l'échelle d'une couche de protéine, l'assemblage réalisé sur ces nanotubes. Enfin, il faut noter que nos édifices tridimensionnels offrent aux produits de la réaction enzymatique une excellente accessibilité à la surface de l'électrode de platine.

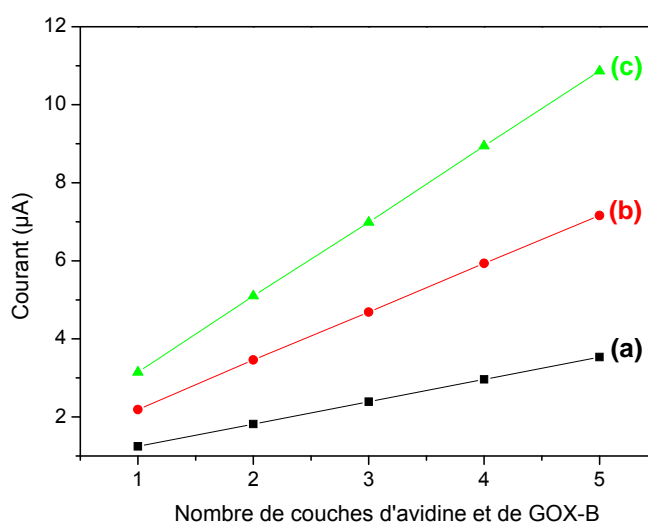


Figure IV-17 : Variation du courant d'oxydation pour 40 mM du substrat en fonction du nombre de couches d'avidine et de glucose oxydase immobilisées sur 40 μL (a), 60 μL (b) et 80 μL (c) de la dispersion de SWCNT-pyrène-biotine.

II.3.2. Biocapteur à base de pyrènes-biotine adsorbés sur des dépôts de nanotubes de carbone

Notre approche consiste à former une monocouche de pyrène-biotine sur des dépôts de nanotubes de carbone par simple trempage dans une solution de monomère de concentration 2 mM pendant 20 minutes. La monocouche est formée par interactions π entre les parois des

nanotubes et les groupements pyréniques. Le biocapteur est réalisé selon le même protocole que décrit précédemment.

La **Figure IV-18** montre la réponse du biocapteur en fonction de la concentration en glucose. La réponse ampérométrique de ce biocapteur présente une sensibilité nettement plus élevée ($1,4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) que celles observées pour les électrodes précédentes utilisant des nanotubes de carbone modifiés en solution par le pyrène-biotine.

Le domaine de linéarité est situé entre $8 \cdot 10^{-4}$ et $8,76 \text{ mM}$, la densité de courant maximum est de $25,32 \mu\text{A cm}^{-2}$, le temps de réponse est de 22 secondes, le K_M^{app} étant de $9,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Le I_{max} dépasse largement ceux des configurations précédentes. Ceci peut être expliqué par l'augmentation à la surface de l'électrode des groupements biotine accessibles pour l'avidine et donc pour la glucose oxydase.

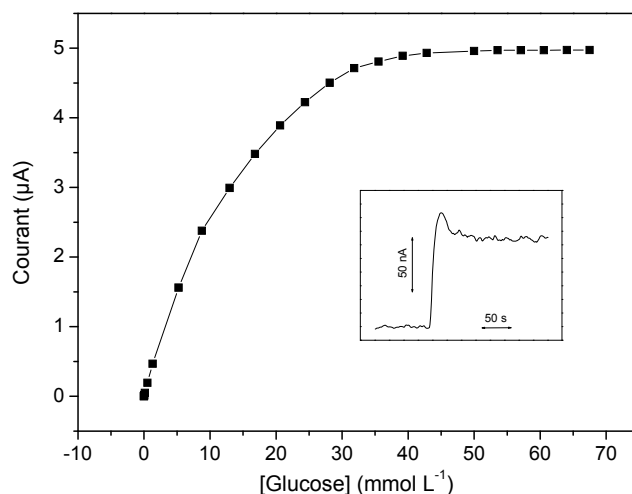


Figure IV-18: Courbes d'étalonnage du biocapteur à glucose à base de $3 \times 20 \mu\text{L}$ de nanotube de carbone et de pyrène-biotine adsorbé vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de $0,6 \text{ V}$ vs ECS dans le tampon phosphate ($\text{pH } 7$). **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

II.3.3. Biocapteur à base de pyrène-biotine polymérisés sur des dépôts de nanotubes de carbone

Dans le but de construire des structures tridimensionnelles à base de nanotubes de carbone et de poly(pyrène-biotine), on se propose d'électropolymériser un film polymère à la surface des tubes dans les mêmes conditions optimales que précédemment, à savoir une électrolyse de $1,5 \text{ mC}$ au potentiel de $1,3 \text{ V}$ dans une solution de pyrène-biotine (2 mM). Le biocapteur est réalisé comme précédemment par incubation de l'électrode successivement dans l'avidine et la glucose oxydase biotinyllée. Le biocapteur qui en résulte possède une

sensibilité au glucose de $0,54 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ avec un domaine de linéarité entre $8 \cdot 10^{-4}$ et $8,76 \text{ mM}$ et une densité de courant maximum de $9,7 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, le temps de réponse étant de 30 secondes et la valeur de K_M^{app} de $9,6 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Figure IV-19**). Ces performances, en recul par rapport aux précédentes configurations, peuvent être expliquées par la formation d'un film de poly(pyrène-biotine) sur les SWCNTs mais également à la surface du platine ce qui va gêner la diffusion de H_2O_2 et son oxydation électrochimique.

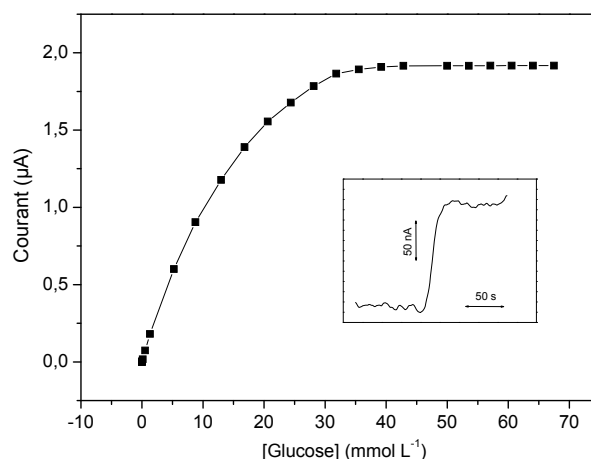


Figure IV-19: Courbe d'étalonnage du biocapteur à base de SWCNT et de poly(pyrène-biotine) vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de $0,6 \text{ V}$ vs ECS dans le tampon phosphate ($\text{pH } 7$). **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Afin de s'affranchir du phénomène de passivation de la surface de platine par le film de poly(pyrène-biotine) tout en conservant la stabilité apportée par la formation d'un film polymère, nous avons développé une nouvelle approche de fonctionnalisation des SWCNTs. Cette stratégie consiste à déposer des SWCNTs sur une électrode de platine, puis à les modifier par simple trempage dans une solution de pyrène-biotine (2 mM) et, enfin, à les électropolymériser par chronoampérométrie à $1,3 \text{ V}$ dans une solution exempte de monomère. Cette procédure devrait renforcer la monocouche de pyrène-biotine adsorbée sur les SWCNTs en conduisant à un poly(pyrène-biotine) équivalent à un second mur fonctionnel pour les nanotubes de carbone.

La **Figure IV-20** montre la courbe d'étalonnage de ce biocapteur avec une densité de courant maximum à saturation qui atteint $57,81 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$. La sensibilité au glucose est de $3,7 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ avec un domaine de linéarité allant de $8 \cdot 10^{-4}$ à $8,76 \text{ mM}$ et un temps de réponse de 14 secondes. La constante apparente de Michaelis-Menten est de $7,8 \text{ mM}$. La densité de courant maximum ($57,81 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$) est plus de deux fois plus importante que celle

obtenue pour la même configuration de biocapteur mais sans l'étape d'électropolymérisation. Ceci démontre qu'une certaine quantité des groupements pyrène-biotine se sont décrochés durant le processus d'incubation et de rinçage lors de la préparation du biocapteur par simple adsorption. En effet, à cause de la haute affinité entre l'avidine et la biotine, une seule molécule de pyrène-biotine peut être attachée à l'avidine. La solubilité et la taille de la protéine peut arracher les pyrènes-biotine de la surface des nanotubes. Ces groupements pyrène-biotine sont alors stabilisés par électropolymérisation. De plus, l'excellente sensibilité du biocapteur indique clairement que cette électropolymérisation n'affecte pas la diffusion à travers le dépôt de H_2O_2 , ni ne couvre la surface de l'électrode d'un film isolant.

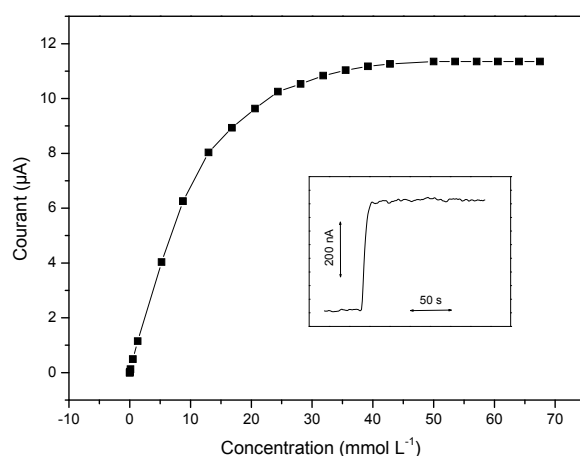


Figure IV-20: Courbe d'étalonnage du biocapteur à base de SWCNT et de poly(pyrène-biotine) obtenu dans une solution exempte de monomère vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de 0,6 V vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7). **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $1,3 \cdot 10^{-4}$ M.

II.3.4. Etude comparative des biocapteurs à glucose à base de pyrène-biotine et de nanotubes de carbone

Afin de déterminer la meilleure procédure de biofonctionnalisation des nanotubes de carbone, les performances des différents biocapteurs représentées par leur courbe d'étalonnage pour la détection du glucose sont comparées en fonction des différentes procédures d'attachement du pyrène-biotine sur les nanotubes de carbone (**Figure IV-21**).

Concernant le dépôt de SWCNT-pyrène-biotine, la densité de courant maximum du biocapteur est de $13,8 \mu A \text{ cm}^{-2}$ et la sensibilité est de $0,62 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Des valeurs semblables sont obtenues pour le biocapteur élaboré par électrolyse oxydative de 2 mM de pyrène-biotine, respectivement $0,54 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ et $9,72 \mu A \text{ cm}^{-2}$ pour la sensibilité et le I_{max} .

Quant à l'accrochage des pyrènes-biotine sur une électrode préalablement modifiée par des nanotubes de carbone par simple trempage, cette procédure conduit quasiment à un triplement des valeurs de sensibilité ($1,4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) par rapport aux deux biocapteurs précédents. De plus, la densité du courant maximum ($25,32 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$) qui reflète la quantité d'enzyme immobilisée dépasse largement les performances des configurations précédentes. Enfin, la dernière méthode, alliant trempage puis électropolymérisation du pyrène-biotine adsorbé, constitue l'approche la plus performante puisque la sensibilité et le I_{max} atteignent respectivement $3,7 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ et $57,81 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$. Il est à noter que la constante apparente de Michaelis-Menten varie de 7,8 à 15,5 mM pour toutes les configurations des biocapteurs. Ceci indique un comportement cinétique similaire pour tous les biocapteurs, facilitant la comparaison de leurs performances.

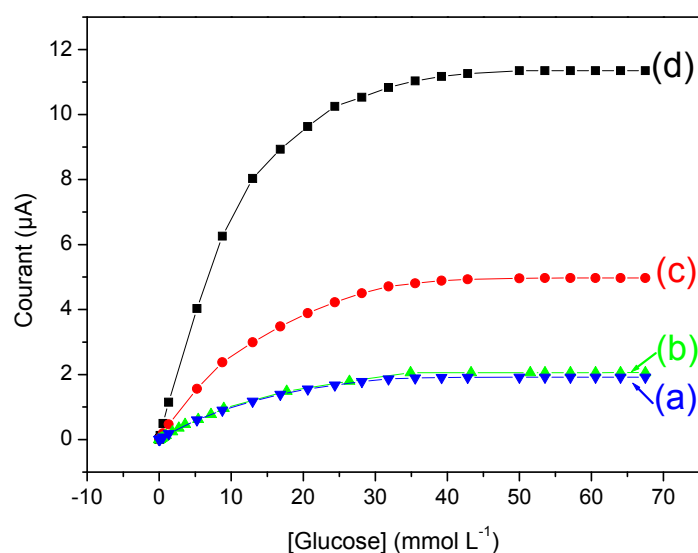


Figure VI-21: Courbes d'étalonnage relatives à des biocapteurs à base de SWCNT et de poly(biotine-pyrène) électropolymérisé dans une solution de monomère (a), pyrène-biotine accroché sur les SWCNTs avant dépôt sur l'électrode (b), pyrène-biotine obtenue par trempage dans une solution de pyrène-biotine (2 mM) suivie d'un rinçage (c), poly(pyrène-biotine) électropolymérisé dans une solution exempte de monomère suite à un trempage dans du pyrène-biotine (2 mM) (d). Toutes les électrodes sont modifiées par incubation dans l'avidine puis dans GOX-B. Les mesures ampérométriques sont réalisées dans un tampon phosphate (0.1 M) à pH 7, à 25°C et $E_{\text{app}} = 0,6 \text{ V}$.

III. Application au développement de biocapteurs à urée à base d'assemblage en solution des pyrènes-biotine sur les nanotubes de carbone par interaction π

Bien que l'approche trempage et électropolymérisation soit la plus performante, la méthode de fonctionnalisation par simple trempage présente de son côté l'avantage non négligeable de pouvoir être utilisée sur des surfaces non-conductrices. Je présenterai donc un exemple relatif au dosage de l'urée.

Le substrat utilisé est le Si/SiO₂/Si₃N₄ fourni par l'Institut de Microélectronique de l'Université de Neuchâtel (Suisse). Il est constitué d'une plaque monocristalline de silicium dopé p, d'orientation (100), d'épaisseur 400 μm et de résistivité 10 $\Omega\text{ cm}$, recouverte d'une couche de nitrure de silicium de 100 nm déposée par LPCVD (*Low Pressure Chemical Vapour Deposition*) à 750°C avec un rapport NH₃/SiH₂Cl₂ égal à 12 et une vitesse de croissance de 15 Å/min. L'indice de réfraction de la couche déposée est de 1,99. Le contact électrique de la face arrière est assuré par une couche d'aluminium. Après l'étape de nettoyage en utilisant le protocole indiqué au [Chapitre II](#), la fonctionnalisation de la structure se fait par étalement couche par couche, selon un protocole qui garantit la bonne interaction entre l'avidine et la biotine. La première étape consiste à étaler une goutte de 20 μL de la dispersion de nanotubes de carbone fonctionnalisée avec le pyrène-biotine déposé par la méthode de "spin-coating" (1500 tour/min) à la surface de l'électrode (1 cm^2). Cette technique simple et facile à mettre en œuvre peut conduire à l'obtention de couches uniformes. Après séchage à température ambiante de la structure pendant 15 à 30 minutes, l'électrode est incubée dans 20 μL d'avidine (1 mg mL^{-1} , préparée dans le tampon phosphate à pH 7). Une goutte de 10 μL d'uréase biotinylée (2,5 mg mL^{-1}) est étalée sur la couche d'avidine pendant 20 minutes selon le protocole décrit par Barhoumi *et al.* [34].

L'électrode obtenue par assemblage des différentes bio-couches est rincée à l'aide d'un tampon phosphate (pH 7) avant d'être stockée à 4°C.

Les structures obtenues sont caractérisées par la méthode électrochimique capacité-potentielle dans le but d'évaluer la réponse du biocapteur en présence d'urée. Cette méthode de mesure électrochimique C(V) consiste à effectuer un balayage de potentiel en utilisant une fréquence fixe de 10 kHz et une modulation de 10 mV. On a utilisé une cellule électrochimique à trois électrodes : une électrode au calomel saturée (ECS) utilisée comme électrode de référence, une contre électrode en platine et une électrode de travail

(Si/SiO₂/Si₃N₄). Les trois électrodes sont reliées à un analyseur (Voltalab 40 PGZ 301). Toutes les mesures sont réalisées à température ambiante dans une cage de Faraday en l'absence de lumière pour éviter les charges photo-induites dans le semi-conducteur.

Lorsque la structure est en équilibre thermodynamique et en absence de polarisation, le diagramme d'énergie montre que les bandes d'énergie ne sont pas plates et il se produit au niveau de l'oxyde une chute de potentiel. Le ΔV_{BP} est défini comme étant la polarisation qu'il faut appliquer pour faire disparaître la courbure des bandes d'énergie du semi-conducteur et atteindre la configuration dite « de bande plate » (**Schéma IV-8**). D'ailleurs, lorsque le semi-conducteur est mis en contact avec une phase conductrice, il y a transfert de charges afin d'aboutir à une situation d'équilibre qui se traduit par l'ajustement des niveaux de Fermi. A la suite de ce transfert de charges, un gradient se crée entre l'interface isolant/semi-conducteur et le volume du semi-conducteur. Le lieu où s'effectue ce transfert est appelé zone de charge d'espace (ZCE).

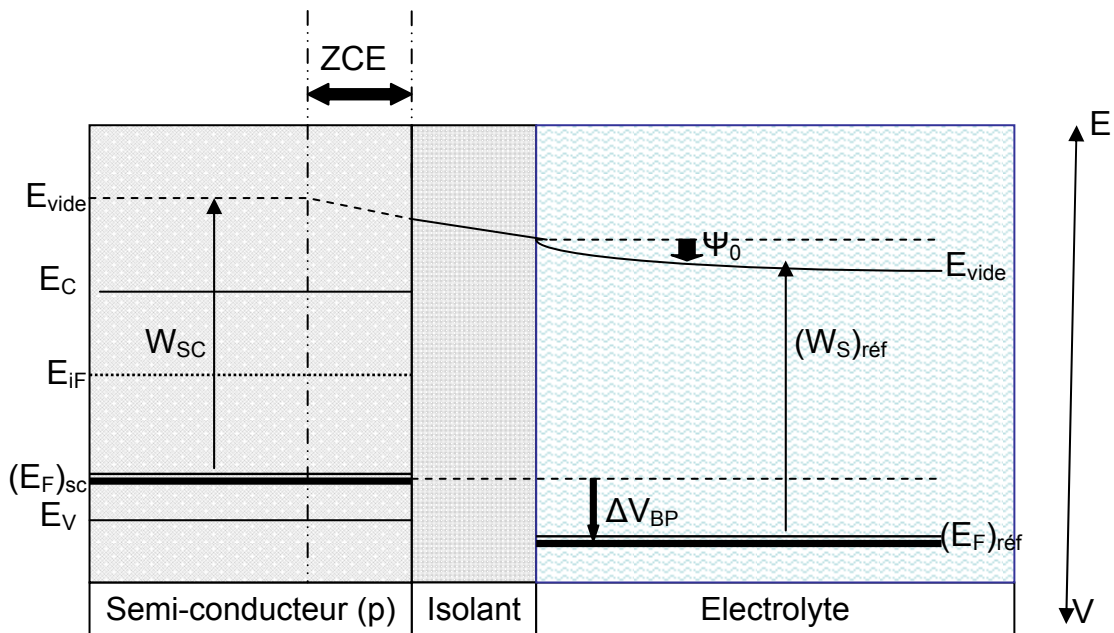


Schéma IV-8 : Diagramme de bande plate d'une structure EIS non polarisée.

avec : W_{sc} le travail de sortie du semi-conducteur, $(W_S)_{réf}$ le travail de sortie de l'électrode de référence, $(E_F)_{réf}$ le niveau de Fermi de l'électrode de référence, E_C l'énergie de la bande de conduction, E_V l'énergie de la bande de valence, $(E_F)_{sc}$ le niveau de Fermi du semi-conducteur, E_{vide} l'énergie du vide, et E_{iF} niveau de Fermi intrinsèque du semi-conducteur. L'énergie de Fermi correspond à l'énergie qui sépare les niveaux occupés des niveaux vides.

D'après le **Schéma IV-8**, on peut relier le potentiel de bande plate (V_{BP}) à la chute de potentiel dans l'électrolyte désigné par Ψ_0 par la relation suivante. On définit C_I la capacité de l'isolant et Q_F la charge fixe se trouvant dans l'isolant et à l'interface silicium/oxyde :

$$V_{BP} = (W_s)_{sc} - (W_s)_{réf} + \Psi_0 + Q_F/C_I$$

Plus la chute de potentiel dans l'électrolyte est importante, plus les phénomènes à la surface seront importants et le potentiel de bande plate bien défini. Pour traduire la dépendance électrique entre la concentration de la solution et la chute de potentiel de surface Ψ_0 , on considère que cette chute est localisée au voisinage immédiat de l'oxyde ce qui fait supposer que le reste de la solution électrolytique est équipotentielle. Donc, toute variation de la concentration est suivie d'une variation du potentiel de surface et d'une modification de la tension de seuil V_T [35-37]. Ceci entraîne un déplacement du potentiel de bande plate par rapport à sa position initiale, d'où une translation des caractéristiques en fonction de la polarisation. On peut mesurer le déplacement du potentiel de bandes plates et l'étudier en fonction de l'activité de l'ion spécifique. Donc la variation du potentiel de bande plate est une méthode de détection de la variation de la concentration d'un ion spécifique.

Le mécanisme qui explique la dépendance des paramètres électriques en fonction de l'activité de la solution contenant des ions spécifiques est le suivant : lorsque la concentration ionique varie à proximité de l'interface oxyde/électrolyte, la charge surfacique ainsi que la couche dipolaire vont être modifiées. Cette modification est due à la diffusion massive des ions de l'électrolyte vers l'interface solide/liquide jusqu'à leur fixation sur la partie sensible de la structure. L'équilibre de l'interaction physico-chimique entre les ions spécifiques et les sites de la surface est perturbé et une nouvelle distribution du potentiel s'établit. Le potentiel de surface Ψ_0 va suivre l'évolution de la nouvelle distribution des charges et sa variation est proportionnelle au logarithme de la concentration ionique.

La valeur du potentiel de bande plate est donnée par la relation de Mott-Schottky [38], développée pour les structure MIS (*Metal-Insulator-Semiconductor*) et généralisée aux structures EIS (*Electrolyte-Insulator-Semiconductor*). Le régime dans lequel le potentiel de bande plate est défini est le régime de désertion (faible inversion) qui encadre le point de fonctionnement. La **Figure IV-22** représente la courbe de variation de $1/C^2$ permettant de déterminer la valeur de ΔV_{BP} .

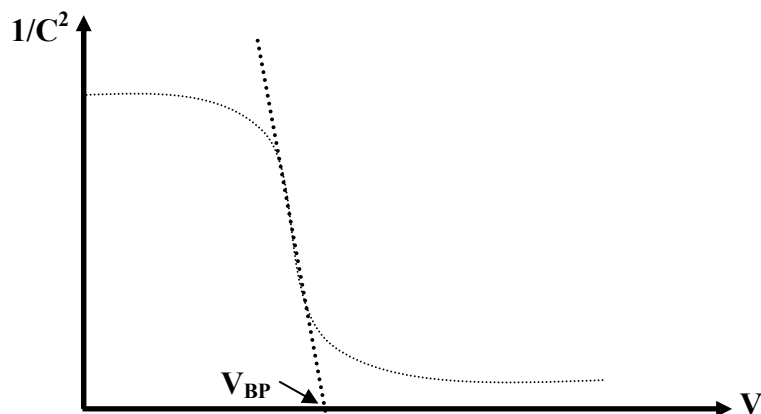
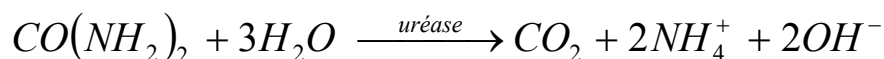


Figure VI-22: Courbes de variation de $1/C^2$ en fonction de V

La réaction d'hydrolyse de l'urée en présence d'uréase est représentée par l'équation suivante [34]:



Le principe de fonctionnement du biocapteur pour la détection de l'urée est basé sur la variation locale du pH à l'interface entre la biomembrane et le transducteur (Si/SiO₂/Si₃N₄). Dans notre cas, nous utilisons la réaction d'hydrolyse de l'urée par l'uréase qui induit une variation de pH. En effet, la réaction d'hydrolyse de l'urée génère des ions OH⁻ au sein de la biomembrane. Ces ions diffusent vers l'interface biomembrane/Si₃N₄ et provoquent le déplacement du potentiel de bande plate de l'électrode semi-conductrice (déplacement des caractéristiques C(V) vers les potentiels négatifs).

La **Figure IV-23** montre le spectre capacitance-potential du biocapteur pour différentes concentrations d'urée variant de $1,6 \cdot 10^{-5}$ à 0,2 M, enregistré dans un tampon phosphate à pH 7. Nous observons un déplacement de la caractéristique C(V) vers les potentiels négatifs lorsque la concentration en urée augmente.

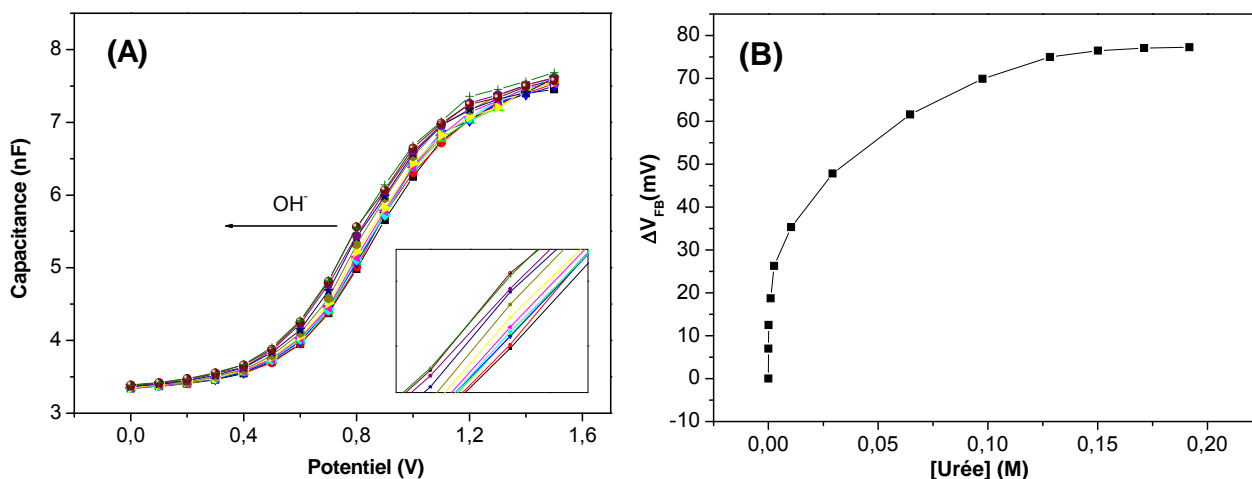


Figure IV-23: (A) *Spectre Capacitance-potentiel. Inset : Variation du potentiel de bande plate.* (B) *courbe d'étalonnage de la structure sandwich Si/SiO₂/Si₃N₄/SWCNT-pyrène-biotine/avidine/uréase-biotine pour différentes concentrations en urée.*

La courbe d'étalonnage donnée par la représentation de ΔV_{BP} (potentiel de bande plate) en fonction de la concentration de l'urée pour un dépôt de 20 μL SWCNT-pyrène-biotine présente un domaine linéaire compris entre 0,15 et 2,5 10^{-4} M; la sensibilité du biocapteur étant de 40 mV/pUrée dans cette gamme de concentration puis diminuant pour des concentrations plus faibles atteignant 10 mV/pUrée. Nous constatons que la saturation est obtenue pour une concentration en urée de 1,7 mM.

L'épaisseur de la couche sensible peut influencer les caractéristiques du biocapteur. Pour cette raison, nous avons fait varier la quantité SWCNT-pyrène-biotine à la surface de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄. Sur la [Figure IV-24](#), nous présentons la réponse du biocapteur basé sur plusieurs dépôts de 20 μL de SWCNT-pyrène-biotine étalés par "spin-coating". Nous observons une diminution de la sensibilité du biocapteur vis-à-vis de l'urée lorsque le nombre de couches augmente. Ceci est sans doute dû à l'augmentation de l'épaisseur de la couche qui entraîne une réduction de la diffusion des ions OH⁻ (provenant de la réaction de catalyse enzymatique) vers l'interface Si₃N₄/SWCNT-pyrène-biotine. La sensibilité du biocapteur décroît à 22 mV/pUrée pour 2x20 μL de SWCNT-pyrène-biotine, le domaine de linéarité étant compris entre 0,12 et 9,5 10^{-5} M. L'augmentation de la quantité de SWCNT-pyrène-biotine déposée (3x20 μL) entraîne encore une diminution de la sensibilité (17 mV/pUrée) ([Tableau IV-12](#)).

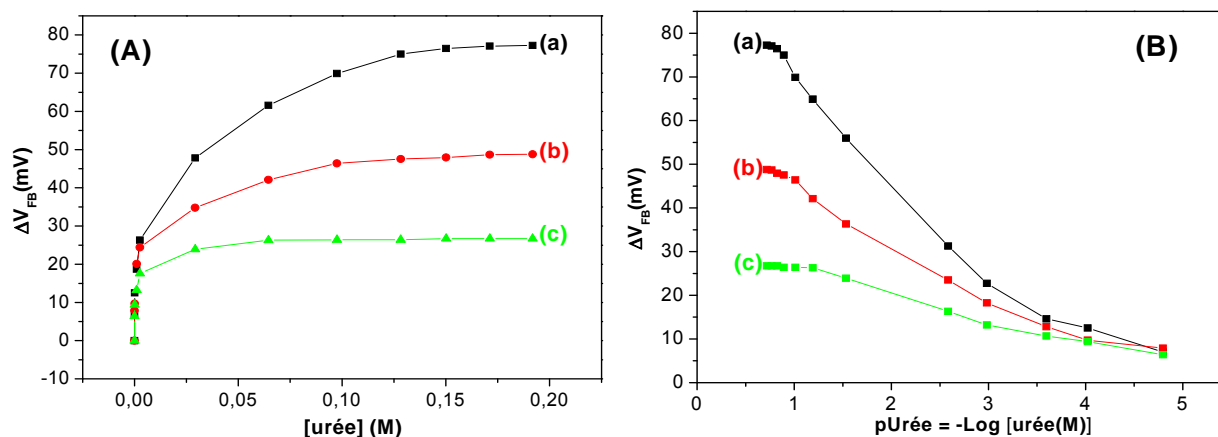


Figure IV-24 : (A) Courbes d'étalonnage de la structure $Si/SiO_2/Si_3N_4/SWCNT$ -pyrène-biotine/avidine/biotine-urée vis-à-vis de l'urée. (B) Variation du potentiel de bandes plates en fonction du $pUrea$ pour 20 μL (a), 2x20 μL (b) et 3x20 μL (c) de $SWCNT$ -pyrène-biotine

Tableau IV-12: Caractéristiques du biocapteur à urée $Si/SiO_2/Si_3N_4/SWCNT$ -pyrène-biotine/avidine/GOX-urée en fonction du nombre de couches de $SWCNT$ -pyrène-biotine.

| Dépôt de $SWCNT$ -pyrène-biotine | Sensibilité | Domaine de linéarité |
|----------------------------------|-------------|-------------------------|
| 20 μL | 40 mV/pUrée | 0,15 et 2,5 10^{-4} M |
| 40 μL | 22 mV/pUrée | 0,12 et 9,5 10^{-5} M |
| 60 μL | 17 mV/pUrée | 0,06 et 9,5 10^{-5} M |

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé la capacité des groupements pyrènes à s'adsorber sur les nanotubes de carbone par interaction π d'une part, et d'autre part à électropolymériser. Nous avons ensuite exploité la forte interaction spécifique "avidine-biotine" pour élaborer des capteurs enzymatiques. Différentes techniques de fonctionnalisation des nanotubes de carbone par le pyrène-biotine ont été analysées afin de définir l'approche la plus pertinente : le dépôt préalable de nanotubes non fonctionnalisés, suivi d'une étape de trempage pour l'ancrage du pyrène-biotine puis d'une électro-polymérisation pour stabiliser mécaniquement le pyrène-biotine immobilisé par interactions π . Parallèlement, l'efficacité de la fonctionnalisation de nanotubes par simple adsorption sans électro-polymérisation, a été démontrée via l'immobilisation d'une uréase et la fabrication d'un biocapteur à urée. Ceci illustre parfaitement la possibilité d'étendre cette stratégie de fonctionnalisation des nanotubes aux surfaces non-conductrices.

Références bibliographiques du chapitre IV

- [1] Robert J.Chen, Yuegang Zhang, Dunwei Wang, Hongjie Dai, *J.Am.Chem.Soc*, **2001**, 123, 3838
- [2] Taku Tanigaki, Hiromasa Nishikiori, Satoshi Kubota, Nobuaki Tananka, Morinobu Endo, Tsuneo Fujii, *Chemical Physics Letters*, **2007**, 448, 218
- [3] Gewu Lu, Gaoquan Shi, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2006**, 586, 154
- [4] Steven J.Teertstra, Wai Yau Lin, Mario Gauthier, Mark Ingratta, Jean Duhamel, *Polymer*, **2009**, 50, 5456
- [5] Daniel M.Connor, David M.Collard, Charles L.Liotta, David A.Schiraldi, *Dyes and Pigments*, **1999**, 43, 203
- [6] Mark S.Frahn, John M.Warman, Ruben D.Abellon, Leonard H.Luthjens, *Radiation Physics and Chemistry*, **2001**, 60, 433
- [7] Longdi Li, Zhongxiao Zhang, Wenqing Long, Aijun Tong, *Spectrochimica Acta A*, **2001**, 385-393
- [8] S.R.Pujari, M.D.Kambale, P.N.Bhosale, P.M.R.Rao, S.R.Patil, *Materials Research Bulletin*, **2002**, 37, 1641
- [9] Véronique de Halleux, Wael Mamdouh, Steven De Feyter, Frans De Schryver, Jérémy Levin, Yves Henri Geerts, *Journal of Photochemistry and Photobiology A, Chemistry*, **2006**, 178, 251
- [10] James N.Wilson, Yin Nah Teo, Eric T.Kool, *J.Am.Chem.Soc*, **2007**, 129, 15426
- [11] Stefano Burattini, Howard M.Colquhoun, Barnaby W.Greenland, Wayne Hayes, Mathew Wade, *Macromolecular Rapid Communications*, **2009**, 30, 459
- [12] Markus Marek, Karl Kaiser, Hermann J.Gruber, *Bioconjugate Chem*, **1997**, 8, 560
- [13] Excited states in organic chemistry, J.A.Barltrop, J.D.Coyle, Great Britain, **1975**
- [14] S.R.Pujari, M.D.Kambale, P.N.Bhosale, P.M.R.Rao, S.R.Patil, *Materials Research Bulletin*, **2002**, 37, 1641
- [15] Jyongsik Jang, Joon Hak Oh, *Advanced Materials*, **2003**, 12, 977

-
- [16] Huaping Li, Muhammet Erkan Kose, Liangwei Qu, Yi Lin, Robert B.Martin, Bing Zhou, Barbara A.Harruff, Lawrence F.Allard, Ya-Ping Sun, *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry A*, **2007**,185, 94
- [17] James V.Crivello, Faming Jiang, *Chem Mater*, **2002**, 14, 4858
- [18] Maciej Mazur, G.J.Blanchard, *J.Phys.Chem B*, **2004**, 108, 1038
- [19] Monika Dominska, Krustyna Jackowska, Pawel Krysinski, G.J.Blanchard, *J.Phys.Chem.B*, **2005**, 109, 15812
- [20] Chen Zhang, Yi Xu, Nachuan Wang, Yu Xu, Wenqin Xiang, Mi Ouyang, Chunan Ma, *Electrochimica Acta*, **2009**, 55, 13
- [21] R.J.Waltman, J.Bargon, *Can. J.Chem*, **1986**, 64, 76
- [22] Martha Aguilar-Martinez, Juan Manuel Reyna-Gonzalez, José Antonio Bautista-Martinez, Celso Palomar, Ernesto Rivera, *polymer Bulletin*, **2008**, 61, 461
- [23] J. F. Ambrose, R. F. Nelson, *J.Electrochem. Soc.*, **1968**, 115, , 1159
- [24] James F. Ambrose, Lawrence L. Carpenter, Robert F. Nelson, *Journal of the Electrochemical Society*, **1975**, 122, 876
- [25] S. Sadki, K.Kham, C. Chevrot, *Synthetic Metals*, **1999**, 101, 477
- [26] Olivier Stephan, Jean-Claude Vial, *Synthetic Metals*, **1999**, 106, 115
- [27] Serge Cosnier, Robert S.Marks, Jean-Paul Lellouche, Karine Perie, Daniel Fologea, Sabine Szunterits, *Electroanalysis*, **2000**, 12, 1107
- [28] Munetaka Oyama, Jun Matsui, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2004**, 570, 77
- [29] Robert J.Waltman, A.F.Diaz, J.Electrochem Bargon, *J.Electrochem.Soc : Electrochemical Science and technology*, **1985**, 132, 631
- [30] Kyung Moon Choi, Chung Yub Kim, Keu Hong Kim, *J.Phys Chem*, **1992**, 96, 3782
- [31] Handbook of polymer synthesis part B, Hans R.Kricheldorf, Oskar Nuyken, Graham Swift, second edition, New York, USA, **2005**
- [32] Andrea Zocchi, Anna Marya Jobé, Jean-Marc Neuhaus, Thomas R. Ward, *Protein Expression and Purification*, **2003**, 32, 167
- [33] Qiang Chen, Gregory L. Kenausis, and Adam Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4582
- [34] H. Barhoumi, A. Maaref, S. Cosnier, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *ITBM-RBM*, **2008**, 29, 192
- [35] N.F.De Rooji and P.Bergveld, *Thin solid films*, **1980**, 71, 327

[36] P.Bataillard, P.Clechet, N.Jaffrezic-Renault, X.G.Kong and C.Martelet, *Sensors and Actuators*, **1987**, 12, 245

[37] Nicole Jaffrezic Renault, Amitabha De, Paul Clechet and Abderrazak Maaref, *Colloids and Surfaces*, **1989**, 36, 59

[38] Hurwitz, Lamy., *Propriétés électriques des interfaces chargées*, Ed. Masson, 1978

Chapitre V :

*Application des nanotubes
de carbone aux
biocapteurs à glucose à
base de pyrène-
adamantane*

Chapitre V

Application des nanotubes de carbone aux biocapteurs à glucose à base de pyrène-adamantane

Introduction

La nature du système d'affinité permettant l'accrochage de la biomolécule à la surface de l'électrode est l'un des paramètres clés conditionnant les performances du biocapteur qui en résulte. L'utilisation du système d'affinité entre l'adamantane et la β -cyclodextrine [1-3] a déjà été utilisé pour l'élaboration de biocapteurs enzymatiques, afin de résoudre le problème de la couche intermédiaire de protéine exigée dans le cas du système d'affinité entre la biotine et l'avidine, tout en offrant une stabilité [4-6] et une réversibilité du système d'accrochage [7].

Dans ce chapitre, nous allons combiner les propriétés de sélectivité et de spécificité d'inclusion de l'adamantane dans la β -cyclodextrine avec celles des nanotubes de carbone, afin d'élaborer des biocapteurs à glucose. Pour cela, les nanotubes de carbone sont fonctionnalisés par le pyrène-adamantane en utilisant trois techniques. Dans une première approche, les nanotubes sont fonctionnalisés par des groupements pyrène-adamantane en solution organique en utilisant l'interaction π , puis sont déposés sur l'électrode. Les deux autres consistent d'abord par le dépôt de nanotubes non fonctionnalisés qui sera modifié, soit par l'adsorption directe du pyrène-adamantane à la surface des nanotubes, soit par l'électropolymérisation du monomère à la surface des nanotubes. L'enzyme, la glucose oxydase, portant des groupements β -cyclodextrine, s'accroche spécifiquement sur les entités adamantane fixées sur les nanotubes couvrant l'électrode.

I.Synthèse du pyrène adamantane : N-adamantyl-4-(pyren-1-yl)butanamide

La synthèse du N-adamantyl-4-pyrène-butanoïde (pyrène-adamantane) (**Schéma V-1**) est réalisée en mélangeant 290 mg d'acide-1-pyrène-butanoïque (1 mmol) dans 50 mL de dichlorométhane CH_2Cl_2 . On ajoute ensuite 150 mg (1 mmol) d'adamantylamine et 280 mg (1,2 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide DCC. Le mélange est laissé sous agitation pendant une semaine. La réaction est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CH_2Cl_2 , 100%). On filtre le solide obtenu, et la solution jaune contenant le produit est concentrée. La purification est effectuée par *flush* chromatographie ($\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

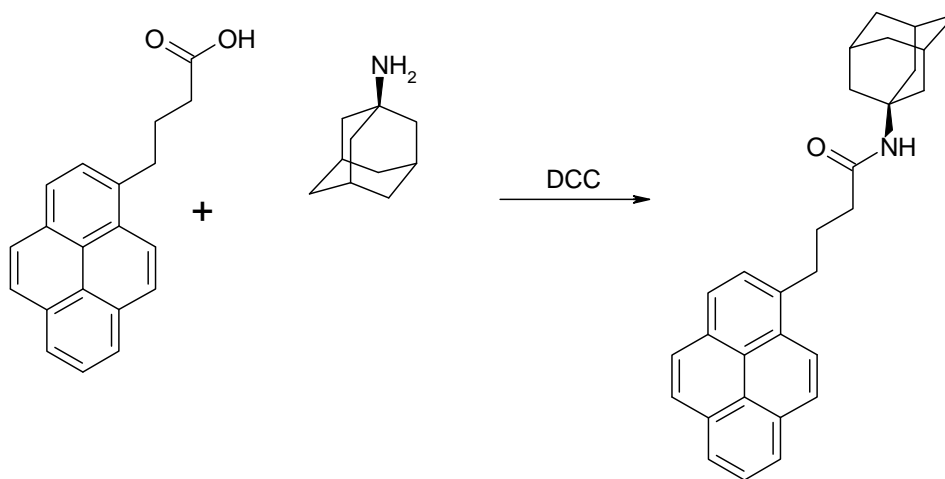


Schéma V-1: Synthèse du pyrène-adamantane.

Le pyrène-adamantane synthétisé (**Schéma V-2**) est ensuite caractérisé par résonance magnétique nucléaire RMN. Les résultats sont donnés ci-dessous.

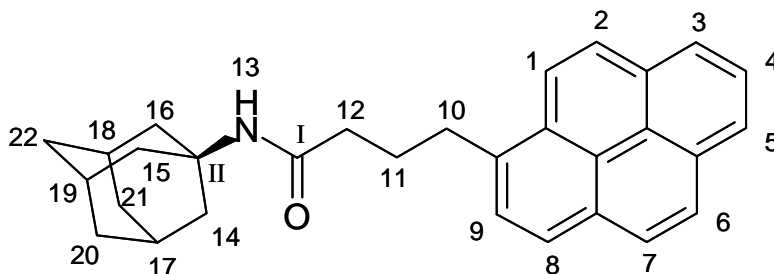


Schéma V-2: Structure chimique du pyrène-adamantane synthétisé.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ ppm = 8.31 ppm (d, 1H, **9**), 8.17 ppm (dd, 1H, **4**), 8.15 ppm (d, 1H, **1**), 8.11 ppm (2d, 2H, **2** et **7**), 8.02 ppm (2d, 2H, **3** et **8**), 8.00 ppm (d, 1H, **6**), 7.87 ppm

(d, 1H, **5**), 5.02 ppm (s, 1H, **13**), 3.39 ppm (2H, t, **12**), 2.05 ppm (m, 2H, **11**), 2.18 ppm (t, 2H, **10**), 2.16 ppm (6H, d, **14-16**), 1.98 ppm (m, 3H, **17-19**), 1.66 ppm (6H, t, **20-22**).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ ppm = 171 (1C, **I**), groupements pyrène (16C): 136.0 ppm (1C), 131.4 ppm (1C), 130.8 ppm (1C), 129.8 ppm (1C), 128.7 ppm (1C), 127.4 ppm (1C), 127.3 ppm (1C), 126.6 ppm (1C), 125.8 ppm (1C), 125.1 ppm (1C), 124.9 ppm (1C), 124.9 ppm (1C), 124.8 ppm (1C), 124.7 ppm (1C), 124.7 ppm (1C), 123.4 ppm (1C); 75.1 ppm (1C, **II**), 51.8 ppm (1C, **12**), 41.6 ppm (3C, **14-16**), 36.3 ppm (3C, **17-19**), 32.6 ppm (1C, **10**), 29.4 ppm (3C, **20-22**), 27.5 ppm (1C, **11**)

II. Caractérisation du pyrène-adamantane

II.1. Caractérisation par UV-Visible

On effectue une caractérisation du pyrène-adamantane par UV-Visible et par fluorescence afin de déterminer les modifications apportées aux pyrènes suite à la fonctionnalisation par les groupements adamantane. La **Figure V-1** montre le spectre d'absorption du pyrène avant et après fonctionnalisation par l'adamantane. Ces spectres sont semblables mais les pics se trouvent légèrement décalés de quelques nanomètres. Le spectre du pyrène-adamantane présente une série de pics situés à 345, 325 et 315 nm, une autre série de pic à 275, 265 et 255 nm, puis une troisième série située à 245, 235 nm. Ces pics correspondent parfaitement aux pics obtenus par le pyrène-biotine ce qui confirme que ce décalage de pics est dû à la mono-substitution du pyrène. Le coefficient d'extinction molaire qui correspond au maximum d'absorption situé à 245 nm est d'environ $\epsilon=65,04 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

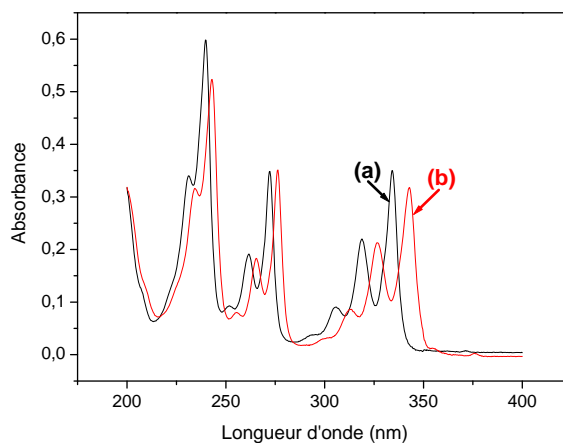


Figure V-1: Spectres d'absorbance du pyrène (a) et du pyrène-adamantane (b) à $8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

II.2. Caractérisation électrochimique

Le comportement électrochimique du pyrène-adamantane (2 mM) a été étudié dans l'acétonitrile + 0,1 M LiClO₄ sur une électrode de platine nue puis sur une électrode modifiée par des nanotubes de carbone afin de déterminer l'influence des nanotubes sur les caractéristiques de l'électro-polymérisation.

Pour l'électrode de platine nue, le monomère présente, lors du premier balayage dans le domaine anodique, un pic irréversible à 1,1 V. Ce pic est attribué à l'électro-oxydation du monomère pyrène en son radical cation qui initie l'électropolymérisation. Des balayages successifs entre les potentiels de 0 à 1,2 V par rapport à l'électrode Ag/Ag⁺ (10 mM) entraîne une diminution progressive du pic d'oxydation du monomère et l'apparition d'un système réversible lent indiquant la formation et l'accroissement de la couche de poly(pyrène-adamantane) à la surface de l'électrode (**Figure V-2**). Après transfert dans une solution d'acétonitrile + 0,1 M LiClO₄, en absence de monomère, le voltampérogramme de l'électrode modifiée montre un pic d'oxydation à 0,45 V associé à un pic de réduction à 0,34 V reflétant l'électroactivité du film de poly(pyrène-adamantane).

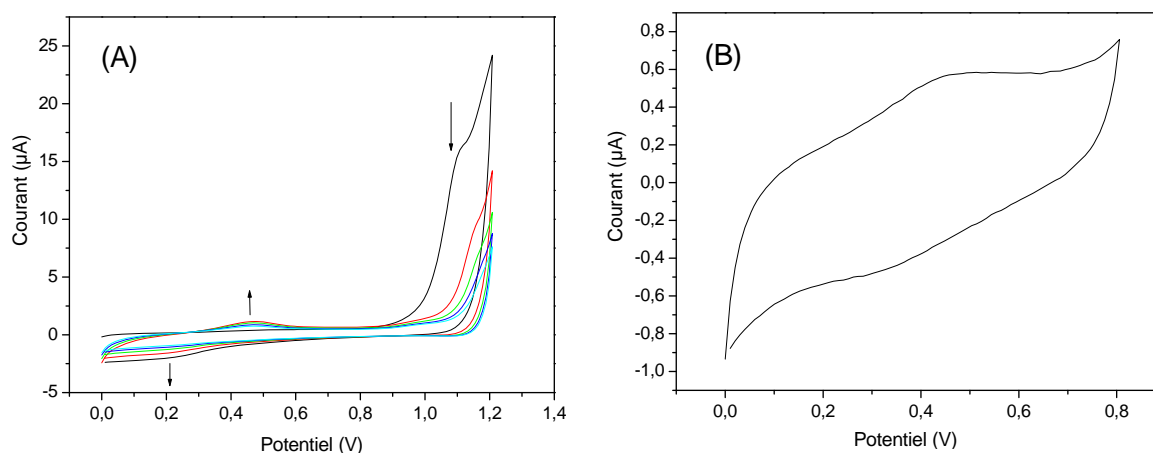


Figure V-2: (A) Polymérisation par voltampérométrie cyclique du pyrène-adamantane (2 mM) sur une électrode de Pt nue (5 mm de diamètre) dans une solution d'acétonitrile (0,1 M LiClO₄). (B) Caractérisation dans une solution d'acétonitrile contenant 0,1 M de LiClO₄. Vitesse de balayage : 100 mV s⁻¹.

On se propose de déterminer le rendement d'électro-polymérisation du pyrène-adamantane. L'électro-polymérisation est effectuée par chronoampérométrie à 1,3 V. Le rendement est déterminé en suivant le même principe que celui décrit au **Chapitre III** dans le cas de l'électro-polymérisation du pyrrole-biotine, en faisant le rapport entre la quantité

d'espèces électro-actives immobilisées ($\Gamma_{\text{réel}}$) déterminée par intégration du signal du polypyrène, et la quantité théorique d'espèces oxydées susceptibles de polymériser ($\Gamma_{\text{théorique}}$).

On constate que pour une charge de 0,5 mC, le rendement de l'électrolyse chute de 37 à 17 % suite à la fonctionnalisation du pyrène par l'adamantane (**Tableaux V-1**). Ceci confirme l'effet de gêne stérique engendré par l'adamantane lors du processus d'électro-polymérisation.

Il apparaît également que le rendement d'électropolymérisation diminue rapidement avec l'augmentation de la charge de l'électrolyse. Cette diminution peut provenir d'une limitation de transport de charge pour les films épais qui entraîne une sous-estimation de l'électro-activité du film par intégration de la charge. Ce comportement peut aussi être dû à la suroxydation du polypyrène au cours de l'électrolyse, qui induit une passivation de la surface de l'électrode et une perte de l'électroactivité du film.

Tableau V-1: *Electropolymérisation du pyrène-adamantane dans l'acétonitrile + 0,1 M TBAP sur électrode de platine (5 mm de diamètre) à potentiel contrôlé ($E=1,3$ V).*

| $Q_{\text{polymérisation}}$ (C) | $Q_{\text{intégrée}}$ (C) | $\Gamma_{\text{réel}}$ (mol.cm ⁻²) | $\Gamma_{\text{théorique}}$ (mol.cm ⁻²) | η (%) |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------|
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $1,18 \cdot 10^{-6}$ | $1,88 \cdot 10^{-9}$ | $11,32 \cdot 10^{-9}$ | 17 |
| 10^{-3} | $1,35 \cdot 10^{-6}$ | $2,14 \cdot 10^{-9}$ | $22,65 \cdot 10^{-9}$ | 10 |
| $2,5 \cdot 10^{-3}$ | $1,73 \cdot 10^{-6}$ | $2,76 \cdot 10^{-9}$ | $56,62 \cdot 10^{-9}$ | 5 |

Le comportement électrochimique du pyrène-adamantane lors de son électropolymérisation sur un dépôt de nanotubes de carbone a également été examiné en détail.

Après modification d'une électrode par le dépôt de 60 μL d'une dispersion de SWCNT (0,1 mg mL⁻¹), le voltampérogramme d'une solution de pyrène-adamantane (2 mM dans CH₃CN) présente lors d'un balayage anodique entre 0 et 1,3 V un pic irréversible à 0,93 V, suivi d'un second pic irréversible mal défini vers 1,1 V. Ces deux signaux sont attribués à l'oxydation du monomère pyrène à son radical cation (**Figure V-3-A**). Le pic à 0,93 V pourrait correspondre à l'oxydation du pyrène en interaction π avec le SWCNT, cette interaction induisant un glissement vers les potentiels moins anodiques, le second pic correspondant à l'oxydation directe du pyrène sur le platine. Il faut souligner que l'augmentation considérable de l'intensité du pic anodique en présence des nanotubes (477,5 μA au lieu de 16 μA) illustre la forte surface spécifique de ces derniers. Lors de balayages successifs entre des potentiels de 0 à 1,3 V, le pic d'oxydation diminue

brusquement à partir du deuxième cycle et le pic d'oxydo-réduction du polymère peut être clairement observé. Après transfert dans une solution d'acétonitrile + 0,1 M LiClO₄ exempte de monomère, l'électrode présente, comme dans le cas de l'électrode de platine nue, un système rédox réversible à $E_{1/2}=0,33$ V (**Figure V-3-B**) correspondant au film de poly(pyrène-adamantane) obtenu sur les nanotubes de carbone.

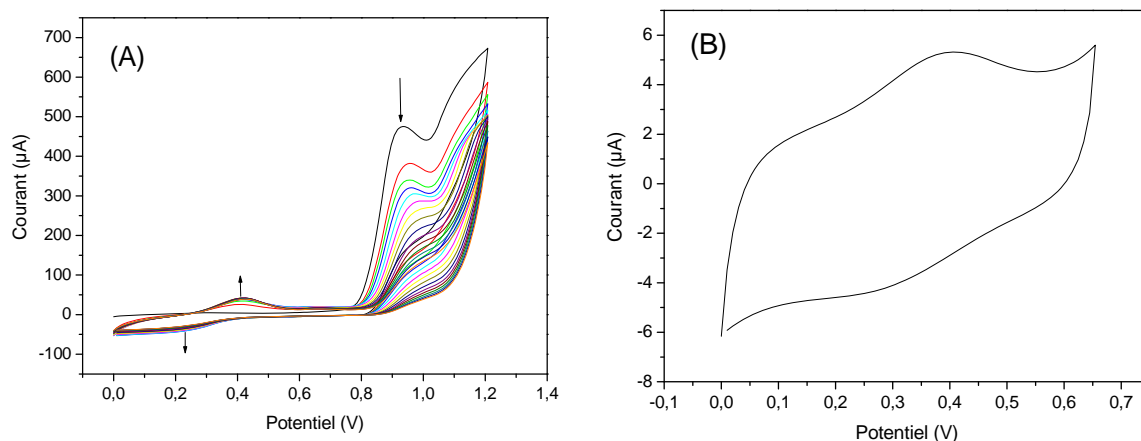


Figure V-3: (A) Polymérisation par voltampérométrie cyclique du pyrène-adamantane (2 mM) sur une électrode de Pt (5 mm de diamètre) recouverte de 3x20 μL de SWCNT dans une solution d'acétonitrile (0,1 M LiClO₄). (B) Caractérisation dans une solution d'acétonitrile contenant 0,1 M de LiClO₄. Vitesse de balayage : 100 mV s⁻¹.

Ayant démontré au **Chapitre IV** que la meilleure stratégie pour fonctionnaliser les nanotubes de carbone par des dérivés pyréniques consistait à électropolymériser des monomères adsorbés, cette technique a été testée avec les pyrènes-adamantane.

Dans ce but, des électrodes de platine modifiées par 60 μL de SWCNT ont été trempées dans une solution de pyrène-adamantane (2 mM) pendant 30 minutes. Après rinçage avec une solution d'acétonitrile + 0,1 M LiClO₄, on effectue des balayages successifs de potentiel entre 0 et 1,2 V dans une solution de CH₃CN + 0,1 M LiClO₄. La **Figure V-4-A** montre un pic d'oxydation du monomère pyrène-adamantane à 0,91 V qui diminue drastiquement dès le deuxième cycle illustrant ainsi l'oxydation d'une quantité limitée de monomère. On constate aussi dans ce cas l'apparition de pics d'oxydo-réduction du poly(pyrène-adamantane). Le transfert dans une solution de CH₃CN + 0,1 M LiClO₄ exempte de monomère montre un système de pics réversibles à $E_{1/2}=0,4$ V (**Figure V-4-B**). La faible intensité des signaux indique la formation d'un film extrêmement fin de poly(pyrène-adamantane) sur le dépôt de nanotubes.

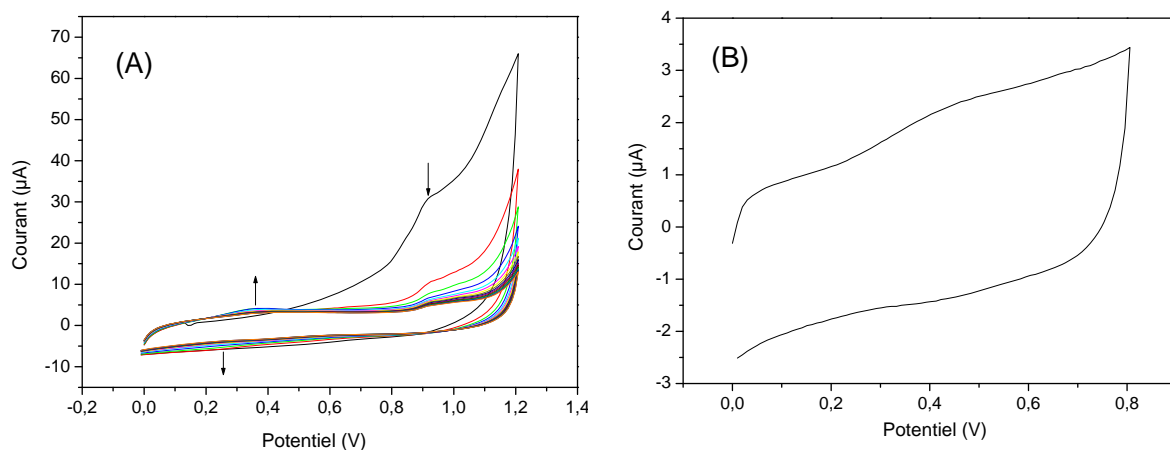


Figure V-4: (A) Polymérisation par voltampérométrie cyclique dans $CH_3CN + 0,1 M LiClO_4$ exempte de monomère après trempage de l'électrode de Pt (5 mm de diamètre) recouverte de $3 \times 20 \mu L$ de SWCNT dans du pyrène-adamantane (2 mM dans CH_3CN). (B) Caractérisation du système électroactif du polymère.

D'après les voltampérogrammes du poly(pyrène-adamantane), une signature similaire à celle du poly(pyrène-biotine) est observée. Toutefois, contrairement au pyrène-biotine, on observe un accroissement du film dans le cas du pyrène-adamantane lors des balayages de potentiels. Ceci confirme le caractère encombrant de la biotine qui semble gêner le processus d'électropolymérisation.

III. Application au développement de biocapteurs à glucose

III.1. Biocapteur de référence basé sur un film de poly(pyrène-adamantane) sur Pt nue

Le biocapteur à glucose à base de pyrène-adamantane est réalisé en premier lieu en électropolymérisant le pyrène-adamantane sur une électrode de platine nue au potentiel de 1,3 V et une charge de 1,5 mC, suivi d'une incubation dans la glucose oxydase- β cyclodextrine. Ce biocapteur servira de référence afin de déterminer l'influence des nanotubes de carbone sur l'édifice élaboré basé sur l'affinité entre l'adamantane et la β -cyclodextrine. La réponse de ce biocapteur au glucose est de $0,42 mA M^{-1} cm^{-2}$ avec un temps de réponse de 33 s. Le domaine de linéarité varie de $2 \cdot 10^{-7} M$ à $1,9 \cdot 10^{-3} M$, la constante de Michaelis apparente étant de 21 mM (**Figure V-5**).

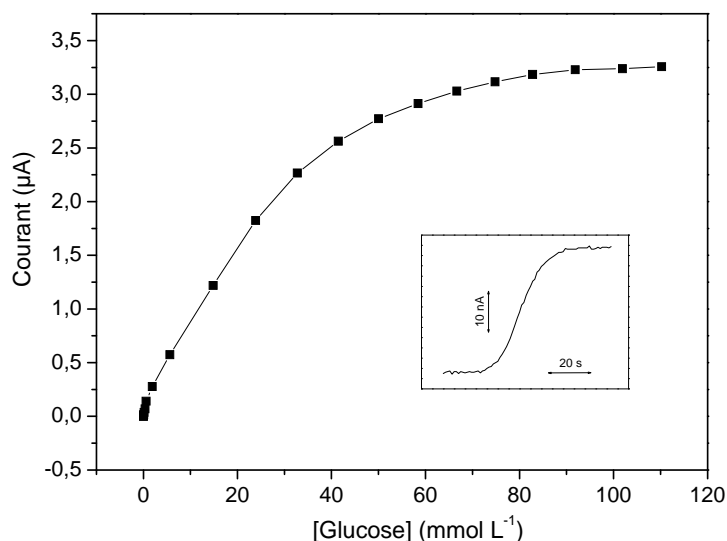


Figure V-5: Courbe d'étalonnage du biocapteur à glucose à base de polypyrène-adamantane vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de 0,6 V vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7).

Inset : Réponse au glucose pour une concentration de $3,6 \cdot 10^{-4}$ M.

III.2. Caractérisation physico-chimique des différentes étapes de réalisation d'assemblages moléculaires à base de nanotubes de carbone et de pyrène-adamantane

Notre approche consiste à réaliser des biocapteurs à base de nanotubes de carbone et de pyrène-adamantane en utilisant l'affinité entre l'adamantane et la β -cyclodextrine afin de réaliser des bio-assemblages moléculaires tridimensionnels sans avoir recours à une couche intermédiaire comme dans le cas de l'affinité entre avidine et biotine. On utilisera différentes techniques de fonctionnalisation des nanotubes de carbone par le pyrène-adamantane comme dans le cas du pyrène-biotine, à savoir la fonctionnalisation par adsorption en solution, par adsorption à la surface d'une électrode recouverte de nanotubes, par électropolymérisation dans une solution de monomère, et par adsorption puis électropolymérisation dans une solution exempte de monomère.

Ces dépôts de pyrène-adamantane permettront l'ancrage de l'enzyme fonctionnalisée par des cyclodextrines via la formation d'un complexe d'inclusion ou "hôte-invité". L'adamantane s'insère dans la cavité relativement hydrophobe de la β -cyclodextrine. Pour cela, les électrodes fonctionnalisées par l'adamantane sont incubées pendant 20 minutes dans 20 μ L de glucose oxydase- β cyclodextrine ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) préparée dans un tampon phosphate (pH 7). Les électrodes sont ensuite rincées deux fois dans le tampon phosphate (pH 7) maintenue sous agitation. Le [Schéma V-3](#) illustre la configuration du biocapteur.

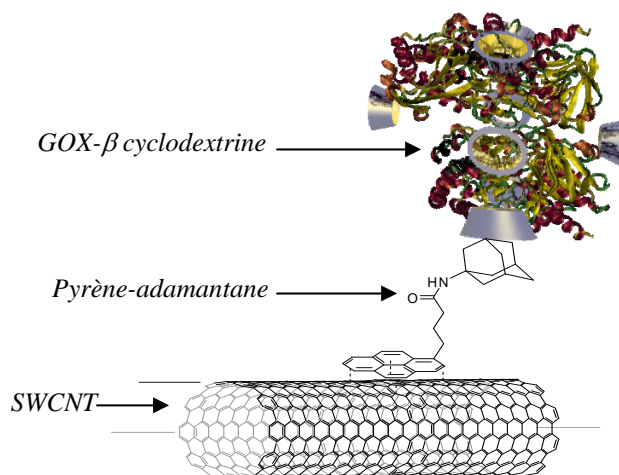


Schéma V-3: Configuration du biocapteur à glucose à base de SWCNTs modifiés par du pyrène-adamantane et la glucose oxydase portant des motifs cyclodextrine.

III.2.1. Assemblage en solution des pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone par interaction π

Pour la fonctionnalisation des nanotubes de carbone par interactions π en solution, les nanotubes produits par le procédé HiPCo et prétraités selon la procédure indiquée au [Chapitre II](#) sont dispersés dans 150 mL de THF dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes. Après sédimentation des nanotubes non dispersés, la solution est décantée puis on ajoute sous agitation 20 mg (40 μmol) de pyrène-adamantane. Après trois heures d'agitation à température ambiante, la liaison non covalente est formée à la surface des nanotubes de carbone. La dispersion est filtrée à l'aide d'une membrane PTFE (taille des pores : 0,45 μm), et lavée avec du THF et du CH_2Cl_2 pour éliminer le pyrène-adamantane non adsorbé à la surface des nanotubes.

a. Influence de la fonctionnalisation sur le comportement électrochimique des nanotubes de carbone

Afin de déterminer l'influence des nanotubes de carbone fonctionnalisés en solution par le pyrène-adamantane sur le comportement électrochimique de l'électrode, nous avons effectué des mesures de courants limites correspondant à l'oxydation de l'hydroquinone (2 mM dans un tampon phosphate) sur une électrode tournante de carbone vitreux (5 mm de diamètre). La [Figure V-6](#) montre l'évolution des voltampérogrammes obtenus pour un dépôt

de SWCNT, SWCNT-pyrène-biotine et de SWCNT-pyrène-adamantane sur une électrode de carbone vitreux. Il apparaît que le potentiel d'oxydation de l'hydroquinone est décalé vers les potentiels positifs dans le cas de la couche de SWCNT-pyrène-adamantane par rapport aux dépôts de SWCNT et de SWCNT-pyrène-biotine. Ceci reflète l'hydrophobie du pyrène-adamantane qui gêne la diffusion de l'hydroquinone jusqu'à la surface de l'électrode de carbone. La fonctionnalisation des nanotubes de carbone conduit clairement à une diminution de l'intensité du courant d'oxydation de l'hydroquinone. Cette diminution est plus forte pour le pyrène-adamantane que pour le pyrène-biotine, ce dernier étant moins hydrophobe. La forte adsorption du pyrène, mais également de l'adamantane, sur les nanotubes de carbone empêche aussi l'hydroquinone de s'oxyder à la surface des nanotubes de carbone.

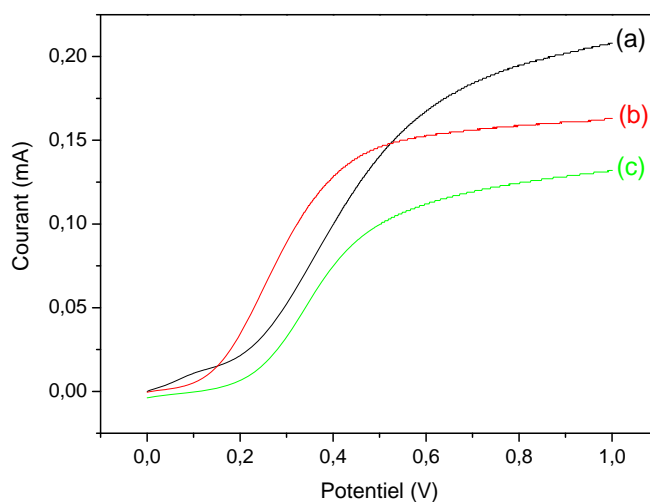


Figure V-6: Voltampérogrammes de l'électrode de carbone vitreux (5 mm) recouverte de SWCNT (a), SWCNT-pyrène-biotine (b) et SWCNT-pyrène-adamantane (c) enregistrés dans le tampon phosphate (pH 7) contenant 2 mM d'hydroquinone. Vitesse de rotation : 200 rpm. vitesse de balayage : 100 mV s^{-1} .

b. Caractérisation de l'ancrage du pyrène-adamantane par MEB

Afin d'évaluer l'efficacité de cette méthode de fonctionnalisation des nanotubes de carbone, nous avons eu recours à la microscopie électronique à balayage. Des dépôts de nanotubes fonctionnalisés par l'adamantane sont incubés dans 20 μL d'une solution aqueuse ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) de nanoparticules d'or ayant entre 3 et 5 nm de diamètre modifiés par la β -cyclodextrine. Les électrodes sont ensuite lavées deux fois dans le tampon phosphate afin d'éliminer l'adsorption non spécifique. La Figure V-7 montre des nanoparticules d'or (spots blancs) qui décorent les nanotubes de carbone. Ces nanoparticules sont réparties d'une façon

homogène montrant l'ancrage de l'adamantane à la surface des tubes. Néanmoins ces nanoparticules ne couvrent pas totalement la surface.

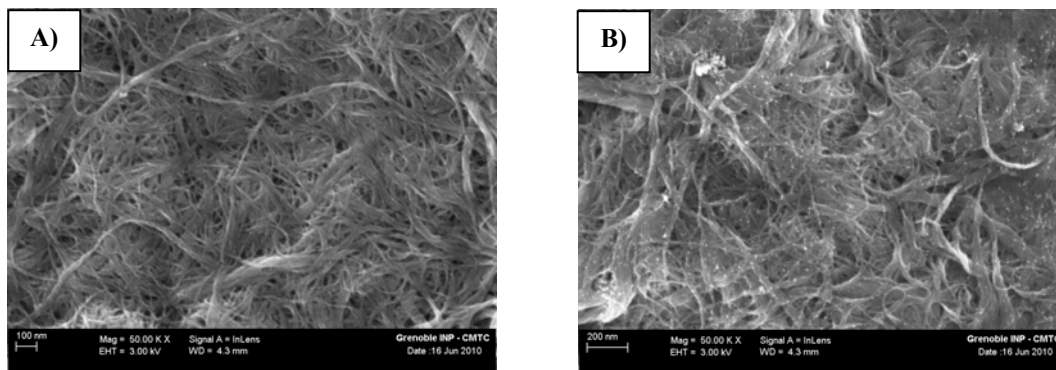


Figure V-7: Images MEB du SWCNT-pyrène-adamantane avant (A) et après (B) incubation avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des motifs β -cyclodextrine.

c. Caractérisation de l'ancrage du pyrène-adamantane par spectroscopie Raman

L'influence des groupements adamantane sur les caractéristiques des nanotubes de carbone a également été étudiée par spectroscopie Raman. Suite à la fonctionnalisation par le pyrène-adamantane, il n'y avait pas de changement apparent dans l'allure générale du spectre Raman. Par contre, on constate une augmentation du rapport de surfaces des bandes D/G qui devient égal à 0,051. Ce rapport est semblable à celui obtenu pour des SWCNT-pyrène-biotine. Cette diminution est due, comme indiqué précédemment, à l'étape de dispersion supplémentaire nécessaire pour cette technique de fonctionnalisation des nanotubes ce qui crée des défauts supplémentaires sur les parois des nanotubes de carbone et donc une augmentation de la surface de la bande D (augmentation des carbones hybridés sp^2).

d. Caractérisation par la technique de mouillabilité

Nous avons utilisé la méthode de la goutte posée pour la caractérisation thermodynamique des dépôts de SWCNT-pyrène-adamantane mais également pour déterminer la possibilité d'ancrer la glucose oxydase- β cyclodextrine sur ce dépôt. Lorsque la surface est recouverte par des nanotubes de carbone HiPCo non fonctionnalisés, la surface est hydrophobe ($\theta = 38,5^\circ$). Suite à la fonctionnalisation des SWCNTs par du pyrène-adamantane, la surface devient plus hydrophobe ($\theta = 68^\circ$) dû au caractère hydrophobe des groupements adamantane. Outre la confirmation de la présence de pyrène-adamantane à la surface des

nanotubes de carbone, ceci corrobore les phénomènes observés en électrochimie lors de l'oxydation de l'hydroquinone à la surface de ces nanotubes. Après incubation avec la glucose oxydase β -cyclodextrine, une augmentation considérable de l'hydrophilicité de la surface ($\theta = 26,7^\circ$) est observée (**Tableau V-2**). Cette dernière reflète l'ancrage de la protéine à la surface des nanotubes. L'énergie de surface, ainsi que ses composantes basiques, sont déterminées selon le modèle de Van Oss. Un film de SWCNT-pyrène-adamantane possède une énergie de surface légèrement plus faible ($52,3 \text{ mJ m}^{-2}$) que celle des nanotubes non fonctionnalisés ($55,4 \text{ mJ m}^{-2}$). La composante basique diminue suite à l'ancrage du pyrène-adamantane et devient égale à $3,6 \text{ mJ m}^{-2}$. Par contre, la composante basique augmente drastiquement ($43,4 \text{ mJ m}^{-2}$) suite à l'ancrage de la glucose oxydase β -cyclodextrine. Ceci peut être expliqué par le caractère basique des groupements cyclodextrines (**Tableau V-3**).

Tableau V-2: Valeurs d'angle de contact et image de la goutte d'eau déposée sur l'électrode Pt/SWCNT/pyrène-adamantane/GOX- β CD au cours de diverses phases de traitement.

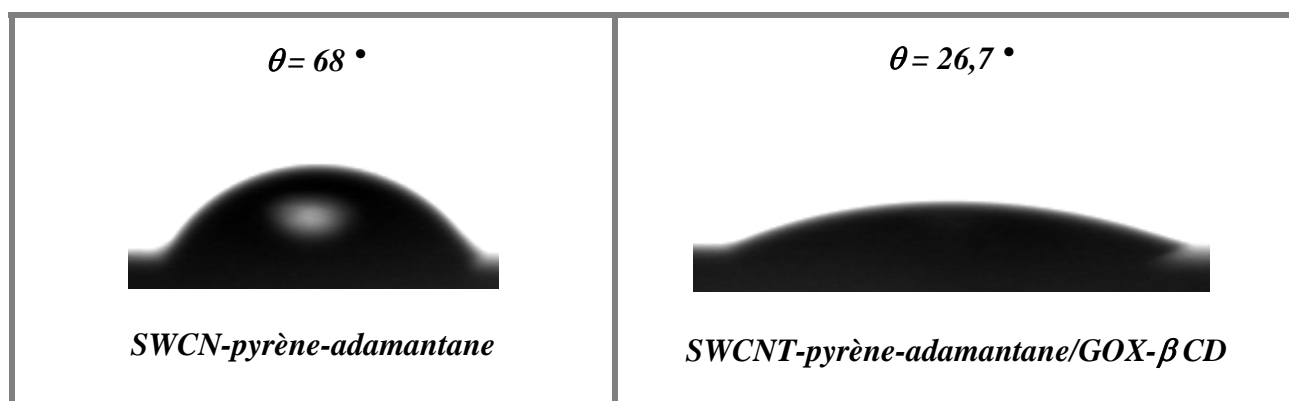


Tableau V-3 : Energie de surface et ses composantes selon le modèle de Van Oss pour l'électrode à base de SWCNT-pyrène-adamantane suite à chaque étape de fonctionnalisation

| Electrode | Θ_{Eau} ($^\circ$) | Θ_{Form} ($^\circ$) | Θ_{Diiod} ($^\circ$) | Energie (mJ m^{-2}) | γ_{OH^-} (mJ m^{-2}) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|
| <i>Si₃N₄/SWCNT</i> | 38,5 | 17,5 | 40,9 | 55,4 | 31,6 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT-pyrène-adamantane</i> | 68 | 20,8 | 26,5 | 52,3 | 3,6 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT-pyrene-adamantane/GOX-βCD</i> | 26,7 | 14,1 | 36,1 | 56,1 | 43,4 |

III.2.2. Assemblage du pyrène-adamantane par interaction π sur une électrode recouverte de nanotubes de carbone

On se propose dans un second lieu, d'accrocher par simple adsorption les pyrènes-adamantane sur une électrode recouverte de nanotubes de carbone. Pour cela, on dépose 60 μ L de nanotubes de carbone prétraités sur une électrode de platine selon la procédure décrite au **Chapitre II**. L'électrode est en suite trempée pendant 20 minutes dans une solution d'acétonitrile contenant du pyrène-adamantane (2 mM).

a. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage a montré un meilleur recouvrement des nanotubes de carbone fonctionnalisés par adsorption du pyrène-adamantane. L'incubation dans les nanoparticules d'or modifiées par la β -cyclodextrine montre clairement l'augmentation de la quantité de nanoparticules sur les parois des tubes (**Figure V-8**). Ceci est probablement dû à l'augmentation de la quantité de groupements adamantane disponibles sur les dépôts de SWCNT utilisant cette technique de fonctionnalisation par trempage. D'ailleurs, la technique précédente de fonctionnalisation des nanotubes par le pyrène-adamantane avant dépôt sur l'électrode nécessite une étape de sonication additionnelle entraînant une perte de quelques groupements adamantane qui se détachent de la paroi des tubes. La quantité de pyrène-adamantane disponible se trouve alors affaibli.

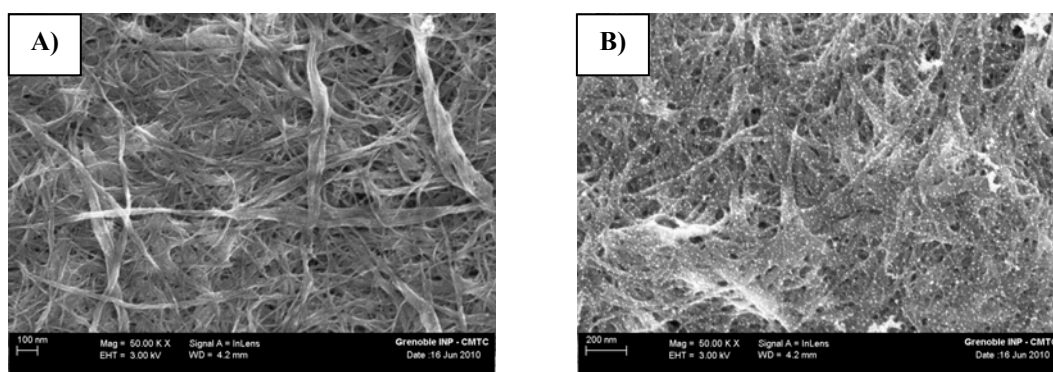


Figure V-8: Images MEB de dépôts de nanotubes de carbone préalablement fonctionnalisés par incubation dans une solution 2 mM de pyrène-adamantane avant (A) et après (B) incubation avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des motifs β -cyclodextrines.

b. Caractérisation par spectroscopie Raman

Comme dans le cas précédent, on ne constate pas de changement dans le spectre Raman suite à l'adsorption du pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone. Par contre, le rapport de surfaces des bandes D/G diminue suite à cette fonctionnalisation et devient égal à 0,035. Ceci est probablement dû, comme mentionné précédemment dans le cas du pyrène-biotine adsorbé sur les nanotubes de carbone, à une augmentation de la surface de la bande G causée par le colmatage des défauts des parois des tubes par les groupements pyréniques.

c. Caractérisation par la technique de mouillabilité

Les caractéristiques thermodynamiques des nanotubes de carbone après l'adsorption du pyrène-adamantane et l'incubation avec la glucose-oxydase- β cyclodextrine sont résumées dans le **Tableau V-4**. La mesure dynamique de l'angle de contact des nanotubes de carbone fonctionnalisés par du pyrène-adamantane par trempage indique un caractère très hydrophobe de la surface ($\theta = 72,4^\circ$). L'augmentation remarquable de l'hydrophobicité des nanotubes de carbone peut être expliquée par l'accrochage de groupements pyrène ainsi que de groupements adamantane caractérisés tous les deux par leur fort caractère hydrophobe. Par ailleurs, cette hydrophobicité plus élevée que celle observée avec les nanotubes de carbone fonctionnalisés en solution par du pyrène-adamantane, pourrait être attribuée à une plus forte densité de pyrène-adamantane immobilisée à la surface des nanotubes par trempage. Par contre, le dépôt d'une monocouche de glucose oxydase- β CD entraîne une diminution notable de l'hydrophobicité de la surface ($\theta = 43,7^\circ$). La surface reste néanmoins beaucoup plus hydrophobe que dans le cas des dépôts sur des SWCNT-pyrène-adamantane. Ceci corrobore l'hypothèse d'un fort taux de recouvrement des nanotubes par le pyrène-adamantane, voire l'adsorption de l'adamantane lui-même, ce qui empêche son interaction avec la cyclodextrine.

La composante basique diminue suite à l'adsorption du pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone et devient $9,7 \text{ mJ m}^{-2}$, ce qui peut être expliqué par le changement des caractéristiques thermodynamiques des nanotubes de carbone suite à l'adsorption. La composante basique augmente considérablement suite à l'ancrage de la glucose oxydase ($25,4 \text{ mJ m}^{-2}$).

Tableau V-4 : *Energie de surface et ses composantes basiques selon le modèle de Van-Oss pour l'électrode à base de pyrène-adamantane adsorbés sur une électrode recouverte de nanotubes de carbone suite à chaque étape de fonctionnalisation.*

| Electrode | Θ_{Eau} (°) | Θ_{Form} (°) | Θ_{Diiod} (°) | Energie (mJ m ⁻²) | γ_{OH^-} (mJ m ⁻²) |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>Si₃N₄/SWCNT</i> | 38,5 | 17,5 | 40,9 | 55,4 | 31,6 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT/pyrène-adamantane</i> | 72,4 | 51,3 | 21,8 | 47,7 | 9,7 |
| <i>Si₃N₄/SWCNT/ pyrène-adamantane/GOX-β CD</i> | 43,7 | 16,7 | 39,9 | 55,4 | 25,4 |

III.2.3. Assemblage par électro-polymérisation du pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone

L'accrochage du pyrène-adamantane est effectué par électro-polymérisation à 1,3 V du pyrène-adamantane (2 mM dans CH₃CN) sur une électrode de platine recouverte de nanotubes de carbone (60 μL).

a. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'incubation des nanotubes de carbone /poly(pyrène-adamantane) avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées par la β-cyclodextrine (0,5 mg mL⁻¹) entraîne un recouvrement semblable à celui obtenu suite à la fonctionnalisation des nanotubes par adsorption (**Figure V-9**).

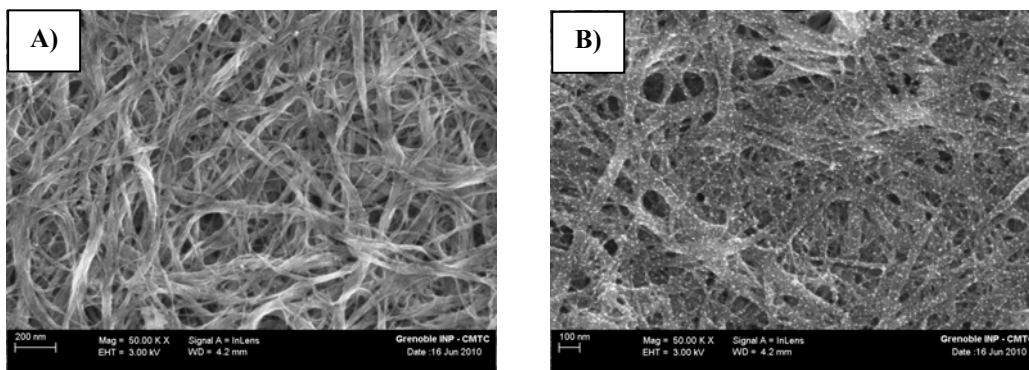


Figure V-9: *Images MEB du poly(pyrène-adamantane) polymérisé sur les nanotubes de carbone dans une solution 2 mM de pyrène-adamantane avant (A) et après (B) incubation avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des motifs β-cyclodextrines.*

b. Caractérisation par spectroscopie Raman

Dans le cas de l'électropolymérisation du pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone, on obtient le même rapport de surfaces des bandes D/G que celui obtenu suite à l'adsorption du pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone (0,035). Ceci montre bien que l'électropolymérisation n'affecte pas la structure et l'hybridation des atomes de carbone formant les parois des nanotubes.

III.3. Réalisation de biocapteurs de glucose basés sur différentes techniques de fonctionnalisation du pyrène-adamantane

III.3.1. Biocapteur à base d'assemblage en solution des pyrène-adamantane sur les nanotubes de carbone par interaction π

Les nanotubes de carbone fonctionnalisés par le pyrène-adamantane sont utilisés pour la conception de biocapteur à glucose via l'ancrage par interactions affines de glucose oxydase fonctionnalisée par la β -cyclodextrine. La **Figure V-10** montre la réponse ampérométrique du biocapteur en fonction de la concentration en glucose. La sensibilité du biocapteur est de $3,4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ avec un domaine de linéarité allant de $2 \cdot 10^{-6}$ à $3,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. La densité de courant maximum est de $56,68 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ et la valeur du K_M apparent est de $13,3 \text{ mmol L}^{-1}$. Ces résultats confirment d'une part l'ancrage du dérivé adamantane sur les nanotubes de carbone via les groupements pyréniques, d'autre part sa disponibilité pour pénétrer dans la cavité de la β -cyclodextrine. Ces performances sont supérieures à celles enregistrées avec des films de SWCNT-pyrène-biotine déposés sur une électrode de platine, malgré le caractère hydrophobe des groupements adamantane. Ceci peut être expliqué par l'absence de couche intermédiaire d'avidine qui pouvait gêner la diffusion du glucose et de H_2O_2 . Par ailleurs, l'augmentation du courant maximum en présence de nanotubes de carbone montre l'avantage de la configuration tridimensionnelle apportée par ces derniers sur les performances du biocapteur.

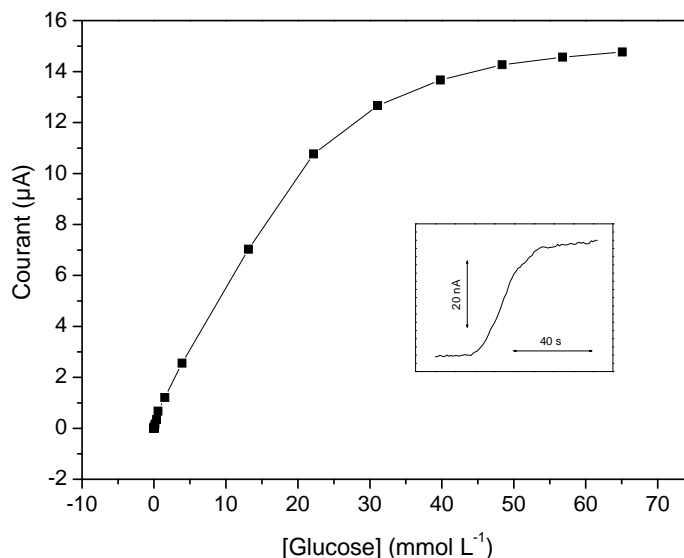


Figure V-10: Courbe d'étalonnage du biocapteur à glucose à base de 60 µL de la dispersion de SWCNT-pyrène-adamantane vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de 0,6 V vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7) **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $5,8 \cdot 10^{-5}$ M

III.3.2. Biocapteur à base de pyrènes-adamantane adsorbés sur des dépôts de nanotubes de carbone

La formation d'une monocouche de pyrène-adamantane est réalisée par simple trempage d'une électrode de platine recouverte par des nanotubes de carbone dans une solution de monomère de concentration 2 mM, pendant 20 minutes. La **Figure V-11** montre la réponse du biocapteur obtenu par incubation dans la GOX-β CD ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) pendant 20 minutes en fonction de la concentration en glucose. La sensibilité est nettement plus élevée ($10,2 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) que celle observée pour l'électrode précédente utilisant des nanotubes de carbone modifiés en solution par le pyrène-adamantane. Le domaine de linéarité est situé entre $2 \cdot 10^{-7}$ et $3,6 \cdot 10^{-4}$ M et la densité de courant maximum est de $91,48 \text{ µA cm}^{-2}$, le K_M^{app} étant de $7,7 \text{ mmol L}^{-1}$. Outre une amélioration de la diffusion à travers le film de pyrène-adamantane formé, l'amélioration des performances de ce biocapteur peut être aussi due à l'augmentation de la quantité de pyrène-adamantane accrochée sur les parois des nanotubes de carbone et donc à l'immobilisation d'une plus grande quantité d'enzyme GOX-β cyclodextrine par cette technique de fonctionnalisation, comme montré par microscopie électronique à balayage et par mesure d'angle de contact.

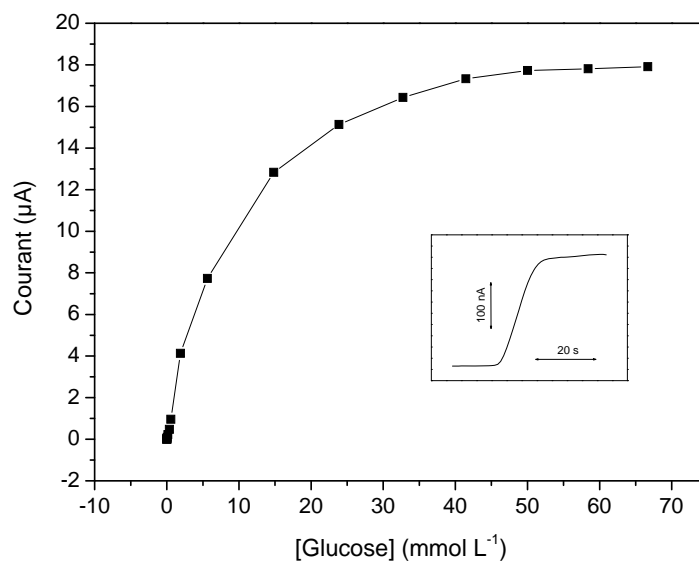


Figure V-11: Courbe d'étalonnage du biocapteur constitué de $3 \times 20 \mu\text{L}$ de nanotube de carbone et de pyrène-adamantane adsorbé vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de $0,6 \text{ V}$ vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7). **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

III.3.3. Biocapteur à base de pyrène-adamantane polymérisés sur des dépôts de nanotubes de carbone

Le biocapteur qui résulte de l'électro-polymérisation du pyrène-adamantane à $1,5 \text{ mC}$ au potentiel de $1,3 \text{ V}$ possède une sensibilité au glucose de $12,5 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ avec un domaine de linéarité entre $2 \cdot 10^{-7}$ et $3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et une densité de courant maximum de $133,3 \mu\text{A cm}^{-2}$, la valeur de K_M^{app} étant de $10,8 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figure V-12). L'amélioration des caractéristiques de ce biocapteur par rapport aux précédentes peut être expliquée par un recouvrement de la totalité de la surface accessible des parois des nanotubes de carbone par le film électrogénéré entraînant une meilleure distribution spatiale des groupements adamantane.

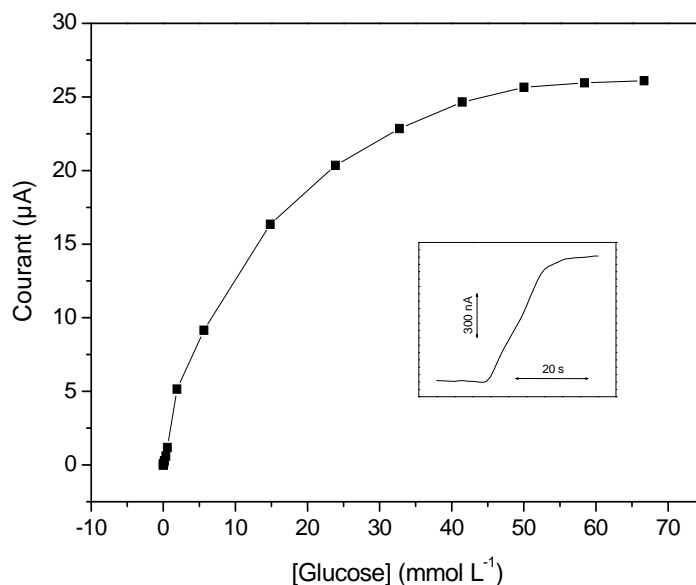


Figure V-12: Courbe d'étalonnage du biocapteur à base de SWCNT et de poly(pyrène-adamantane) vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de 0,6 V vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7). **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $5,7 \cdot 10^{-4}$ M.

Afin de renforcer la monocouche de pyrène-adamantane adsorbée sur les nanotubes de carbone tout en conservant la stabilité apportée par la formation d'un film polymère, nous avons utilisé l'approche développée précédemment qui consiste à déposer des SWCNTs sur une électrode de platine puis à les modifier par simple trempage dans une solution de pyrène-adamantane (2 mM) et enfin à électropolymériser cette monocouche par chronoampérométrie à 1,3 V dans une solution exempte de monomère. La **Figure V-13** montre la courbe d'étalonnage de ce biocapteur avec une densité de courant maximum à saturation qui atteint $154,9 \mu\text{A cm}^{-2}$. La sensibilité au glucose est de $14,4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ avec un domaine de linéarité allant de $2 \cdot 10^{-7}$ à $1,6 \cdot 10^{-3}$ M. La constante apparente de Michaelis-Menten est de 11,2 mM.

L'excellente sensibilité du biocapteur indique clairement que cette électropolymérisation n'affecte pas la diffusion à travers le dépôt de H_2O_2 ni ne couvre la surface de l'électrode de platine par un film polymère. La polymérisation dans ce cas est effectuée sur les parois des nanotubes de carbone.

Les performances du biocapteur obtenu dans ce cas sont dues d'une part à la formation d'un film extrêmement fin de poly(pyrène-adamantane) entourant les parois des nanotubes de carbone, d'autre part à une perméation optimale du peroxyde d'hydrogène enzymatiquement généré à travers le dépôt.

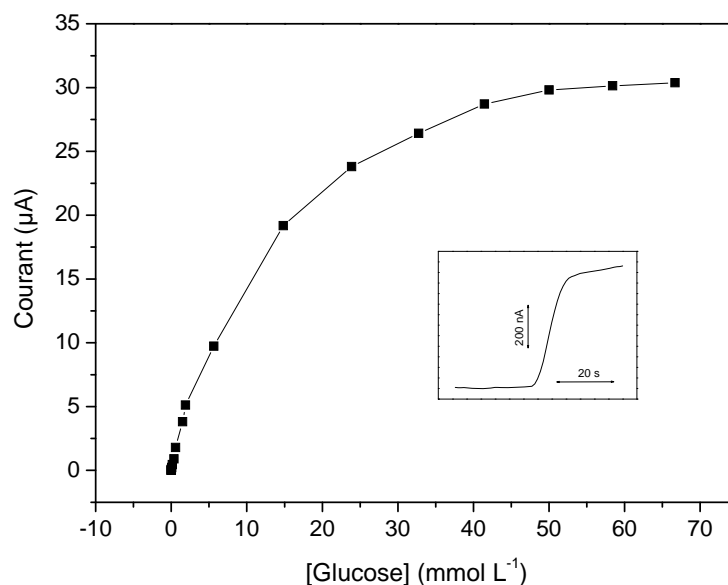


Figure V-13: Courbe d'étalonnage du biocapteur à base de SWCNT et de poly(pyrène-adamantane) obtenu dans une solution exempte de monomère vis-à-vis du glucose. Potentiel appliqué de 0,6 V vs ECS dans le tampon phosphate (pH 7). **Inset :** Réponse au glucose pour une concentration de $3,6 \cdot 10^{-4}$ M.

III.3.4. Etude comparative des biocapteurs à glucose à base de pyrène-adamantane et de nanotubes de carbone

Comme dans le cas de la fonctionnalisation des nanotubes de carbone par le pyrène-biotine, une étude comparative des courbes d'étalonnage des différents biocapteurs obtenus par des assemblages moléculaires entre les nanotubes de carbone et le pyrène-adamantane a été effectuée afin de déterminer la meilleure procédure de biofonctionnalisation des nanotubes de carbone (**Figure V-14**).

Concernant le dépôt de SWCNT-pyrène-adamantane, la densité de courant maximum du biocapteur est de $56,68 \mu\text{A cm}^{-2}$ et la sensibilité est de $3,4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. L'accrochage des pyrènes-adamantane sur une électrode préalablement modifiée par des nanotubes de carbone par simple trempage conduit quasiment à un triplement des valeurs de sensibilité ($10,2 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). De plus, la densité du courant maximum ($91,48 \mu\text{A cm}^{-2}$) qui reflète la quantité d'enzyme immobilisée, dépasse largement les performances de la configuration précédente. Quant au biocapteur à base d'un film poly(pyrène-adamantane) obtenu directement dans une solution de pyrène-adamantane (2 mM) sur un dépôt de nanotubes de carbone, il donne une sensibilité de $12,5 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ et un courant maximum de $133,3 \mu\text{A cm}^{-2}$. La méthode de fonctionnalisation alliant trempage puis électropolymérisation du pyrène-adamantane adsorbé

constitue l'approche la plus performante puisque la sensibilité et le I_{\max} atteignent respectivement $14,4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ et $154,9 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ (**Tableau V-5**).

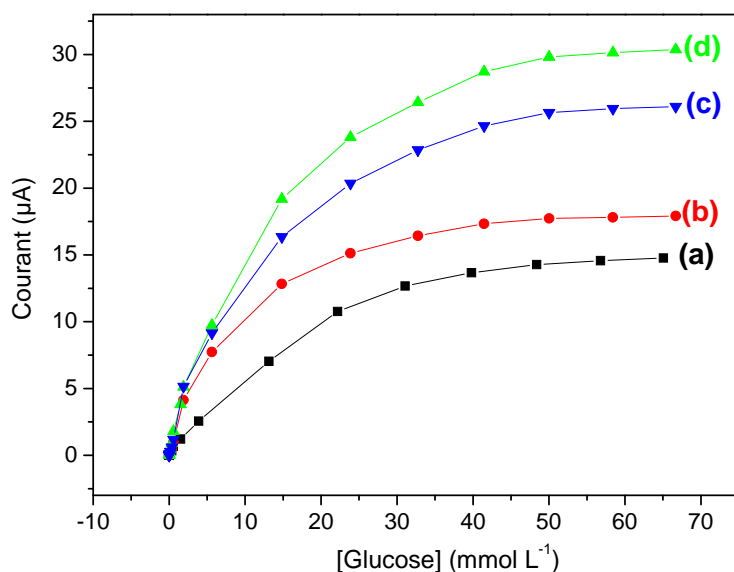


Figure V-14: Courbes d'étalonnage relatives à des biocapteurs à base de SWCNT et de pyrène-adamantane accroché sur les SWCNTs avant dépôt sur l'électrode (a), pyrène-adamantane obtenu par trempage dans une solution de pyrène-adamantane (2 mM) suivie d'un rinçage (b), poly(pyrène-adamantane) électropolymérisé dans une solution de monomère pyrène-adamantane (2 mM) (c) poly(pyrène-adamantane) électropolymérisé dans une solution exempte de monomère suite à un trempage dans du pyrène-adamantane (2 mM) (d). Toutes les électrodes sont modifiées par incubation dans GOX- β CD. Les mesures ampérométriques sont réalisées dans un tampon phosphate (0,1 M) à pH 7, à 25°C et $E_{app} = 0,6 \text{ V}$.

Tableau V-5: Caractéristiques du biocapteur à glucose à base de pyrène adamantane

| | Sensibilité ($\text{mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) | Domaine de linéarité (mmol L^{-1}) | I_{\max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$) | K_M apparent (mmol L^{-1}) | t (s) |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|----------|
| SWCNT-pyrène-adamantane | 3,4 | $2 \cdot 10^{-4}$ à 0,36 | 56,68 | 13,3 | 30 |
| SWCNT/pyrène-adamantane par trempage | 10,2 | $2 \cdot 10^{-4}$ à 0,36 | 91,48 | 7,7 | 12 |
| SWCNT/polypyrène-adamantane dans monomère | 12,5 | $2 \cdot 10^{-4}$ à 0,36 | 133,3 | 10,8 | 17 |
| SWCNT/polypyrène-adamantane exempte de monomère | 14,4 | $2 \cdot 10^{-4}$ à 0,16 | 154,9 | 11,2 | 14 |

Conclusion

Les résultats obtenus ouvrent une nouvelle voie pour la biofonctionnalisation de dépôts de SWCNT via des groupements adamantane. Comme le pyrène-biotine, ces derniers peuvent fonctionnaliser les nanotubes de carbone, par électropolymérisation ou adsorption spécifique via des interactions π . De plus, ils permettent l'ancrage de biomolécules grâce à l'inclusion de l'adamantane dans des motifs β -cyclodextrines attachés à la biomolécule.

Enfin, il faut souligner l'intérêt de ce système d'immobilisation par incubation vis-à-vis de celui par pont d'avidine. En effet, l'immobilisation sur les nanotubes de carbone d'une biomolécule modèle, la glucose oxydase, par le système d'inclusion a conduit à des biocapteurs ampérométriques dont les performances surclassaient très nettement celles obtenues par des biocapteurs basés sur le système avidine-biotine.

Références bibliographiques du chapitre V

- [1] Nathalie C.Bellocq, Suzie H.Pun, Gregory S.Jenson, Mark E.Davis, *Bioconjugate Chem*, **2003**, 14, 1122
- [2] Reynaldo Villalonga, Conrado Camacho, Roberto Cao, Javier Hernandez, Juan C.Matias, *Chem.Comm*, **2007**, 9, 942
- [3] Conrado Camacho, Juan C.Matias, Belkis Chico, Roberto Cao, Leissy Gomez, Benjamin K.Simpson, *Electroanalysis*, **2007**, 19, 2538
- [4] Florence Charbonnier, Soledad Penades, *European Journal of Organic Chemistry*, **2004**, 17, 3650
- [5] Olivia Bistri, Karim Mazeau, Rachel Auzély-Velty, Matthieu Sollogoub, *Chem.Eur.J*, **2007**, 13, 8847
- [6] Qiang Zhao, Shufang Wang, Xinjian Cheng, Richard C.M.Yam, Deling Kong, Robert K.Y.Li, *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 1364
- [7] Menno R. de Jong, Jurriaan Huskens, David N.Reinhoudt, *Chem.Eur.J*, **2001**, 7, 4164

Conclusion générale

Conclusion générale

Une des limitations majeures dans le domaine des biocapteurs électrochimiques (électrodes enzymatiques, immunocapteurs, capteurs à ADN et protéines) réside dans le caractère surfacique de la reconnaissance ou catalyse biomoléculaire. L'extension de cette détection 2D à un volume via la création d'architectures biomoléculaires à la surface des transducteurs permettrait un gain notable de sensibilité, un atout décisif dans la compétition des systèmes analytiques. Les architectures 3D doivent présenter une forte densité de biomolécules tout en préservant une excellente diffusion des petites molécules substrats et produits des réactions enzymatiques mais surtout des molécules plus importantes stériquement telles que des protéines ou des ADN afin de conférer aux immunocapteurs et capteurs à ADN et protéines une détection volumique clé de leur sensibilité. Ces configurations biomoléculaires doivent également conserver une accessibilité optimum à la surface de l'électrode siège de la transduction :

Reconnaissance biomoléculaire \Leftrightarrow Signal électrique

Préalablement à l'utilisation des nanotubes de carbone monofeuillets (SWCNT) pour la création de bioarchitectures, une étape primordiale concernait la conception et l'optimisation de protocoles de manipulation des nanotubes de carbone afin de s'affranchir des problèmes de purification des SWCNT et de reproductibilité de leurs dépôts. Nous avons ainsi réussi à créer d'excellentes dispersions de SWCNT en milieu organique permettant soit la réalisation quantitativement contrôlée de dépôts soit leur fonctionnalisation non-covalente en solution par des groupements organiques.

Comme je l'ai décrit au chapitre III, nous avons testé la fonctionnalisation en deux étapes de dépôts de nanotubes : tout d'abord une polymérisation électrochimique d'un film sur l'électrode modifiée par le dépôt conducteur puis une post-fonctionnalisation par interactions affines mettant en jeu un motif du polymère. Nous avons choisi pour cela le système affin biotine-avidine, l'avidine étant l'élément pontant entre le polymère biotinylé et la biomolécule marquée par des biotines. Nous avons ainsi pu démontrer la possibilité d'ancrer par des liaisons non-covalentes des biomolécules, en l'occurrence une enzyme, à la surface d'un dépôt de SWCNT modifié par un film de polypyrrole. La comparaison des performances analytiques de cette bioarchitecture avec celles obtenues par une électrode modifiée uniquement par le polymère et l'enzyme indique une augmentation par un facteur 15 montrant clairement l'effet volumique bénéfique apporté par la présence des SWCNT. Ces

Conclusion générale

travaux nous ont permis de définir une quantité optimum de dépôt de nanotubes à fonctionnaliser par électropolymérisation. Ce dernier paramètre constitue un compromis entre deux effets opposés. En effet, l'accroissement de la taille du dépôt induit une augmentation de la quantité de biomolécule immobilisée mais également un éloignement des couches biologiques de la surface de l'électrode où intervient la détection électrochimique.

A partir d'un dépôt optimum de nanotubes, une nanostructuration des couches biologiques par auto-assemblage successif d'avidine et d'enzyme biotinylées a conduit, comme nous l'avions postulé, à une amélioration continue des performances du biocapteur avec le nombre de couches de biomolécules.

Dans le but de fonctionnaliser les nanotubes sans modifier la surface de l'électrode afin de maintenir une accessibilité et donc une sensibilité électrochimique maximale, nous avons aussi exploré les possibilités de modifier chimiquement les SWCNT par des interactions spécifiques non-covalentes. Au cours de ce travail, je me suis intéressée à la fonctionnalisation non destructive des nanotubes de carbone par des dérivés pyréniques, le pyrène ayant la capacité de s'accrocher sur les parois des SWCNT par interaction π .

La synthèse de biotine fonctionnalisée par un groupement pyrène a permis d'entreprendre la biofonctionnalisation des SWCNT via l'adhésion des pyrènes. Deux approches innovantes ont été développées avec succès : la biotinylation des SWCNT en solution conduisant à des dispersions stables et la biotinylation de dépôts de SWCNT par trempage. Cette dernière procédure constitue une méthode simple, rapide, efficace et versatile de fonctionnalisation des nanotubes. Comme précédemment, j'ai ensuite utilisé les interactions affines biotine-avidine pour biofonctionnaliser ces nanotubes par des biomolécules modèles, à savoir la glucose oxydase et l'uréase.

Enfin, le concept totalement novateur d'ancrage des groupements pyrène sur les nanotubes de carbone associant l'adsorption par interactions π à des couplages radicalaires des motifs pyrène par électro-oxydation ont été démontrés. Cette électropolymérisation des pyrène-biotine adsorbés renforce leur stabilité mécanique et évite leur arrachement lors d'une post-fonctionnalisation par des macromolécules comme l'avidine puis une protéine biotinylée.

Le développement de différentes configurations de biocapteurs à glucose a confirmé la validité de cette approche originale couplant la spécificité de la fonctionnalisation par

Conclusion générale

interaction π uniquement sur les SWCNT au renforcement de la stabilité mécanique par polymérisation.

Ces différentes stratégies de modification des SWCNT ont été appliquées à un nouveau système d'immobilisation de biomolécule par interactions spécifiques que nous avons conçu et synthétisé : le système pyrène-adamantane/cyclodextrine-biomolécule. Nous avons clairement démontré la possibilité d'immobiliser des enzymes via l'inclusion de l'adamantane dans les cyclodextrines ouvrant ainsi la voie à de nouvelles méthodes douces et biocompatibles de fonctionnalisation des SWCNT par des macromolécules biologiques sans utilisation d'une couche intermédiaire de protéine pontante telle que l'avidine.

Il faut également souligner que les différentes modifications des nanotubes conduisant aux diverses configurations 3D que j'ai réalisées au cours de ces travaux ont été soigneusement caractérisées par des techniques d'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB), la spectroscopie Raman ainsi que les mesures d'angle de contact. Validant ainsi les structures proposées.

La continuation logique de ces travaux consistera à appliquer les stratégies précédentes à la réalisation d'immunocapteurs et de capteurs à ADN basés sur une transduction électrochimique soit ampérométrique par marquage enzymatique de la cible détectée soit impédimétrique sans étape de marquage mais avec une sonde rédox en solution. Une autre perspective consistera à utiliser le principe de modification des SWCNT par interaction du pyrène puis électropolymérisation de ce dernier pour fixer des ligands pyridiniques et ainsi ouvrir la voie à la fonctionnalisation des nanotubes par des complexes organométalliques. Ces derniers pourraient être directement synthétisés à la surface des SWCNT sans création de liaison covalente et donc sans altérer la conductivité des nanotubes. Cette approche apporterait aux configurations précédentes un système rédox interne supplémentaire susceptible de jouer le rôle de la sonde rédox pour la détection impédimétrique, voire permettrait la connexion électrique des enzymes.

Titre: Fonctionnalisation de nanotubes de carbone pour le développement de bio-architectures affines: Application aux Biocapteurs

Résumé :

L'objectif de cette étude consiste à développer des bio-architectures à base de nanotubes de carbone mono-feuillet à visées électroanalytiques.

Pour ce faire, différentes méthodes de fonctionnalisation de nanotubes de carbone ont été proposées à savoir la fonctionnalisation en solution, par trempage et par électropolymérisation en se servant des interactions π entre les nanotubes de carbone et des molécules π -conjugués (le pyrrole-biotine, le pyrène-biotine et le pyrène-adamantane). Les matrices utilisées pour la conception des biocapteurs sont basées sur les systèmes d'affinité entre l'avidine et la biotine, et entre l'adamantane et la β -cyclodextrine. La comparaison des performances des différents biocapteurs a permis de déterminer la méthode la plus adéquate pour la fonctionnalisation des nanotubes de carbone. Cette dernière consiste à former une monocouche de monomères par simple trempage puis de la renforcer par électropolymérisation oxydative dans une solution exempte de monomère. Cette stabilisation de la couche adsorbée préserve une excellente accessibilité à la surface de l'électrode sous-jacente. Les surfaces fonctionnelles qui en résultent ont été caractérisées par des méthodes physico-chimiques d'analyse.

Mots Clés : Nanotubes de Carbone, Fonctionnalisation, Biocapteurs, Affinité Avidine-Biotine, Affinité Adamantane- β Cyclodextrine, Pyrène, Pyrrole, Glucose Oxydase, uréase

Title: Carbon Nanotube Functionalization for the Development of Affinity Bio-architectures : Application to biosensors

Abstract:

The aim of this study is to develop bio-architectures based on single walled carbon nanotubes for electroanalytical applications.

For this purpose, different methods of carbon nanotubes functionalization were proposed such as, functionalization in solution, functionalization by dip-coating and by electropolymerization using the π interactions between carbon nanotubes and the π conjugated compounds (pyrrole-biotin, pyrene-biotin, pyrene-adamantane). The used matrixes for the conception of the biosensors are based on the affinity systems between avidin and biotin and that between adamantane and β -cyclodextrin. The comparison of the biosensors performances leads to the determination of the most suitable way for the carbon nanotube functionalization. The latter consists on forming a monomer monolayer by dip-coating reinforced by oxidative polymerization in a monomer free solution. These processes stabilize the adsorbed layer offering an optimum permeation to the underlying electrode. The resulting modified surfaces were characterized by surface physico-chemical analysis.

Key words: Carbon Nanotubes, Functionalization, Biosensors, Avidin-Biotin affinity, Adamantane- β Cyclodextrin Affinity , Pyrene, Pyrrole, Glucose Oxidase, urease