



HAL
open science

Membranes biomimétiques fluides ancrées sur électrodes ultra-planes

Ophélie Squillace

► **To cite this version:**

Ophélie Squillace. Membranes biomimétiques fluides ancrées sur électrodes ultra-planes. Physique [physics]. Le Mans Université, 2016. Français. NNT : 2016LEMA1004 . tel-01342705

HAL Id: tel-01342705

<https://theses.hal.science/tel-01342705>

Submitted on 6 Jul 2016

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.

Thèse de Doctorat

Ophélie SQUILLACE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université du Maine
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : 3MPL

Discipline : Physique

Unité de recherche : IMMM-CNRS-UMR 6283, Le Mans, France

Soutenue le 13 janvier 2016

Membranes biomimétiques fluides ancrées sur électrodes ultra-planes

JURY

Rapporteurs :	Frédéric NALLET , Professeur, Centre de Recherche Paul Pascal, Bordeaux Thierry CHARITAT , Professeur, Institut Charles Sadron, Strasbourg
Examineurs :	Alain BULOU , Professeur, Institut des Matériaux et des Molécules du Mans, Le Mans Edith PAJOT , Directrice de recherche, INRA, Jouy-en-Josas
Invité(s) :	Charles ESNAULT , Docteur, Université de Tours, Tours
Directeur de Thèse :	Guillaume BROTONS , Maître de conférence HDR, Institut des Matériaux et des Molécules du Mans, Le Mans

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans dirigé par Jean-Marc Grenèche. Je le remercie de m'avoir accueillie durant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier Guillaume Brotons qui a dirigé cette thèse et a su me guider dans mes travaux. Je souhaite le remercier pour son investissement, son enthousiasme, ses conseils autant sur les aspects techniques que sur l'interprétation des résultats et la rédaction. Merci Guillaume !

Je tiens ensuite à remercier Alain Bulou, Professeur à l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font également Messieurs Frédéric Nallet, Professeur au centre de recherche Paul Pascal, et Thierry Charitat, Professeur à l'Institut Charles Sadron, en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je leur adresse mes sincères remerciements.

J'exprime toute ma reconnaissance à Charles Esnault pour son implication, pour son aide en chimie et électrochimie, sa disponibilité, sa patience, sa bonne humeur (je n'oublierai pas tes petites blagues !), pour les nombreuses discussions que nous avons eues. Merci Charles, pour avoir été là et pour ton amitié !

Je remercie aussi sincèrement Nicolas Delorme pour m'avoir accordé de son temps et de son expérience avec les mesures AFM par rayure pointe diamant.

Durant ces trois années, j'ai eu l'opportunité de pouvoir enseigner en tant que monitrice. A cet égard, je voudrais remercier Jean-Marc Breteau, directeur de l'IUT de Mesures Physiques, ainsi que Yannick Le Bras, Fabienne Lagarde, Alain Bulou, Sylvie Houlbert, Mohamed Chebil et Nicolas Errien pour leurs conseils et leur présence.

Je voudrais exprimer toute ma considération aux ingénieurs et techniciens qui ont participé au bon fonctionnement de ce travail : Mathieu Edely, Francis Chavanon, Frédéric Amiard, Agnès Ranger, Lionel Guilmeau, Jean-Luc Guérin, Hervé Mézière, Sébastien Nogarotto...

Je remercie tout le laboratoire, et plus particulièrement les personnes du deuxième étage, pour l'ambiance sympathique.

Un grand merci à tous les thésards avec qui j'ai passé de très bons moments et auprès desquels j'ai trouvé du soutien et de l'amitié. Merci à Oxana, Cécile, Kenza, Xswan, Amal, Héloïse...

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans citer ma famille et Romain qui m'ont soutenue et encouragée pendant ces trois années.

TABLE DES MATIERES

CH. I. DES MEMBRANES NATURELLES AUX BICOUCHES BIOMIMETIQUES SUPPORTEES

A. MEMBRANES NATURELLES ET LEURS CONSTITUANTS

1. FONCTION DANS LA CELLULE
2. COMPOSITION DES MEMBRANES BIOLOGIQUES
3. ORGANISATION NON HOMOGENE DES LIPIDES ET INFLUENCE SUR LA FONCTION DES PROTEINES

B. ELABORATION DE MODELES BIOMIMETIQUES DE LA MEMBRANE

1. LES LIPOSOMES
 - a. Modèles de membranes libres : vésicules uni- et multi-lamellaires
 - b. Intermédiaires à la formation de bicouches lipidiques supportées modèles
2. LES BICOUCHES PLANES
 - a. Films noirs
 - b. Bicouches supportées et localisées
 - c. Membranes lipidiques ancrées

ANNEXES CH.I

A. PREPARATION DES SUVs NON FLUORESCENTES

BIBLIOGRAPHIE CH.I

CH. II. FONCTIONNALISATION D'ELECTRODES PAR MOLECULES ANCRE-HARPON POUR LES MEMBRANES.

A. STRATEGIES POSSIBLES POUR LA FONCTIONNALISATION D'ELECTRODES EN VUE D'HARPONNER DES MEMBRANES.

1. CHIMIE DE GREFFAGE DES MOLECULES ANCRE-HARPON ET DU COUSSIN HYDROPHILE.
2. PRESENTATION DE NOTRE STRATEGIE DE FONCTIONNALISATION POUR L'IMMOBILISATION DE MOLECULES D'INTERET DE TYPE ANCRE-HARPON
3. PRE-FONCTIONNALISATION ORGANIQUE APPORTANT UNE FONCTION REACTIVE A -OH

B. PRE-FONCTIONNALISATION ELECTROCHIMIQUE ET ACTIVATION DE L'INTERFACE METAL/SAUMURE

1. MODIFICATION DE SURFACE PAR ELECTRO-GREFFAGE. ELECTRO-REDUCTION DES SELS D'ARYLDIAZONIUMS POUR L'OBTENTION DE LA COUCHE ORGANIQUE PARA-BENZENE CHLORURE DE SULFONYLE (AR-SO₂CL)
 - a. Electrodes
 - b. Technique de voltampérométrie cyclique (CV)
 - c. Obtention de la fonction para-benzene chlorure de sulfonyle. Formation de Métal-Ar-SO₂Cl
2. CARACTERISATION DE LA COUCHE ORGANIQUE DE PRE-FONCTIONNALISATION PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE (EIS)
 - a. Technique EIS en mode non faradique.
 - b. Caractérisation EIS en mode non faradique de la pré-fonctionnalisation

- c. Technique EIS en mode Faradique (utilisation d'une sonde redox)
 - d. Caractérisation EIS en mode faradique de la pré-fonctionnalisation
 - e. Conclusion sur les mesure EIS en mode non-Faradique et Faradique
- C. SUR-GREFFAGE DES TERMINAISONS -OH DES BLOCS HYDROPHILES DES TENSIO-ACTIFS COMMERCIAUX**

COMMERCIAUX

1. FONCTIONNALISATION PUREMENT HYDROPHILE (SUR-GREFFAGE PEO_N-OH) ET FONCTIONNALISATION POUR L'ANCRAGE DES MEMBRANES (SUR-GREFFAGE DES BRIJ).
 - a. Choix de la molécule ancre(hydrophile)-harpon(hydrophobe)
 - b. Choix du cousin hydrophile
 - c. Caractérisation faradique de la fonctionnalisation sur électrode d'or millimétrique
 - d. Conclusion sur les mesures EIS en mode faradique
 - e. Caractérisation EIS en mode non faradique de la fonctionnalisation sur électrode d'or millimétrique
 - f. Conclusion sur les mesure EIS en mode non-Faradique
 - g. Suivi de la fonctionnalisation sur couches d'or par microbalance à cristal de quartz (QCM)
2. CONCLUSIONS SUR LA STRATEGIE DE FONCTIONNALISATION CHOISIE

ANNEXES CH.II

A. NETTOYAGE DES ELECTRODES

1. L'ELECTRODE D'OR MILLIMETRIQUE
2. LES QUARTZ D'OR QUALITE MIROIR

B. FONCTIONNALISATION DES ELECTRODES

- ##### **C. EIS EN MODE NON FARADIQUE DES FONCTIONNALISATIONS BRIJ58 ET PEO₉ A DIFFERENTES CONCENTRATIONS**

BIBLIOGRAPHIE CH.II

CH. III. FORMATION DE MEMBRANES MODELES ANCREES SUR ELECTRODE

A. SUIVI PAR SPR SUR BIOPUCE D'OR FONCTIONNALISEE

1. DEROULEMENT DES EXPERIENCES SPR ET RESULTATS
2. CONCLUSION SUR LES CINETIQUES SPR
3. VERIFICATION PAR AFM DE LA PRESENCE DE MEMBRANE SECHEE

B. SUIVI PAR QCM SUR QUARTZ D'OR FONCTIONNALISE

1. DEROULEMENT DES EXPERIENCES QCM ET RESULTATS
2. CONCLUSION SUR LES CINETIQUES QCM

C. EFFICACITE DES FONCTIONNALISATIONS POUR L'IMMOBILISATION DES MEMBRANES.

1. LES DIFFERENTES CINETIQUES D'ADSORPTION EN QCM
 - a. Discussion
 - b. Conclusion
2. COUPLAGE DES TECHNIQUES QCM ET SPR
 - c. Discussion

ANNEXES CH.III

- A. TECHNIQUE D'ANALYSE « RESONNANCE PLASMON DE SURFACE »
- B. TECHNIQUE D'ANALYSE « MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ »
- C. TECHNIQUE DE MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

BIBLIOGRAPHIE CH.III

CH. IV. ELABORATION D'ELECTRODES ULTRA-PLANES ADAPTEES A L'ETUDE DES MEMBRANES SUPPORTEES

A. REALISATION DES ELECTRODES DE TYPE COUCHES MINCES DE CHROME SUR VERRE OU SILICIUM, PAR EVAPORATION THERMIQUE ET PULVERISATION CATHODIQUE

- 3. DEPOT DE COUCHES MINCES DE CHROME
 - a. Choix de la technique de dépôt
 - b. Conditions de dépôt des couches-minces de chrome
- 4. QUALITE DES ELECTRODES REALISEES
 - a. Conductivité électrique des couches minces de chrome
 - b. Etat de surface et composition des couches minces de chrome
- 5. CONCLUSIONS SUR L'OPTIMISATION DES ELECTRODES DE CHROME

B. FONCTIONNALISATION DES COUCHES MINCES DE CHROME POUR L'ANCRAGE DES MEMBRANES

- 1. PRE-FONCTIONNALISATION PARABENZENE DE SULFONYLE ET SUR-GREFFAGE DES MOLECULES COMMERCIALES BRIJ58 ET PEO
 - a. Pré-fonctionnalisation parabenzene de sulfonyle par voltamérométrie cyclique
 - b. Signature électrochimique de la fonctionnalisation des couches minces
 - c. Homogénéité de la fonctionnalisation vérifié par AFM à l'air
 - d. Caractérisation de la fonctionnalisation par réflectivité des rayons-X à l'air
 - e. Evolution de l'angle de contact entre les différentes étapes de la fonctionnalisation
 - f. Conclusions sur la fonctionnalisation des couches minces chrome

C. FORMATION D'UNE MEMBRANE HARPONNEE SUR LES ELECTRODES DE CHROME PLAN FONCTIONNALISEES

- 1. SIGNATURE ELECTROCHIMIQUE DES MEMBRANES SUR CHROME FONCTIONNALISE
- 2. EVOLUTION DES ANGLES DE CONTACT ET DE LA TOPOGRAPHIE AFM
- 3. CARACTERISATION PAR REFLECTIVITE DES RAYONS-X APRES CONTACT AVEC LE DOPC

D. DYNAMIQUE DES MEMBRANES SUIVIE PAR FLUORESCENCE. VALORISATION DE LA TRANSPARENCE DES ELECTRODES DE CHROME.

- 1. DYNAMIQUE DES MEMBRANES BIOMIMETIQUES
- 2. MESURE DES COEFFICIENTS DE DIFFUSION D'UNE BICOUCHE SUPPORTEE
 - g. Couches minces de chrome semi-transparentes pour le FRAP.

E. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

ANNEXES CH. IV

A. REFLECTIVITE SPECULAIRE DES RAYONS X ET DES NEUTRONS

BIBLIOGRAPHIE CH. IV

TABLE DES MATIERES CH.I

INTRODUCTION.....	2
--------------------------	----------

CH. I. DES MEMBRANES NATURELLES AUX BICOUCHES BIOMIMETIQUES

SUPPORTEES.....	4
------------------------	----------

A. MEMBRANES NATURELLES ET LEURS CONSTITUANTS.....	4
---	----------

1. FONCTION DANS LA CELLULE.....	4
2. COMPOSITION DES MEMBRANES BIOLOGIQUES	5
3. ORGANISATION NON HOMOGENE DES LIPIDES ET INFLUENCE SUR LA FONCTION DES PROTEINES	6

B. ELABORATION DE MODELES BIOMIMETIQUES DE LA MEMBRANE.....	8
--	----------

1. LES LIPOSOMES	10
a. Modèles de membranes libres : vésicules uni- et multi-lamellaires.....	10
b. Intermédiaires à la formation de bicouches lipidiques supportées modèles.....	11
i. Fusion de vésicules	12
ii. Fabrication de petites vésicules uni-lamellaires de DOPC	14
2. LES BICOUCHES PLANES	16
a. Films noirs	17
b. Bicouches supportées et localisées.....	18
i. La balance à film mince et cuve de Langmuir-Blodgett	19
ii. Membranes supportées sur surface solide	20
c. Membranes lipidiques ancrées.....	21
i. Utilisation des molécules de type PEO-lipide	24
ii. Molécules harpons de type copolymères amphiphiles.....	28

<u>BIBLIOGRAPHIE CH.I.....</u>	30
---------------------------------------	-----------

Introduction

Les bicouches lipidiques constituent l'architecture socle des membranes biologiques et l'environnement bidimensionnel de leurs protéines. Libres en solution, ces membranes biomimétiques sont utilisées pour déterminer les mécanismes de régulation des canaux ioniques et autres protéines transmembranaires. Supportées à l'interface solide/liquide, elles permettent l'étude des processus d'adhésion, d'interaction cellulaire,... Les membranes supportées sont de plus en plus utilisées avec, notamment, le développement de supports hydrophiles, tels que les coussins de polymères qui permettent d'éviter leur immobilisation complète sur le substrat et la perte de fluidité moléculaire. L'obtention d'un volume aqueux entre la membrane et le support est particulièrement intéressante pour conserver la fluidité des molécules et pouvoir étudier le transport, autour ou à travers la membrane (ions, présence de défauts, pores, ...), en se rapprochant de son environnement naturel.

Dans ce domaine, nous avons développé une stratégie de fonctionnalisation rapide, peu coûteuse et versatile, permettant la formation d'une membrane biomimétique fluide sur des substrats spécifiquement conçus pour son étude structurale et dynamique. La chimie de surface que nous proposons commence par une pré-fonctionnalisation organique possible sur tout conducteur, sans apport de rugosité et se poursuit par la formation du coussin récepteur de la membrane. Pour celui-ci, nous avons détourné de leur utilisation habituelle des molécules commerciales de type oligomères amphiphiles associatifs (Brij, C_iE_j, AKYPO, Pluronic), en leur attribuant le rôle de système ancre-harpon. La plupart de ces molécules possèdent un alcool primaire peu réactif en extrémité hydrophile (coté ancre), que nous avons engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec la première couche organique. Ceci permet de créer une liaison covalente forte entre l'ancre hydrophile et le substrat, plus forte que les thiolates sur or par exemple, ce qui consiste un point essentiel pour conserver cette liaison lors de l'application de champ électrique en électrochimie. L'autre extrémité hydrophobe (l'harpon) peut s'insérer dans la membrane et la stabiliser. Un mélange adapté, de ces molécules ancre-harpon avec des molécules purement hydrophiles (PEG, etc...), apporte l'hydratation nécessaire à l'interface et une densité d'harpons faible, mais suffisante, pour maintenir la membrane et conserver sa fluidité. Ceci ouvre des perspectives de fonctionnalisations variées, au vu de la grande diversité des molécules commerciales amphiphiles existantes (brins hydrophiles et lipophiles en toutes proportions), et de la variété des supports conducteurs. Localisée sur une électrode de faible rugosité, la membrane flottante de quelques nanomètres d'épaisseur, devient accessible à l'utilisation de nombreuses techniques de caractérisation, telles que la microscopie à force atomique (AFM), la microbalance à cristal de quartz (QCM), la plasmonique de surface (SPR), les

spectroscopies électrochimiques et la réflectivité (X et neutrons). Semi-transparentes, ces électrodes fonctionnalisées rendent aussi possible l'utilisation des microscopies optiques, exaltées ou de fluorescence, ce qui nous a conduits à la fabrication de couches minces sur des substrats adaptés à ces techniques (transparents, conducteurs, utilisables en réflectivité X et neutrons).

Ce manuscrit est composé de 5 chapitres qui s'articulent autour de la fonctionnalisation de surface destinée à l'élaboration et la caractérisation d'un modèle de membrane ancrée sur couches minces.

Le chapitre 1 permet d'inscrire la thèse dans son contexte en définissant tout d'abord les membranes naturelles, puis les différents modèles de membrane et leurs outils de caractérisation. Nous documentons tout particulièrement les modèles de membrane ancrées de la littérature proches du système que nous avons élaboré. Nous y présentons aussi les façons de former une membrane sur un support, en mettant l'accent sur la méthode que nous avons utilisé, par fusion de vésicules.

Le chapitre 2 est consacré à la présentation de notre stratégie de fonctionnalisation du support solide par des molécules commerciales pour ancrer la membrane. Sont présentées, à la fois la chimie de surface permettant de créer la liaison covalente entre le substrat et les molécules d'ancrage par électro-greffage et le choix de ces molécules (Brij) qui joueront le rôle d'ancre-harpon. L'obtention de cette fonctionnalisation sur or y est démontrée essentiellement par analyse électrochimique. Nous présentons ici le principe de la technique et ses deux modes faradique et non faradique, ainsi que le dispositif expérimental.

Le chapitre 3 présente l'efficacité de la fonctionnalisation pour l'harponnage des membranes. Nous montrons expérimentalement, par microbalance à cristal de quartz (QCM) et résonance plasmon de surface (SPR), que de la membrane est immobilisée à la surface et présentons les hypothèses d'organisation de celle-ci, depuis la bicouche lipidique aux vésicules intactes éparses.

Le chapitre 4 est consacré à la caractérisation de notre modèle de membrane ancrée sur des électrodes ultra-planes de chrome et semi-transparentes. Par analyse électrochimique, la capacité et la résistivité électrique des membranes sont estimées, ce qui permet d'évaluer la qualité des membranes et leur densité de défauts (présence de courants de fuite). Nous y présentons également l'élaboration des électrodes par dépôt de couches minces sur verre et leur caractérisation en termes de conduction, de rugosité, et d'épaisseur. Enfin, la fluidité des membranes ancrées sur électrodes semi-transparentes de chrome est évaluée grâce à la technique de fluorescence par recouvrement après photo-blanchiment (FRAP), qui permet de mesurer les coefficients de diffusion des lipides au sein de la bicouche.

Ch. I. Des membranes naturelles aux bicouches biomimétiques supportées

A. Membranes naturelles et leurs constituants

1. Fonction dans la cellule

Les membranes ont un rôle essentiel dans la vie des cellules. Que ce soit la membrane plasmique, qui entoure la cellule, ou les membranes des différents organites intracellulaires (Figure 1), elles permettent toutes de maintenir les différences indispensables entre le milieu interne à la membrane et le milieu externe (par exemple en ions, ATP ou autres solutés).

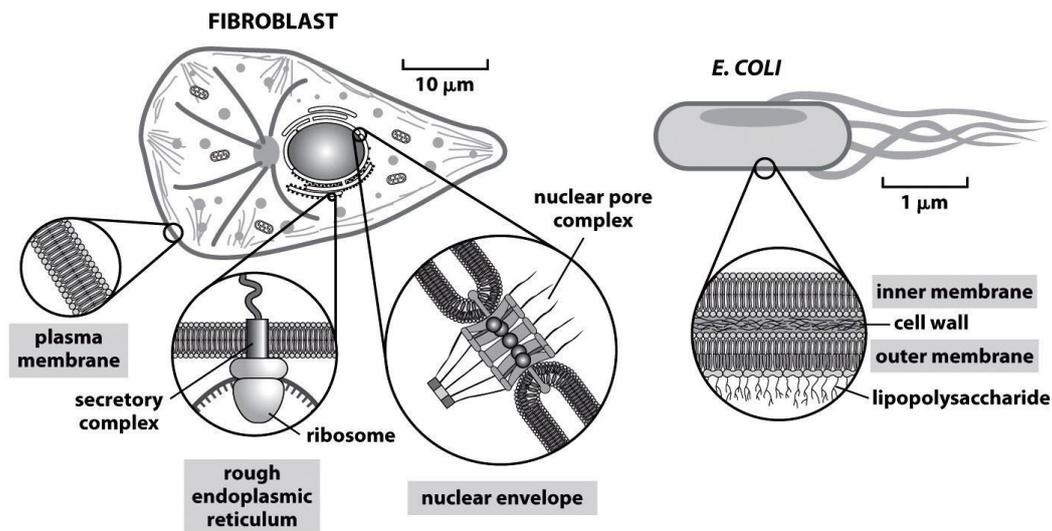


Figure 11.2 Physical Biology of the Cell (© Garland Science 2009)

Figure 1 : Exemple de membrane dans les cellules biologiques

Ce maintien peut s'effectuer de façon passive grâce à leur perméabilité limitée aux ions (canaux ioniques) ou grâce à l'action de certaines protéines intra-membranaires qui consomment de l'énergie pour entretenir un gradient en certains types d'ions. Ce caractère actif des membranes de cellules vivantes implique que ces membranes sont souvent « hors équilibre thermodynamique » (Figure 2).

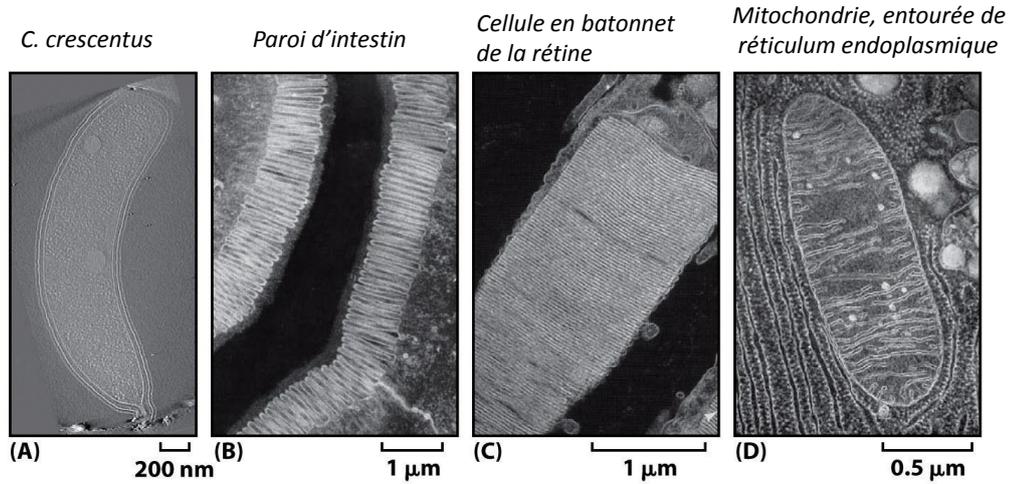


Figure 11.3 Physical Biology of the Cell (© Garland Science 2009)

Figure 2 : Image de microscopie électronique de membranes biologiques

2. Composition des membranes biologiques

Quelle que soit sa provenance, une membrane est essentiellement composée d'une bicouche lipidique (Singer and Nicolson 1972) dans laquelle sont insérées des protéines (Figure 3). Suivant le type de membrane, la composition des différents lipides change (Figure 4), ainsi que la quantité de protéines qui peut aller de 25% en masse pour les membranes des cellules nerveuses (myélines) à 75% pour les membranes impliquées dans la transduction de l'énergie (dans les mitochondries ou les chloroplastes), en passant par 50% pour la membrane plasmique.

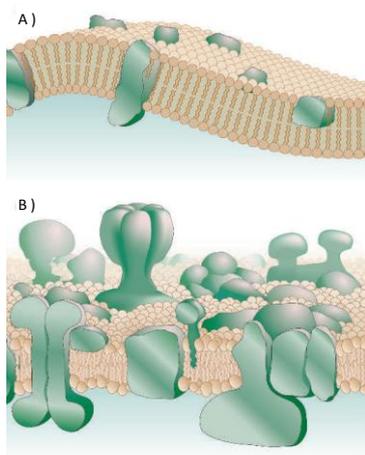


Figure 3 : Modèle global pour la structure de la membrane A) modèle de la mosaïque fluide de Singer-Nicolson B) version modifiée et mise à jour du modèle

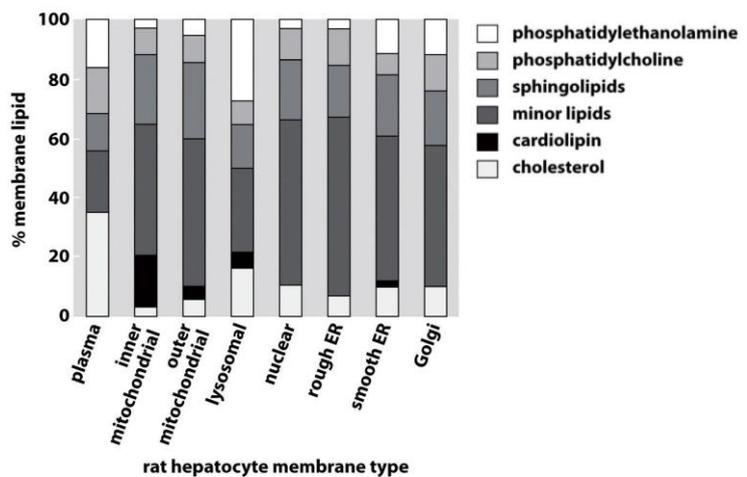


Figure 11.6a Physical Biology of the Cell (© Garland Science 2009)

Figure 4 : Structure et diversité lipidique dans la cellule

La bicouche lipidique contient principalement des phospholipides (type PE, PS, PC, SM14 (famille des céramides)), du cholestérol et des glycolipides (Figure 5). Pour comprendre pourquoi les membranes biologiques ont une composition si complexe (il existe entre 500 et 1000 espèces de lipides répertoriés (Edidin 2003), on peut s'imaginer que la membrane sert de solvant à 2 dimensions aux protéines membranaires, comme l'eau est un solvant à 3 dimensions pour les protéines du cytoplasme. Suivant la polarité ou la structure de l'environnement, les conditions d'incorporation et d'activité seront différentes ; il existe aussi un rapport entre la diffusion et l'organisation des lipides autour des protéines et leur action (Gupte, Wu et al. 1984; Klose, Ejsing et al. 2010).

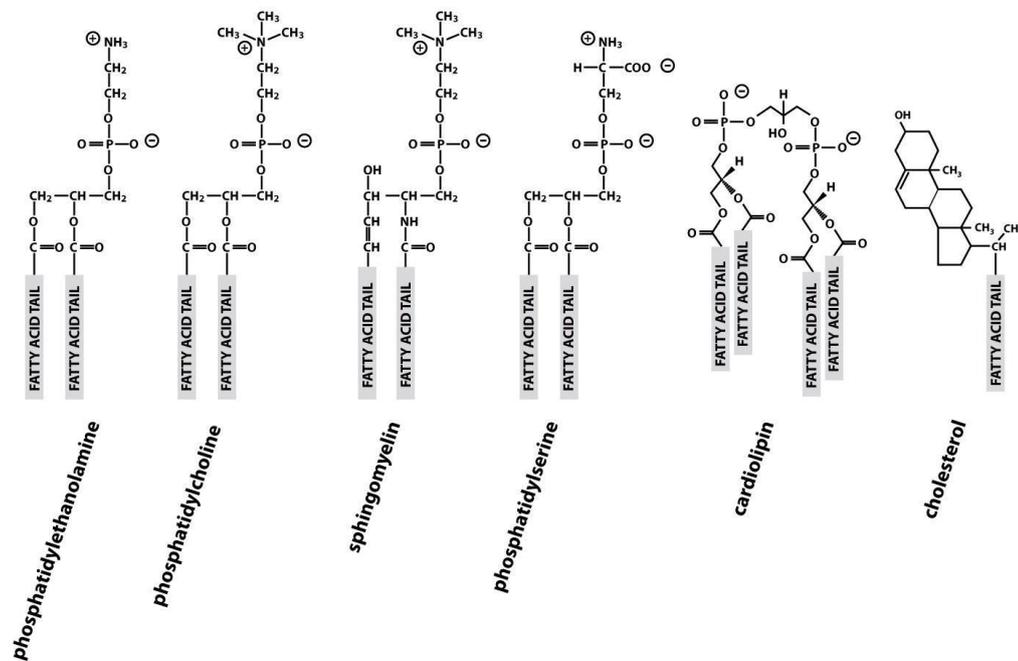


Figure 11.6b Physical Biology of the Cell (© Garland Science 2009)

Figure 5 : Structure des principaux lipides

3. Organisation non homogène des lipides et influence sur la fonction des protéines

Pour terminer cette partie sur les membranes biologiques, nous pouvons aussi remarquer que, contrairement aux membranes biomimétiques étudiées plus loin, elles sont asymétriques (Figure 6), c'est-à-dire que la distribution des lipides dans les deux monocouches de la membrane n'est pas toujours équivalente (Rothman and Lenard 1977; Devaux and Morris 2004). Les glycolipides par exemple se trouvent toujours majoritairement du côté externe de la membrane. Un autre exemple est celui des hématies humaines, dans lesquelles les lipides à têtes PC (phosphatidylcholine) se

trouvent essentiellement dans la couche externe alors que la couche interne contient plutôt les lipides à têtes PE (E : éthanolamine) et PS (S : sérine). Puisque les PS sont chargés négativement, il peut exister une différence de charges significative entre les deux monocouches.

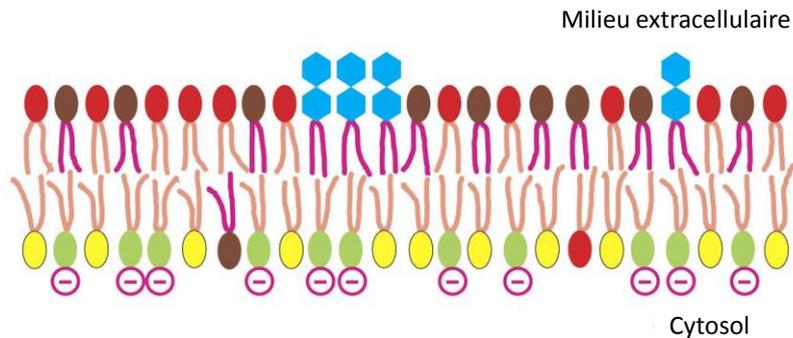


Figure 10-16 Molecular Biology of the Cell(© Garland Science 2008)

Figure 6 : Distribution asymétrique des lipides et glycolipides dans les bicouches lipidiques de globules rouges humains

L'asymétrie entre feuillettes des membranes biologiques apparaît dès leur synthèse dans le réticulum endoplasmique et est créée grâce à l'action de certains translocateurs, les flippases, qui déplacent les phospholipides d'une monocouche à une autre. Cette asymétrie est potentiellement importante sur le plan fonctionnel, notamment dans la signalisation (Sprong, van der Sluijs et al. 2001). L'organisation latérale des lipides n'est pas non plus homogène au sein de la membrane. En effet, les SM (shingomyelines) et le cholestérol ont tendance à se regrouper pour former des microdomaines appelés « rafts » (Figure 7).

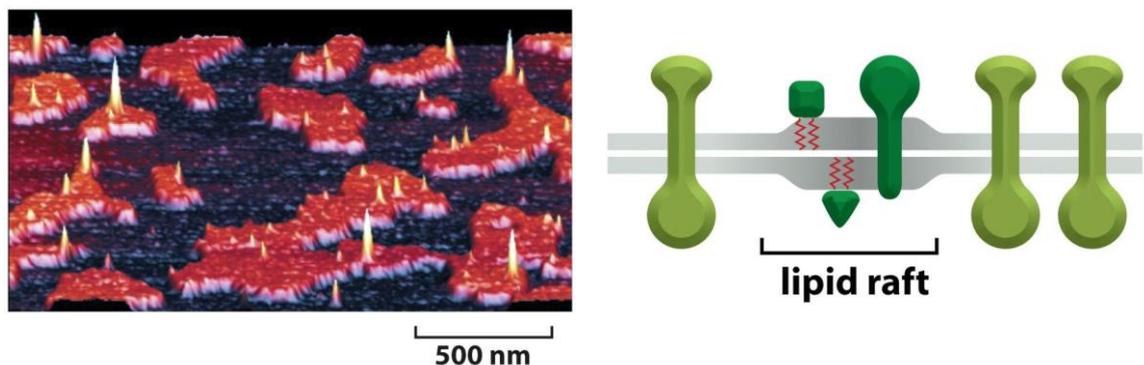


Figure 10-14a Molecular Biology of the Cell(© Garland Science 2008)

Figure 7 : Radeaux lipidiques (« lipidrafts») observés par AFM (à gauche) dans les membranes lipidiques artificielles et représentation schématisée d'un raft dans une bicouche lipidique avec des protéines insérées

L'hypothèse de l'existence des rafts dans les membranes biologiques a été émise pour expliquer comment les lipides pouvaient être triés et exportés spécifiquement dans le trafic intracellulaire grâce aux propriétés de séparation de deux phases de ces micro-domaines (Simons and Van Meer 1988) (Simons K and Ikonen E 1997). Cette hypothèse est en bon accord avec la vision plus générale de la membrane comme « mosaïque fluide » (Figure 4, (Singer SJ and Nicolson GL 1972)). Plus récemment, ces micro-domaines ont pu être observés directement de façon expérimentale, nous pouvons citer par exemple les travaux de Prior et al. (Prior, Muncke et al. 2003).

B. Elaboration de modèles biomimétiques de la membrane

La complexité des membranes biologiques, de part leur hétérogénéité moléculaire (variété des lipides, flexibilité organisationnelle) et leur fluidité, rend l'étude de leur structure et leur fonction difficile. Pour cette raison, les modèles biomimétiques notamment celui de bicouches phospholipidiques modèles ont fait l'objet d'un grand intérêt général et ont été largement développés. Des modèles tels que les vésicules multi-lamellaires (Rand and Parsegian 1989; McIntosh 2000; Nagle and Tristram-Nagle 2000; Nagle and Tristram-Nagle 2000), uni-lamellaires (Gallova, Uhrikova et al. 2004; Kucerka, Kiselev et al. 2004) mais aussi de multicouches orientées (Tristram-Nagle, Kim et al. ; Lyatskaya, Liu et al. 2001; Tristram-Nagle, Liu et al. 2002; Liu and Nagle 2004; Kucerka, Nagle et al. 2008) et de bicouches planes uniques ont permis d'obtenir des informations sur les propriétés structurales des bicouches lipidiques et d'étudier par la suite le lien entre la structure et la fonction des membranes ainsi que leur interaction avec des protéines.

Pour reconstituer artificiellement les membranes biologiques, ou du moins la contribution passive de la bicouche lipidique, et mimer ainsi leur comportement, il suffit de mettre en solution aqueuse le mélange de lipides souhaité. Les lipides s'auto-assemblent alors naturellement pour former différentes sortes de micelles ou de bicouches (Figure 8). La morphologie des phases formées dépend de plusieurs paramètres dont la concentration, la température, mais aussi la forme géométrique des molécules. En effet, les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent à la fois une tête polaire hydrophile et deux queues hydrophobes (les deux chaînes carbonées) et forment des bicouches planes ou sphériques. Les queues s'agrègent entre elles pour ne pas être en contact avec l'eau alors que les têtes, au contraire, sont tournées vers l'eau.

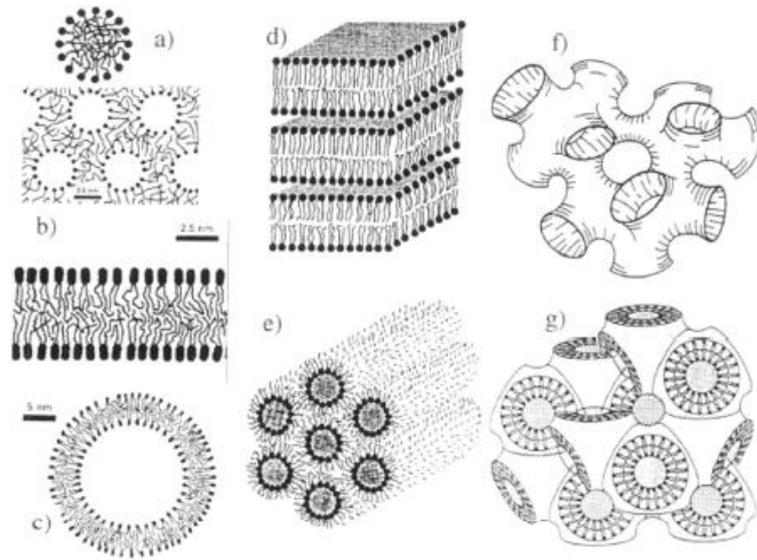


Figure 8 : Différentes formes d'auto-assemblage spontané des lipides en solution aqueuse

a) micelles et micelles inverses, b) et c) bicouche, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bi-continue. (Decher and Hong 1991; Decher, Hong et al. 1992)

C'est la forme géométrique du lipide (et donc son nombre d'insaturations qui entraînent des torsions plus faciles dans la chaîne carbonée), qui conditionne le type d'auto-assemblage et plus particulièrement sa courbure (Israelachvili 1992; Lipowsky 1995). L'assemblage de molécules cylindriques donne naissance à une bicouche plane alors que des lipides coniques donnent une bicouche avec une courbure spontanée ().

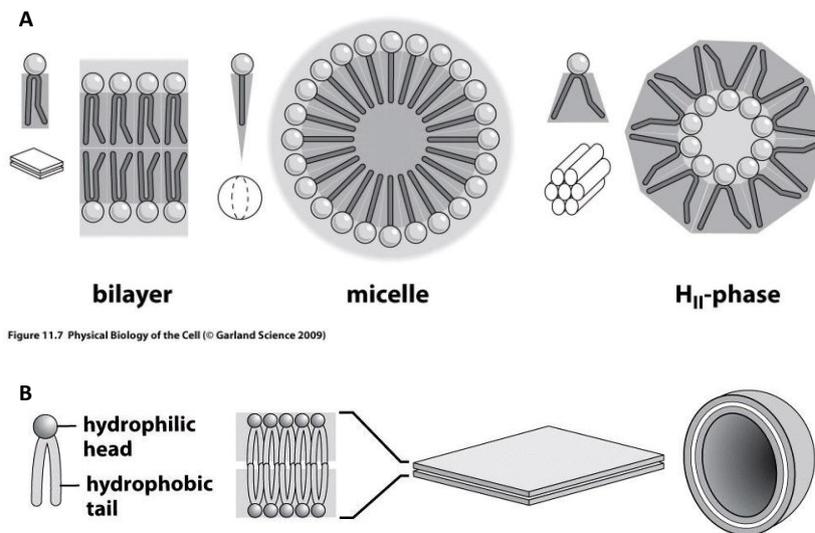


Figure 11.7 Physical Biology of the Cell (© Garland Science 2009)

Figure 9 : A) Relation entre la forme des lipides et la forme de la structure après auto-assemblage, B) Formation d'une vésicule à partir d'une bicouche lipidique

1. Les liposomes

a. Modèles de membranes libres : vésicules uni- et multi-lamellaires

Les liposomes (ou vésicule : sphère close où le milieu interne est séparé du milieu externe par la membrane) constituent le modèle le plus simple de structure biomimétique cellulaire (objet constitué d'une membrane lipidique sans autres constituants). En solution, les bicouches phospholipidiques peuvent spontanément se refermer sur elles-mêmes pour former ces vésicules. En effet, cette organisation permet de minimiser les interactions entre leurs parties hydrophobes et les molécules d'eau et ne s'obtient qu'à une température supérieure à leur transition de phase. Les vésicules sont des phases souvent métastables, mais elles sont beaucoup utilisées pour mimer la forme des organites de la cellule (leur forme sphérique est bien adaptée) ou en faire des membranes libres modèles selon leur taille, qui s'étend de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre. Les courbures de la membrane sont imposées par les lipides utilisés et déterminent les conditions de formation et de stabilité d'une vésicule de taille donnée.

Il existe plusieurs sortes de vésicules : celles constituées d'une seule bicouche (appelées unilamellaires), et celles constituées de plusieurs bicouches (appelées multilamellaires ou oignons). Les vésicules unilamellaires sont classées par taille :

- les « Small Unilamellar Vesicles » (SUVs) ayant un diamètre de 40 à 100 nm
- les « Large Unilamellar Vesicles » (LUVs) ayant un diamètre de 100 nm à 1 µm

- les « Giant Unilamellar Vesicles » (GUVs) ayant un diamètre de 1 à 100 µm. Les GUVs sont les seules à pouvoir être observées par microscopie optique, c'est donc celles qui sont les plus utilisées pour modéliser les phénomènes des membranes naturelles, comme celui de séparation de phases en domaines solides et fluides (Figure 10). L'épaisseur typique d'une membrane est en moyenne de 4 à 6 nm (deux fois l'épaisseur d'un feuillet) et la surface moyenne occupée par un lipide est de l'ordre de 0,8 nm².

La forme des vésicules est obtenue par minimisation de leur énergie. Même si la forme sphérique correspond le plus souvent à la forme d'équilibre, toute une variété de formes peut être obtenue en faisant varier les paramètres caractéristiques de la vésicule : le volume, la surface, la courbure spontanée ou la température (McConnell, Watts et al. 1986). De plus, pour former un liposome, il est préférable que l'aire de la tête hydrophile des lipides soit légèrement supérieure à la section de la chaîne aliphatique. Les molécules qui remplissent ces conditions s'auto-assemblent spontanément en vésicules. Automatiquement, le nombre de molécules lipidiques sur le feuillet externe est différent de celui du feuillet interne. Cette différence tend à

disparaître lorsque le rayon de la vésicule devient grand par rapport à la longueur d'une molécule.

Lorsqu'elles forment des vésicules, les bicouches lipidiques limitent les échanges entre le compartiment interne et l'extérieur. Les bicouches pures sont imperméables aux ions et aux grosses molécules polaires, et seulement partiellement perméables à l'eau qui peut s'immiscer entre les lipides surtout lorsque la pression osmotique est différente au cœur de la vésicule et à l'extérieur. Ceci signifie que les fonctions physiologiques des membranes biologiques ne peuvent reposer simplement sur la bicouche lipidique mais nécessitent la présence d'autres composants tels que les protéines membranaires pour permettre des échanges contrôlés entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

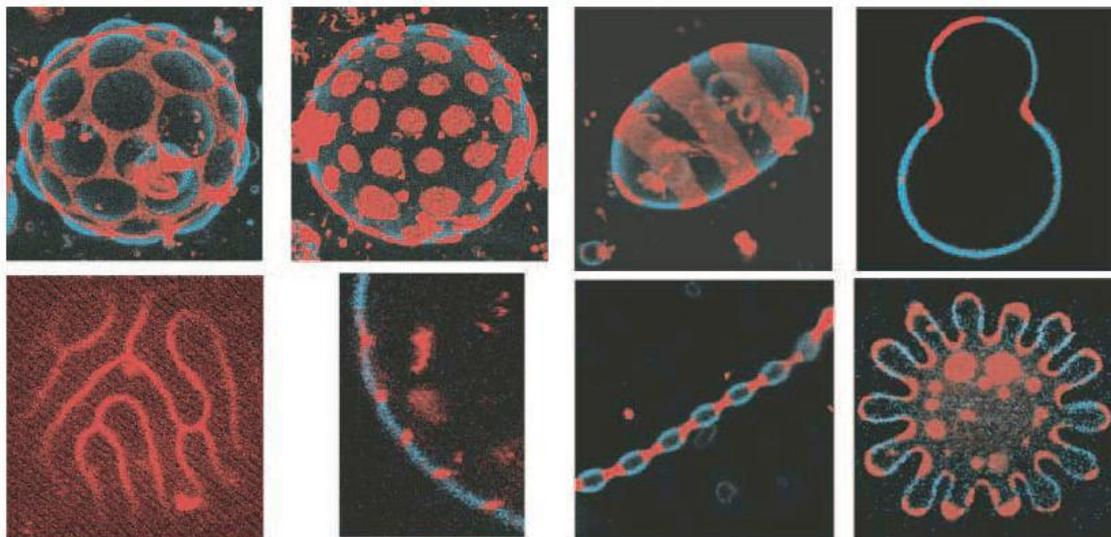


Figure 10 : Séparation de phase dans des vésicules géantes

Liquide ordonné : bleu (riche en sphingomyéline), liquide désordonné : rouge (DOPC) (Baumgart, Hess et al. 2003)

b. Intermédiaires à la formation de bicouches lipidiques supportées modèles

Outre leur utilité pour la modélisation de membranes, les vésicules présente un grand intérêt puisqu'elles peuvent intervenir dans le processus de formation d'une bicouche lipidique supportée (SBL) par voie de fusion. L'autre technique simple et très répandue étant celle de l'incubation dans un solvant organique ou par dépôt à la tournette (« spin-coating » en anglais), technique que nous n'avons pas utilisée car elle peut souvent altérer les protéines insérées dans la membrane et n'est pas compatible avec la stabilisation de membranes biologiques extraites du vivant (Mennicke and Salditt 2002; McGillivray, Valincius et al. 2007). Nous présentons la méthode de

formation d'une membrane par fusion de vésicules dans la partie qui suit, méthode utilisée ici, dans ces travaux de thèse.

i. Fusion de vésicules

Une des façons les plus simples de former une bicouche supportée (SLB « supported lipid bilayer » en anglais) est d'exposer une surface à une solution de vésicules afin que les membranes des vésicules s'adsorbent sur elle et qu'une bicouche plane se forme (Figure 11). La fusion de vésicule a été utilisée très tôt pour préparer des membranes supportées pouvant intégrer des protéines (Sui, Urumow et al. 1988). Les processus qui régissent exactement ces transformations sont encore discutés. Beaucoup d'études expérimentales et théoriques ont permis de mieux comprendre la formation des SLB et de contrôler leur cinétique de formation (Egawa and Furusawa 1999; Richter, Mukhopadhyay et al. 2003; Richter and Brisson 2005; Richter, Maury et al. 2005; Stroumpoulis, Parra et al. 2006).

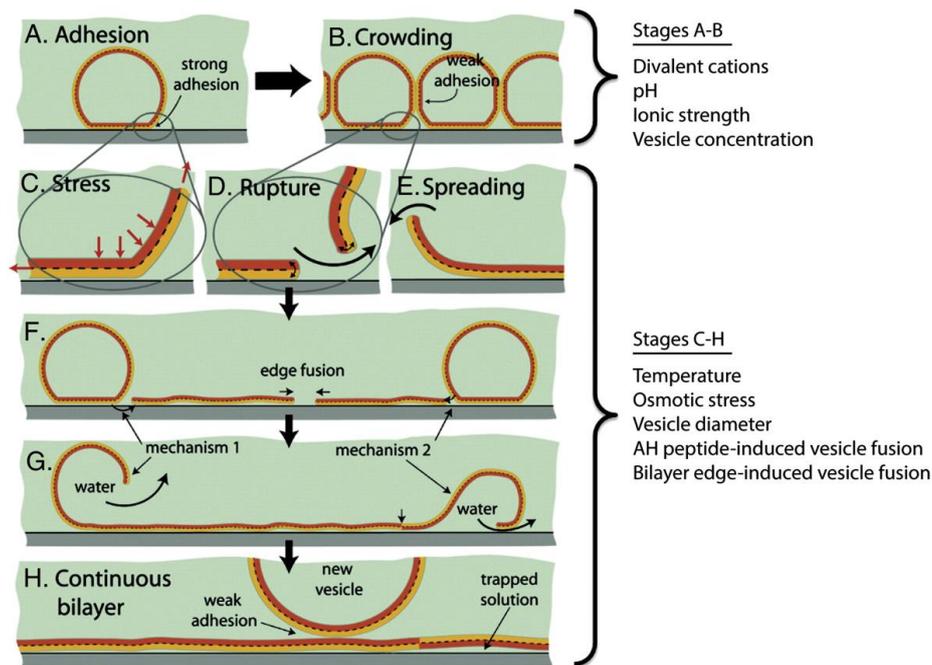


Figure 11 : Schéma du processus de fusion des vésicules sur une surface par A) adhésion, B) augmentation du taux de couverture, (C-E) rupture et étalement (Hardy, Nayak et al. 2013)

Pour que la fusion puisse avoir lieu, il faut que les lipides soient dans un état de fluidité (énergie d'interaction minimale), c'est-à-dire qu'il faut travailler au-delà de la température de transition de phase nématique. Plusieurs schémas peuvent se présenter lorsqu'une vésicule rencontre la surface (Figure 12). Si son rayon est insuffisamment grand, elle se déforme un peu au contact du substrat mais reste intacte, s'il est suffisamment grand, sa déformation au contact de la surface permet sa

rupture (Reviakine and Brisson 2000). Les vésicules avoisinantes peuvent influencer sur la rupture des autres, notamment lorsqu'elles fusionnent entre elles donnant une vésicule de rayon plus grand qui pourra s'ouvrir. Il est parfois nécessaire d'attendre un taux de couverture minimum de la surface en vésicules pour que celles-ci se touchent, s'ouvrent et forment une SLB. Lorsque les vésicules diffusent proche de la surface et qu'elles s'adsorbent, l'interaction stérique qu'elles ont entre elles va augmenter la tension latérale dans la membrane (Lipowsky and Seifert 1991). Lorsque cette tension est suffisamment élevée, la formation d'un pore va permettre de diminuer l'énergie de la vésicule et le rayon du pore va s'agrandir jusqu'à ce que la tension diminue suffisamment pour que l'équilibre de la vésicule soit atteint. Les domaines de vésicules éclatées vont ensuite diffuser à la surface pour donner une bicouche quasi sans défauts. Parfois, même au-delà de ce taux de couverture critique, certaines vésicules peuvent rester intactes et se stabiliser ainsi sur la surface.

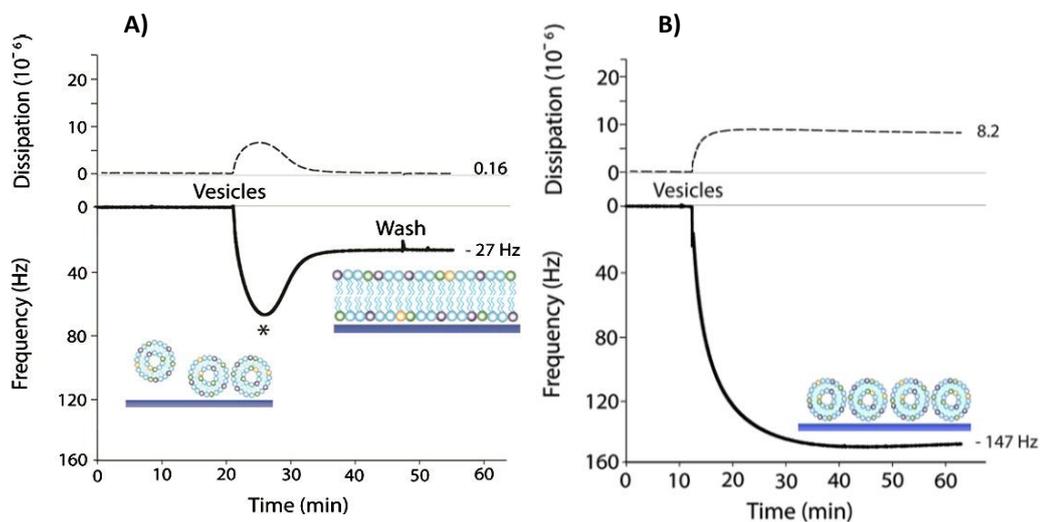


Figure 12 : A) SLB obtenue sur verre par fusion de vésicules de POPC une fois un taux de couverture critique atteint B) couche de vésicules intactes obtenue sur verre par fusion de vésicules HIV-1 (POPC / POPE / POPS / chol) (Hardy, Nayak et al. 2013)

Les conditions de déroulement selon un schéma plus qu'un autre dépendent de l'énergie d'interaction entre les lipides et la surface. Elles sont liées à la nature du substrat (matériau, rugosité, charge ...), des vésicules (composition, taille, charge) et de leur environnement (pH, osmolarité,... (Figure 13)).

Par exemple, des liposomes cationiques (DOTAP) exposés à une surface de silice (chargée négativement) s'adsorbent puis se rompent individuellement jusqu'à ce que le support soit entièrement recouvert d'une bicouche. A l'inverse, des liposomes chargés négativement (DOPS) ne s'adsorberont pas, ou peu. En revanche, pour des liposomes ayant une charge moyenne neutre, un taux de couverture critique est nécessaire avant d'amorcer la transformation des liposomes adsorbés en bicouche

continue. D'autres investigations montrent que les vésicules s'adsorbent irréversiblement sur du SiO₂, Si₃N₄, TiO₂, Pt oxydé et Au oxydé, mais que le passage des vésicules à la bicouche ne se fait que pour les deux premières surfaces après avoir atteint un taux de couverture critique alors que dans les autres cas, les vésicules restaient intactes mais déformées (Keller and Kasemo 1998).

Ces mécanismes ont été étudiés par la microbalance à cristal de quartz et son mode dissipatif (QCM-D) qui permet de suivre en temps réel l'adsorption, la fusion et la rupture des vésicules sur différents types de surfaces (Keller and Kasemo 1998), la résonance de plasmon de surface (Williams, Evans et al. 1997), la réflectivité de neutrons (Koenig, Krueger et al. 1996), la microscopie à force atomique (Egawa and Furusawa 1999; Reviakine and Brisson 2000), la spectroscopie de corrélation de fluorescence et l'ellipsométrie (Bene, Billy et al. 2002).

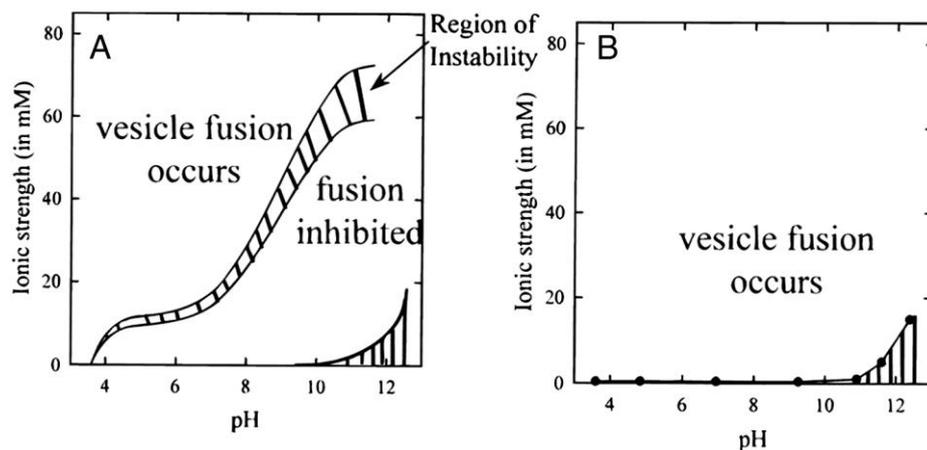


Figure 13 : Diagramme de phase de la fusion de vésicules d'EggPC contenant 1% molaire de lipides chargés A) négativement et B) positivement (Hardy, Nayak et al. 2013)

Instabilité des vésicules et formation incomplète de SLB dans la région hachurée

La fusion de vésicules est une technique flexible autorisant des dépôts aussi bien sur des surfaces planes que texturées (Groves, Ulman et al. 1998) et permet l'utilisation de membranes complexes (avec protéines notamment) sans passer par des séchages du matériau.

ii. Fabrication de petites vésicules uni-lamellaires de DOPC

Les phospholipides sont les lipides les mieux représentés. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile (dont l'aire varie de 40 à 60 Å² selon l'état de phase du lipide) et d'une queue apolaire hydrophobe, comportant deux chaînes d'acides gras de longueur différente, dont l'une porte une ou plusieurs doubles liaisons. La longueur

moyenne de ces chaînes est de l'ordre de 2-3 nm. Suivant le lipide, la tête peut être ionique (charge positive ou négative), zwitterionique (deux charges opposées) ou neutre. Ils sont également classés selon la structure de leur squelette carboné (nombre de carbones, présence d'insaturations...).

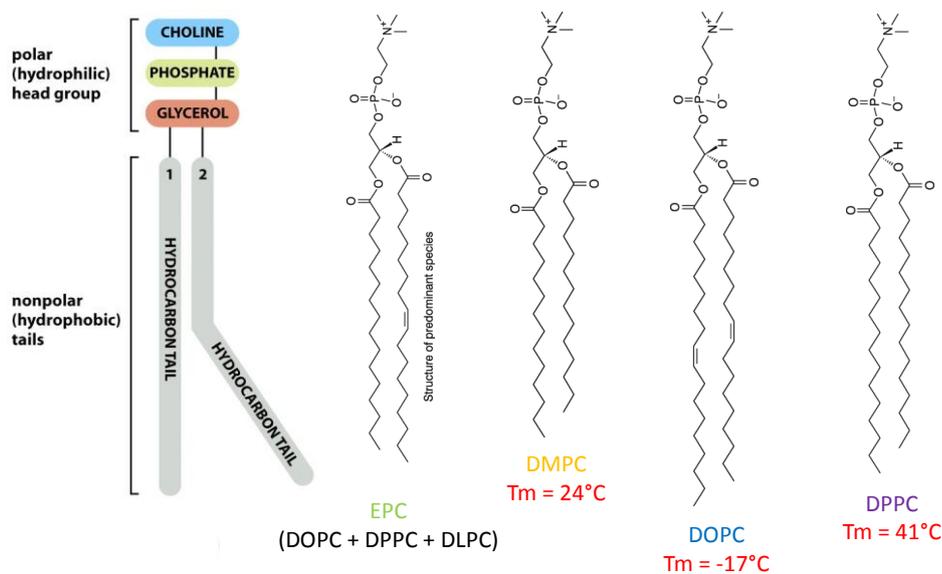


Figure 14 : Structure de la phosphatidylcholine et de quelques lipides de cette famille (T_m : température de transition de phase)

L'exemple le plus classique de têtes phospholipidiques, et sur lequel nous avons porté notre attention, est la phosphatidylcholine (PC) (Figure 14). Cette molécule est un ester bâti sur le glycérol (triacool). Le lipide comporte deux chaînes aliphatiques, issues des acides gras engagés dans l'estérification de deux groupements alcool du glycérol. Le troisième groupement alcool est estérifié par l'acide phosphorique (sous forme d'un groupement phosphate, ionisé, donc chargé, au pH cellulaire). L'ensemble forme un groupement phosphatidyl. Ce dernier est ici lié à la choline, groupement chargé positivement. C'est donc un phospholipide zwitterionique. Comme le groupement phosphate est chargé négativement au pH cellulaire, l'ensemble de la molécule est neutre. Nous avons choisi de travailler avec le phospholipide 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) pour la validation de notre fonctionnalisation de surface et pour l'étude de la membrane formée. C'est une molécule très fluide à température ambiante (pas besoin de contrôler la température pour l'étape de fusion des SUVs et de formation des SLBs) qui est très étudiée dans la littérature. Pour la fusion, des expériences avec le mélange EggPC (DPPC / DSPC / DOPC / DLPC) donnent des résultats comparables au DOPC mais sont plus dépendantes des conditions de température.

Le protocole que nous avons suivi est adapté de la littérature (Sui, Urumow et al. 1988) et présenté en annexe (voir l'annexe Protocoles : Préparation de SUVs). Les lipides suspendus dans un solvant aqueux se répartissent en phase lamellaire et agrégats. L'action mécanique d'ultrasons sur cette solution par sonication provoque spontanément le recourbement de ces phases lamellaires et l'organisation des lipides en vésicules (Figure 15).

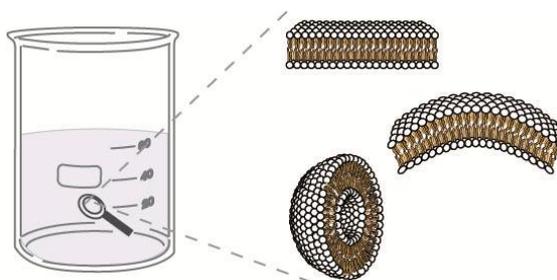


Figure 15 : Schéma illustrant l'effet de la sonication sur la formation spontanée de vésicules

La fabrication de ces SUVs de DOPC est utilisée pour la formation de SLB par fusion dans ces travaux de thèse.

2. Les bicouches planes

Les bicouches lipidiques, supportées ou libres, sont des systèmes biomimétiques à deux dimensions facilement accessibles à des techniques de caractérisation de surface du fait de leur localisation dans l'espace (Kim, Kim et al. 2001; Muresan and Lee 2001; Feng, Granick et al. 2004). L'épaisseur de la bicouche varie entre 4 et 7 nm suivant les lipides qui la constituent. Les bicouches libres sont surtout utilisées pour déterminer les mécanismes de régulation des canaux ioniques et autres protéines membranaires localisées dans la membrane. Grâce aux travaux de McConnell et al. (McConnell, Watts et al. 1986), les membranes déposées sur des supports solides ont été de plus en plus utilisées pour étudier les processus membranaires d'adhésion et d'interaction cellulaire (Brian and McConnell 1984; Sackmann 1996; Grakoui, Bromley et al. 1999) et pour le développement de nouvelles surfaces bio-fonctionnalisées. Ces membranes modèles supportées sur solide présente le sérieux avantage de rendre les membranes physiquement stabilisées et localisées, très pratique pour leur étude par des techniques de caractérisation de surface. Actuellement, elles sont de loin les systèmes modèles de membrane cellulaire les plus utilisés (Raedler, Strey et al. 1995; Schneider, Dufrêne et al. 2000; Xie and Granick 2002), avec notamment le développement de « nouveaux » supports tels que les coussins de polymère qui permettent d'éloigner la membrane du substrat et d'éviter ainsi les effets de

**Ch. I. Des membranes naturelles aux bicouches
biomimétiques supportées**

leur proximité (Tanaka and Sackmann 2005). Une vue globale des différents modèles de membrane est présentée dans le Tableau 1.

*Tableau 1 : Vue d'ensemble des différents modèles de membrane (x : peu adapté, ✓ très utilisé)
(Jackman, Knoll et al. 2012)*

Modèles	Caractérisation structurale locale	Transport interne / externe	Etude des protéines membranaires	Stabilité à l'air ou dans le
<u>Vésicules lipidiques</u> diffusant librement en solution	x (SUV) ✓ (GUV)	x (SUV) ✓ (GUV)	x (SUV) ✓ (GUV)	✓ (SUV) x (GUV)
<u>Couche de vésicules intactes</u> physisorbées ou ancrées sur support	✓	x	✓	x
<u>Films noirs</u> : bicouche lipidique suspendue	x	✓	✓	x
<u>Bicouches lipidiques supportées</u> à 2D physisorbées sur un support solide	✓	x	x	✓
<u>Bicouches lipidiques ancrées</u> immobilisées sur support hydrophile	✓	✓	✓	✓

a. Films noirs

Parmi les premiers modèles de membrane plane, les films noirs (BLMs « Black lipid membranes » en anglais) ont été utilisés avec succès pour l'investigation des propriétés électriques des bicouches phospholipidiques (Mueller, Rudin et al. 1962). Les BLMs sont des bicouches suspendues librement entre deux compartiments semi-infinis de solution tampon avec une extension latérale de $\sim 10^{-2}$ mm². Ces modèles sont bien adaptés à la caractérisation électrique du fait de l'accessibilité des deux compartiments pour placer des électrodes. Les films noirs ont été très utilisés pour l'étude de nombreux processus biophysiques tels que la formation de canaux ioniques par des peptides (Bamberg, Alpes et al. 1979), protéines (Gómez-Lagunas, Peña et al.

1989; Van Gelder, Dumas et al. 2000) et antibiotiques (Bezrukov and Vodyanoy 1993). Cependant, leur faible extension latérale et leur fragilité les rend inadaptés aux études structurales de haute résolution. Autres désavantages, les BLMs manquent de stabilité, des expériences de longues durées ne peuvent donc être réalisées sur ces modèles.

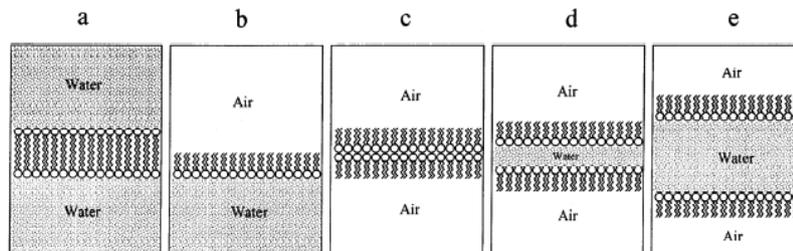


Figure 16 : Schéma des différents systèmes membranaires modèles de bicouches planes a) film noir (BLM : black lipid membrane), b) monocouche, c) film noir de Newton (NBF : Newton black film), d) film noir commun, e) film de savon (Lalchev and Mackie 1999)

b. Bicouches supportées et localisées

Les membranes supportées ont été développées afin de pallier à la fragilité des films noirs et de mimer la structure et la fonctionnalité des membranes biologiques en conservant leur fluidité latérale. Le développement de ces surfaces bio-fonctionnalisées peut être motivé par le domaine des biocapteurs, puisqu'il permet d'immobiliser une membrane dont une protéine incorporée peut être la cible d'une drogue. Ces surfaces peuvent être classées selon trois catégories :

- Les surfaces hydrophobes (ex : SAMs (« self assembled monolayers » en anglais)) avec pour terminaison un groupement méthyle) permettent l'adsorption d'une monocouche. Elles présentent un intérêt limité puisqu'il n'est pas possible d'y incorporer des protéines transmembranaires (Plant 1999), par contre on peut y stabiliser une bicouche flottante par attraction de Van Der Waals ((Daillant, Bellet-Amalric et al. 2005));
- Les surfaces hydrophiles (ex : verre) permettent l'adsorption d'une bicouche lipidique où des protéines transmembranaires peuvent être incorporées, mais dont l'extension du domaine extra-membranaire doit être inférieure à la couche d'eau située entre le substrat et la membrane, d'environ 10 Å (Groves, Ulman et al. 1997; Groves, Ulman et al. 1998).;
- Les surfaces hybrides présentant des ancres de type PEG-lipide permettent d'harponner une membrane lipidique et offrent le potentiel d'insérer une grande variété de protéines transmembranaires (Lang, Duschl et al. 1994;

Raguse, Braach-Maksvytis et al. 1998; Krueger, Meuse et al. 2001). Ces types de surface seront discutés un peu plus loin dans la partie consacrée aux bicouches lipidiques ancrées.

i. La balance à film mince et cuve de Langmuir-Blodgett

Les films de Langmuir-Blodgett sont constitués d'une ou plusieurs monocouches empilées les unes sur les autres à la surface d'un substrat solide par transfert depuis la surface d'un liquide (Figure 17).

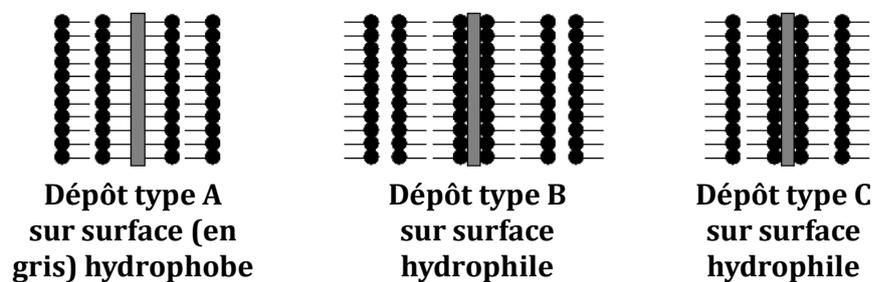


Figure 17 : Schéma des dépôts de films de Langmuir-Blodgett suivant la nature du substrat et des molécules tensio-actives

Bien que simple en apparence, le dépôt de monocouche et/ou de multicouches par cette technique nécessite de nombreux critères. Les facteurs en question relèvent des interactions lipide-substrat, englobant les caractéristiques de la monocouche (sa composition, le nombre de phases, et tous les autres aspects définissant son équilibre), du substrat (nature chimique, rugosité) et de la sous-phase aqueuse (température, présence de sels). Le transfert de la première monocouche reste une opération réussie dans presque tous les cas alors que le transfert de la seconde relève parfois du défi. Par exemple, Osborn et al. (Osborn and Yager 1995) ont étudié les transferts de phospholipides sur du silicium, et plus particulièrement le transfert de deux monocouches de type B (Figure 17). Ils ont montré que le dépôt d'une seconde monocouche n'était possible que dans une certaine gamme de pression. De plus, pendant le transfert, la charge de surface du substrat peut conduire à un phénomène de condensation de la monocouche dans un autre état que celui où elle était à la surface de la cuve (Mikrut, Dutta et al. 1993; Sikes, Woodward et al. 1996). Cette technique s'avère parfaitement adaptée pour élaborer des films constitués de plusieurs couches bien organisées, de nature différente, en particulier avec les acides gras, elle présente cependant des inconvénients.

D'autres techniques sont alors exploitables suivant les systèmes que l'on souhaite obtenir, notamment la technique de Langmuir-Schaeffer (dépôt avec le substrat à

l'horizontale) ou bien les films auto-assemblés, ces derniers donnant des films plus résistants avec une meilleure stabilité thermique. Cependant, ils présentent une organisation moléculaire plus difficilement modulable que les films obtenus par la technique de Langmuir-Blodgett.

Les approches développées par Irving Langmuir et les transferts sur solide apportés par Blodgett ont ouvert la voie aux premières préparations supportées, monocouches par monocouche sur verre, mais elles ne convenaient pas au transfert des membranes en conservant leur intégrité.

ii. Membranes supportées sur surface solide

Les membranes supportées sur substrat solide (SSMs) ont été développées dans un effort de formation de bicouches robustes et résistantes (Brian and McConnell 1984). Cette approche consiste en la physisorption d'une bicouche lipidique sur un support solide tel un substrat de silicium ou une lame de microscope. La géométrie planaire des SSMs permet l'utilisation des caractérisations de surface comme les réflectivités X et neutron, la microscopie à force atomique (AFM), l'ellipsométrie, pour leur étude structurale. La formation de SSMs sur support conducteurs (film d'or par exemple) rend possible l'application de techniques d'analyse électrochimique telle que la spectroscopie d'impédance (EIS) pour l'étude des propriétés électrochimiques de la membrane, ou aussi de la technique de résonance de plasmon de surface (SPR) pour l'étude des interactions protéines-membrane.

Cette approche de membrane supportée est très utilisée (McConnell, Watts et al. 1986; Erdelen, Haeussling et al. 1994; Sackmann 1996; Naumann, Prucker et al. 2002; Tanaka and Sackmann 2005) et a trouvé des applications pratiques (Daniel, Albertorio et al. 2006; Fang, Hong et al. 2006), elle présente cependant quelques limitations. Le réservoir d'eau qui sépare la membrane du substrat, généralement d'épaisseur $< 10 \text{ \AA}$, n'apporte qu'une faible fluidité latérale pour les lipides de la membrane (Brian and McConnell 1984; Tamm and McConnell 1985). De même, il ne permet pas d'intégrer des protéines fonctionnelles dans la membrane (Sackmann 1996) ou d'apporter des membranes naturelles ayant des récepteurs trop volumineux. La proximité du substrat peut mener à la dénaturation des domaines de protéines extra-membranaires (Castellana and Cremer 2006). La couche lipidique physisorbée sur le substrat peut aussi dans certaines conditions se détacher du support, comme lors de l'application de champs électriques nécessaire pour l'utilisation des techniques électrochimiques par exemple (Burgess, Li et al. 2004).

c. Membranes lipidiques ancrées

Les limitations du modèle de membrane supportée sur substrat solide pour mimer les membranes biologiques, en terme de diffusion latérale des lipides et d'incorporation de protéines transmembranaires, ont été levées grâce au développement de surfaces biofonctionnalisées permettant de former des membranes modèles (partiellement) ancrées ((s)tBLMs : (sparsely) tethered bilayer lipid membranes). Celles-ci détiennent des propriétés de base des membranes biologiques : la fluidité bidimensionnelle en phase cristal liquide et l'exposition des deux feuillets aux réservoirs aqueux, mais elles ont aussi surtout l'avantage d'être stable sur le long terme (quelques jours, semaines ou mois) et robustes (Lang, Duschl et al. 1994; Wagner and Tamm 2000; Atanasov, Knorr et al. 2005; Brzozowska, Oberts et al. 2009; Kwak, Valincius et al. 2010). Les tBLMs diffèrent des SSMS par leur construction, celles-ci étant connectées chimiquement au support par l'utilisation de molécules ancre-harpons, entités essentielles de ce modèle. Des exemples de ces unités d'ancrage communément utilisées sont présentés Figure 18.

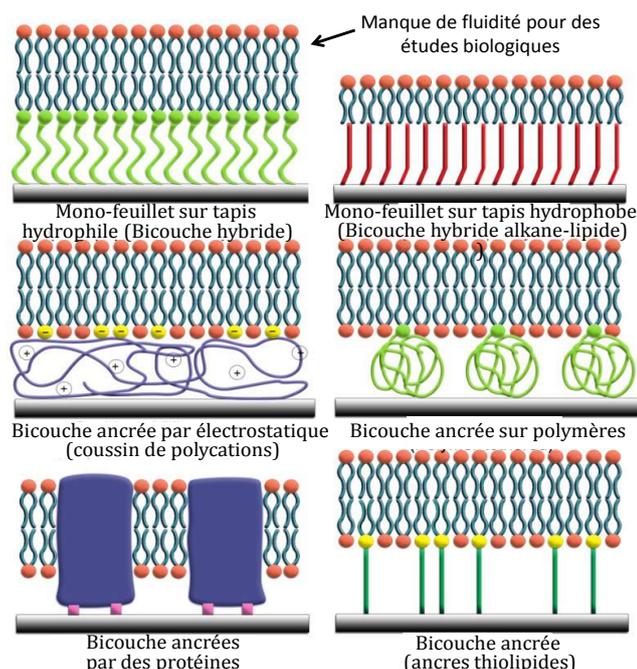


Figure 18 : Schéma des stratégies d'ancrage des bicouches lipidiques sur support solide

Suivant l'application, chaque type de molécule ancre-harpon peut avoir ses avantages et désavantages. La première génération de ces molécules emploie une ancre alkanethiol qui est liée de façon covalente à des films de métal minces, tels que l'or (Plant 1993) et le mercure (Guidelli, Becucci et al. 2002). Les monocouches d'alkanethiols se forment à partir de thiols, dispersés dans de l'éthanol, dont les

atomes de soufre ont une forte affinité avec ces métaux (Demoz and Harrison 1993; Love, Estroff et al. 2005). La SAM qui en résulte détient des propriétés hydrophobes de surface, avec ses chaînes alkanes qui miment les chaînes de lipides. L'adsorption de vésicules sur ce type de SAMs favorise la formation de bicouches hybrides (feuillet inférieur d'alkanethiols et supérieur de phospholipides) ayant des propriétés utiles mais ne laissant pas de volume aqueux entre le feuillet inférieur et le support.

Une alternative à cette approche est de choisir des macromolécules pour espacer la membrane du support, telles que des chaînes de polymère pour former un coussin hydraté qui conserve l'aspect hydrophile de l'interface solide/liquide (Wegner 1993; Knoll, Bender et al. 2010; Kibrom, Roskamp et al. 2011; McCabe and Forstner 2013). Les vésicules peuvent fusionner sur le coussin de macromolécules pour former une bicouche éloignée du substrat d'au moins quelques nanomètres. Cette distance est suffisante pour le transport ionique à travers la membrane et l'intégration de protéines transmembranaires. Cependant, cette bicouche lipidique n'est pas ancrée en tant que tel au support. D'autre part, elle ne possède pas des propriétés isolantes suffisantes pour caractériser de façon quantitative les activités des canaux ioniques. Dans la même catégorie, nous pouvons citer les fonctionnalisations, par exemple, par des chaînes aliphatiques qui immobilisent une monocouche de lipides têtes vers le solvant, rendant la surface hydrophile et permettant la formation d'une membrane flottante distancée d'environ 5nm de la monocouche (Daillant, Bellet-Amalric et al. 2005). La bicouche est éloignée du support et non ancrée (Figure 20).

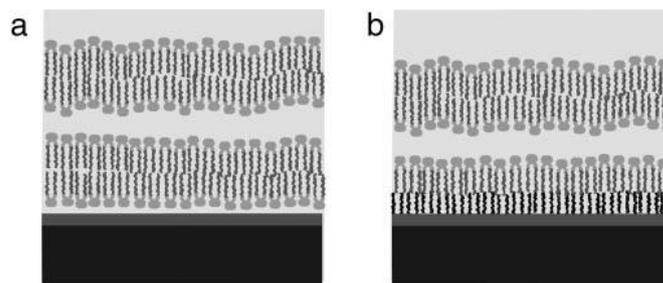


Figure 19 : Bicouche lipidique flottant quelques nanomètres au-dessus a) d'une bicouche adsorbée b) d'une monocouche immobilisée têtes vers le solvant (Hughes, Goldar et al. 2002; Daillant, Bellet-Amalric et al. 2005)

De ce fait, de nouvelles entités d'ancrage ont émergé, combinant l'utilité des groupements thiols et des macromolécules. Appelés thiolipides, l'élément central de ces unités est hydrophile avec pour extrémités côté ancre, un groupement fonctionnel pour l'immobilisation covalente, et côté harpon une liaison avec la tête des phospholipides. Ces SAMs s'auto-assemblent sur des métaux nobles dans des solvants

organiques et confèrent une nature hydrophobe au substrat qui favorise la fusion de vésicules pour former une bicouche lipidique ancrée. Cette fois, la partie hydrophile du thiolipide éloigne le feuillet inférieur du substrat ce qui permet de construire des membranes associées à des protéines. Dans leur ensemble, avec leur propriété électrique isolante et leur stabilité sur le long terme, les membranes ancrées par thiolipides sont d'excellents systèmes pour l'étude des canaux ioniques, de la formation des pores, des protéines transmembranaires. Leur formation sur métal offre des applications électrochimiques et d'exaltation optique de surface. Leur développement sur des surfaces SiO₂ présente également un intérêt pour la microélectronique (une approche similaire par silanisation a été développée dans ce domaine (Atanasov, Knorr et al. 2005)). De manière similaire, des esters d'acide phosphonique ont été incorporés dans les molécules ancre-harpon pour immobiliser des membranes sur oxyde d'aluminium (Roskamp, Vockenroth et al. 2008).

Dans un contexte plus large, l'ingénierie chimique des tBLMs continue d'avancer avec l'intégration de stratégie de synthèse (Figure 23) et l'observation de la nature, donnant lieu à des opportunités de plus en plus nombreuses pour passer de la science fondamentale aux applications biotechnologiques.

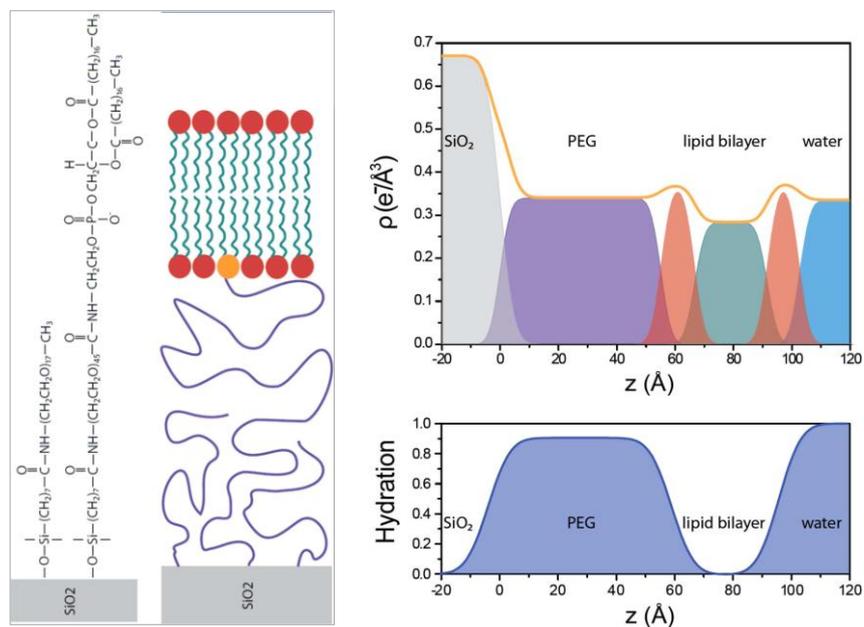


Figure 20 : Exemple d'architecture PEG-lipide réalisée pour harponnée des membranes et profils de densité vus en rayons X et Neutrons (Hertrich, Stetter et al. 2014)

Ainsi le modèle des tBLMs éloigne la membrane du substrat ce qui a pour effet de réduire son influence sur la bicouche et rend possible l'intégration de protéines fonctionnelles dans la membrane (Sévin-Landais, Rigler et al. 2000; Merzlyakov, Li et

al. 2006; Valincius, McGillivray et al. 2006; Andersson, Okeyo et al. 2008; Jadhav, Sui et al. 2008). Il faut cependant réguler la densité de ces molécules d'ancrage qui peuvent perturber le feuillet inférieur de la bicouche et donc sa fluidité (Purrucker, Fortig et al. 2004). L'ancrage chimique de membrane apporte à la bicouche une stabilité sur le long terme et trouve des applications biocapteurs (Bayley and Cremer 2001; Atanasov, Knorr et al. 2005; Sumino, Dewa et al. 2011)

Dans les parties suivantes, nous présentons plus en détails quelques travaux de références pour ce travail de thèse utilisant des molécules ancre-harpons synthétisées (ex : molécule du type PEO-lipide (McGillivray, Valincius et al. 2007)) ou commerciales (ex : tensioactifs (Lahiri, Kalal et al. 2000))

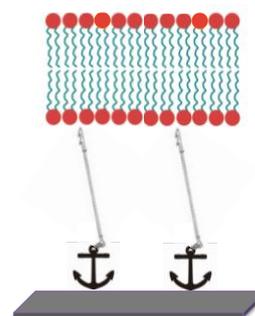
i. Utilisation des molécules de type PEO-lipide

Une des approches possible pour ancrer les membranes à une surface est l'utilisation de molécules synthétiques du type ancre-lipides en général formées de quatre blocs :

L'ancre (pour greffer la molécule sur la surface) :

- La liaison chimique : la liaison covalente présente sans aucun doute un avantage significatif qui permet d'éviter le détachement de la membrane du substrat. Très souvent, les groupements silanes sur silicone et sulfures sur or sont utilisés pour former la liaison. Les liaisons or-sulfure obtenues rapidement à température ambiante par chimisorption sont fortes (Nuzzo, Zegarski et al. 1987). Elles conduisent à la formation de SAMs reproductible et stable dans le temps ;

- Le polymère hydrophile, tel que l'oligo(éthylèneoxide) (McGillivray, Valincius et al. 2007; Roder, Waichman et al. 2011), permet de séparer la membrane de son support et de maintenir le milieu sous la membrane et les têtes du feuillet inférieur dans un état d'hydratation proche de celui des membranes biologiques ;



Le harpon (qui s'insère dans la membrane pour la maintenir près de la surface):

- La tête du lipide : le séparateur hydrophile (polymère) est attaché aux queues hydrophobes du lipide en utilisant par exemple un glycérol ;
- Les queues du lipide : la partie hydrophobe du lipide permet le contrôle d'auto assemblage et de caractérisation électrique de la membrane. Une grande

variété de ces chaînes hydrophobes est utilisée, les chaînes simples (Vanderah, Gates et al. 2003), les doubles chaînes (McGillivray, Valincius et al. 2007), les chaînes ramifiées (Naumann, Prucker et al. 2002; Naumann, Schiller et al. 2003; Schiller, Naumann et al. 2003).

De telles tBLMs ont été développées par McGillivray et al. en utilisant des lipides synthétiques, élaborés par les chimistes de leur collaboration (par exemple, 20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaohexatricontane-1-thiol, nommé « WC14 »), greffés sur des oligomères hydrophiles de type PEO (monomères -CH₂-CH₂-O-) comme molécules ancre-harpon pour les membranes. Des études ont été menées sur ces molécules, en faisant varier la longueur de l'ancre hydrophile et aussi la composition de la chaîne hydrophobe (saturée ou insaturée) qui compose le harpon. Leur potentiel pour permettre la formation de membranes partiellement ancrées (stBLMs) a été évalué avec des longueurs différentes (Figure 21), telles que WC14 (McGillivray, Valincius et al. 2007) (molécule et chaîne saturée courtes, 6 monomères EO) et FC16 (Heinrich, Ng et al. 2009) (molécule et chaîne saturée plus longue, 9 monomères EO), le volume interstitiel créé entre la membrane et la surface par les molécules d'ancrages est ainsi variable. En comparaison à des molécules d'ancrage insaturées telles que HC18 (6 monomères EO) (Budvytyte, Valincius et al. 2013), il est démontré que celles-ci facilitent la formation de stBLMs composées de phospholipides anioniques tels que ceux du feuillet interne de la membrane plasmique. La Figure 21 montre la structure chimique de ces molécules, avec le polymère hydrophile PEO₆ (cas du WC14) attaché à deux chaînes alkyles C₁₄ par un lien éther.

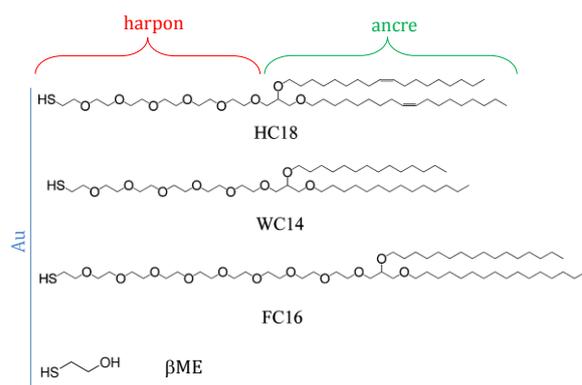


Figure 21 : Structure des molécules d'ancrage lipidique (Budvytyte, Valincius et al. 2013)

[liaison chimique de surface]-[ancre polymère hydrophile]-
[harpon de type lipide]

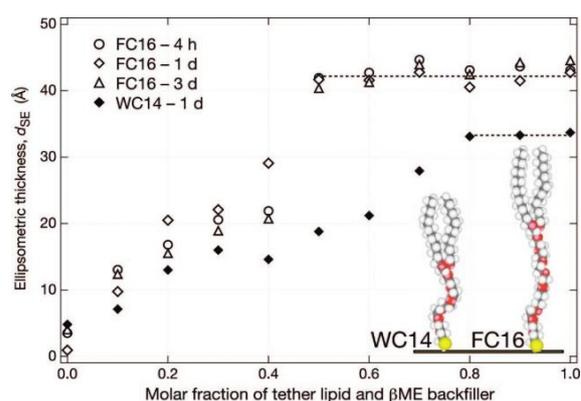


Figure 22 : Suivi par ellipsométrie de l'évolution de l'épaisseur de la SAM en fonction du temps d'incubation (d'après McGillivray, Valincius et al. 2007)

Ces travaux montrent qu'il est impératif de lier de façon covalente la monocouche auto-assemblée sur la surface, pour éviter son détachement lors de l'utilisation de techniques électrochimiques. Les SAMs, formées à partir de WC14, FC16 ou HC18, se lient à la surface en quelques minutes, une réorganisation mineure s'effectue dans les 4h qui suivent (Figure 22), puis elles restent stables sur plusieurs jours (McGillivray, Valincius et al. 2007; Heinrich, Ng et al. 2009) ce qui permet de les conserver avant de déposer la membrane par la suite (McGillivray, Valincius et al. 2007).

Dans leurs travaux, les auteurs montrent, par réflectivité Neutron, que les tBLMs fondées sur une SAM composée à 100% de WC14, contiennent moins de 5% de volume interstitiel sous la membrane. Un tel résultat rend les tBLMs inappropriées pour l'incorporation de protéines membranaires. Les auteurs ont par contre montré qu'en diluant la concentration de la molécule d'ancrage sur la surface d'or avec une molécule à chaîne courte, dans ce cas le β -mercaptoethanol (β ME) (McGillivray, Valincius et al. 2007), l'augmentation du volume interstitiel était favorisée jusqu'à ~60% sans compromettre la nature isolante des membranes. Celles-ci sont qualifiées de partiellement ancrées (stBLMs) pour les distinguer des tBLMs (Figure 23). Les molécules harpons ancre-lipides ne sont donc pas utilisées seules sur une surface. La littérature montre aussi l'utilisation additionnelle de molécules hydrophiles telles que les PEO_n (Hertrich, Stetter et al. 2014) pour diminuer la fraction des molécules d'ancrage sur la surface. Ces molécules hydrophiles ont aussi pour objectif d'empêcher l'adsorption de membrane pour que celle-ci soit flottante et laisser un volume aqueux entre la surface et la membrane. La littérature (Hertrich, Stetter et al. 2014) montre que les membranes ne s'adsorbent pas sur les surfaces présentant du PEO seul (PEO_n avec n=17, 45) mais ceci n'est pas toujours explicitement démontré dans les publications traitant des systèmes ancre-harpon.

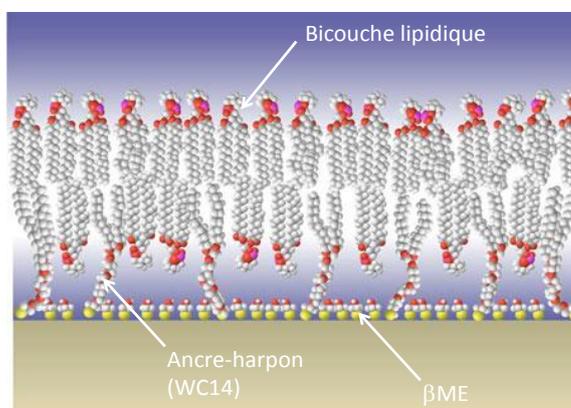


Figure 23 : Illustration d'une stBLM. La bicouche est chimiquement liée au substrat par une molécule ancre-lipide synthétique diluée par une chaîne courte β ME

Les avantages des modèles de membrane partiellement ancrées sont présentés dans la littérature. La caractérisation des stBLMs obtenues par McGillivray et al. a montré que les bicouches étaient homogènes et fluides latéralement. Le coefficient de diffusion des lipides est comparable à celui mesuré pour des bicouches libres. Par exemple, pour des membranes de DOPC, un coefficient de $7,1 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Shenoy, Moldovan et al. 2010) a été mesuré, comparé à des coefficients de $7,8 \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Przybylo, Sýkora et al. 2006) et $6,3 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Kahya, Scherfeld et al. 2004) obtenus sur des GUVs. Les stBLMs peuvent présenter une faible densité de défauts, c'est-à-dire une faible fraction volumique de solvant dans le cœur hydrophobe de la bicouche (McGillivray, Valincius et al. 2007). Les bicouches sont robustes et stable dans le temps, ce qui permet l'utilisation de techniques telle que la réflectivité neutron (jusqu'à 4 jours sur une même bicouche). L'incorporation d'une toxine bactérienne a montré que les propriétés des canaux formés étaient similaires à celles des canaux formés dans les membranes libres, ce qui confirme que la bicouche lipidique est bien séparée du substrat (Heinrich, Valincius et al. 2008). Néanmoins, le modèle de stBLMs présente aussi des limites. La dilution de la molécule d'ancrage à des fractions <30% donne des structures bien ordonnées mais faiblement résistantes, c'est-à-dire que des courants de fuite traversent la membrane par des pores ou du solvant présent au cœur de la bicouche. Il y a donc une limite basse sur la quantité de molécules d'ancrage nécessaire pour qu'une bicouche complète se forme. Les travaux visent aujourd'hui à diminuer de plus en plus la fraction d'ancres sur les surfaces de façon à former une membrane localement proche d'une surface mais aussi fluide que les membranes naturelles libres. Selon les molécules d'ancrage utilisées et les lipides pour former la membrane, la fraction limite pour former une membrane stable est atteinte autour de 10-15% d'ancres.

De façon similaire, Plant, Raguse et al. ont utilisé des ancres contenant des parties de molécules thiaoligoéthylèneoxide ($\text{HS}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$) (Krueger, Meuse et al. 2001). Ces approches présentent deux gros désavantages, une synthèse lourde des oligo(éthylèneoxide)-thiols et la mauvaise définition structurale des SAMs formées à partir de ces thiols. Plus récemment, Vogel et al. ont décrit l'utilisation des lipides biotinylés comme ancras pour les membranes. Ceux-ci sont liés par une streptavidine immobilisée sur une SAM présentant des groupements biotines. Cette stratégie contourne les problèmes de structure et de stabilité de la SAMs mais implique la synthèse des thiols biotinylés (Bieri, Ernst et al. 1999).

Dans la suite nous évoquons l'utilisation d'autres molécules harpons de type copolymères amphiphiles pour l'ancrage des membranes.

ii. Molécules harpons de type copolymères amphiphiles

Les Brij sont des molécules déjà testées pour l'harponnage des membranes. Lahiri et al. ont montré l'efficacité du Brij76 ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_{n=10}OH$ ou $C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_{n=10}NH_2$ selon la chimie de surface utilisée) dont la chaîne alkyl qui présente 18 carbones s'insère au cœur d'une bicouche lipidique (Lahiri, Kalal et al. 2000).

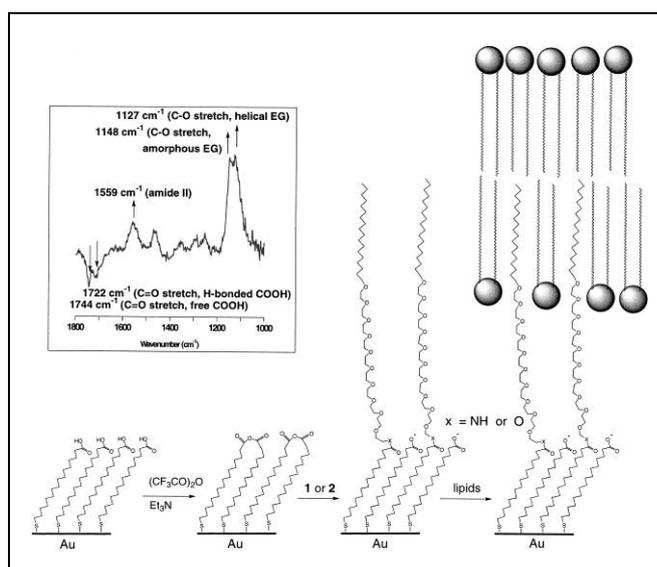


Figure 24 : Représentation schématique montrant l'attachement des membranes au molécules Brij sur des surfaces d'or (Lahiri, Kalal et al. 2000)

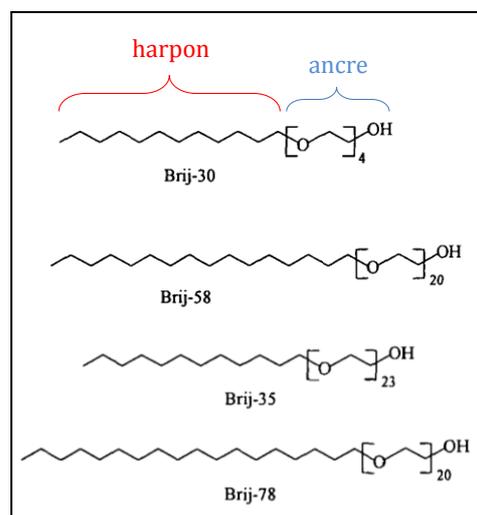


Figure 25 : Exemples de structure de quelques Brij commerciaux

Les Brij sont immobilisés par substitution nucléophile sur une surface d'or fonctionnalisée par une SAM ("Self Assembled Monolayers") d'alkanéthiolate puis activée par des anhydrides formés par l'enchevêtrement des groupements carboxyles deux à deux en bout de SAM. Lahiri et al. ont montré l'efficacité de ces fonctionnalisations par éllipsométrie, angle de contact, technique infrarouge et SPR (Lahiri, Kalal et al. 2000). C'est une méthode qui offre l'avantage de nécessiter peu de synthèse organique et de former une SAM stable réactive à toutes les ancres se terminant par un groupement nucléophile dont la densité peut être contrôlée avec le temps d'immersion dans les solutions de Brij ou en mélangeant ces tensio-actifs à des auxiliaires nucléophiles (ex : éthanolamine). Elle nécessite cependant la formation d'un anhydride d'acide intermédiaire (Yan, Marzolin et al. 1997) et résistera certainement peu à l'application répétée de champs électriques pour une caractérisation électrochimique par exemple. Aussi, aucune caractérisation structurale n'accompagne ces travaux, et l'or étant passivé et rendu hydrophobe ceci interdit

d'utiliser les techniques électrochimiques mises en œuvre dans cette thèse. De plus, cette fonctionnalisation va être sensible au pH et de charge variable.

Les molécules tensioactives pouvant jouer le rôle d'ancre-harpons présentent un grand intérêt en ce qu'elles sont commerciales et peu chères, elles permettent d'éviter la synthèse de molécules de type ancre-lipide comme citées précédemment. La fonctionnalisation de surface pour l'ancrage de membranes se basant sur l'utilisation de molécules commerciales comme les Brij fait l'objet du chapitre 2. Les chimies de surface permettant d'immobiliser ces Brij sur la surface sont souvent complexes, réparties sur plusieurs étapes, peu stable dans le temps ou à l'application de champs électriques. Le chapitre 2 présentera la chimie de surface que nous avons proposée pour l'immobilisation des Brij, différente de celle présentée dans cette partie ou du couplage classique EDC/NHS utilisé pour l'immobilisation des ancres-lipides évoquées dans la partie précédente.

L'une des différences essentielles entre notre stratégie et celle présentée ci-dessus, est de partir de n'importe quelle surface conductrice et d'apporter une fonctionnalisation hydrophile par des molécules amphiphile et commerciales peu chères. Ceci devrait nous permettre de réaliser une grande variété de substrats, dont des systèmes transparents et adaptés aux techniques de réflectivité X et Neutron.

Bibliographie Ch.I

- Andersson, M., G. Okeyo, et al. (2008). "Voltage-induced gating of the mechanosensitive MscL ion channel reconstituted in a tethered lipid bilayer membrane." Biosensors and Bioelectronics **23**(6): 919-923.
- Atanasov, V., N. Knorr, et al. (2005). "Membrane on a Chip: A Functional Tethered Lipid Bilayer Membrane on Silicon Oxide Surfaces." Biophysical Journal **89**(3): 1780-1788.
- Bamberg, E., H. Alpes, et al. (1979). "Formation of ionic channels in black lipid membranes by succinic derivatives of Gramicidin A." The Journal of Membrane Biology **50**(3-4): 257-270.
- Baumgart, T., S. T. Hess, et al. (2003). "Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension." Nature **425**(6960): 821-824.
- Bayley, H. and P. S. Cremer (2001). "Stochastic sensors inspired by biology." Nature **413**(6852): 226-230.
- Bene, M., D. Billy, et al. (2002). Muscovite (Mica) Allows the Characterisation of Supported Bilayers by Ellipsometry and Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy. Biological Chemistry. **383**: 337.
- Bezrukov, S. M. and I. Vodyanoy (1993). "Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states." Biophysical Journal **64**(1): 16-25.
- Bieri, C., O. P. Ernst, et al. (1999). "Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation." Nat Biotech **17**(11): 1105-1108.
- Brian, A. A. and H. M. McConnell (1984). "Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences **81**(19): 6159-6163.
- Brzozowska, M., B. P. Oberts, et al. (2009). "Design and Characterization of Novel Tether Layer for Coupling of a Bilayer Lipid Membrane to the Surface of Gold." Langmuir **25**(16): 9337-9345.
- Budvytyte, R., G. Valincius, et al. (2013). "Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules." Langmuir **29**(27): 8645-8656.
- Burgess, I., M. Li, et al. (2004). "Electric Field-Driven Transformations of a Supported Model Biological Membrane—An Electrochemical and Neutron Reflectivity Study." Biophysical Journal **86**(3): 1763-1776.
- Castellana, E. T. and P. S. Cremer (2006). "Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design." Surface Science Reports **61**(10): 429-444.
- Daillant, J., E. Bellet-Amalric, et al. (2005). "Structure and fluctuations of a single floating lipid bilayer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11639-11644.

- Daniel, S., F. Albertorio, et al. (2006). "Making Lipid Membranes Rough, Tough, and Ready to Hit the Road." MRS Bulletin **31**(07): 536-540.
- Decher, G. and J.-D. Hong (1991). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces." Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia **46**(1): 321-327.
- Decher, G., J. D. Hong, et al. (1992). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces." Thin Solid Films **210-211, Part 2**: 831-835.
- Demoz, A. and D. J. Harrison (1993). "Characterization and extremely low defect density hexadecanethiol monolayers on mercury surfaces." Langmuir **9**(4): 1046-1050.
- Devaux, P. F. and R. Morris (2004). "Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes." Traffic **5**(4): 241-246.
- Eddidin, M. (2003). "Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 414-418.
- Egawa, H. and K. Furusawa (1999). "Liposome Adhesion on Mica Surface Studied by Atomic Force Microscopy." Langmuir **15**(5): 1660-1666.
- Erdelen, C., L. Haeussling, et al. (1994). "Self-Assembled Disulfide-Functionalized Amphiphilic Copolymers on Gold." Langmuir **10**(4): 1246-1250.
- Fang, Y., Y. Hong, et al. (2006). "Applications of Biomembranes in Drug Discovery." MRS Bulletin **31**(07): 541-545.
- Feng, Z. V., S. Granick, et al. (2004). "Modification of a Supported Lipid Bilayer by Polyelectrolyte Adsorption." Langmuir **20**(20): 8796-8804.
- Gallova, J., D. Uhríkova, et al. (2004). "Effect of cholesterol on the bilayer thickness in unilamellar extruded DLPC and DOPC liposomes: SANS contrast variation study." Gen Physiol Biophys **23**(1): 113-128.
- Gómez-Lagunas, F., A. Peña, et al. (1989). "Incorporation of ionic channels from yeast plasma membranes into black lipid membranes." Biophysical Journal **56**(1): 115-119.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, et al. (1999). "The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation." Science **285**(5425): 221-227.
- Groves, J. T., N. Ulman, et al. (1997). "Micropatterning Fluid Lipid Bilayers on Solid Supports." Science **275**(5300): 651-653.
- Groves, J. T., N. Ulman, et al. (1998). "Substrate-membrane interactions: Mechanisms for imposing patterns on a fluid bilayer membrane." Langmuir **14**(12): 3347-3350.
- Guidelli, R., L. Becucci, et al. (2002). "Some bioelectrochemical applications of self-assembled films on mercury." Solid State Ionics **150**(1-2): 13-26.
- Gupte, S., E. S. Wu, et al. (1984). "Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components." Proceedings of the National Academy of Sciences **81**(9): 2606-2610.

- Hardy, G. J., R. Nayak, et al. (2013). "Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion." Current Opinion in Colloid & Interface Science **18**(5): 448-458.
- Heinrich, F., T. Ng, et al. (2009). "A New Lipid Anchor for Sparsely Tethered Bilayer Lipid Membranes†." Langmuir **25**(7): 4219-4229.
- Heinrich, F., G. Valincius, et al. (2008). Structure of Functional Staphylococcus aureus alpha-Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes. APS March Meeting Abstracts.
- Hertrich, S., F. Stetter, et al. (2014). "Highly Hydrated Deformable Polyethylene Glycol-Tethered Lipid Bilayers." Langmuir **30**(31): 9442-9447.
- Hughes, A. V., A. Goldar, et al. (2002). "A hybrid SAM phospholipid approach to fabricating a 'free'supported lipid bilayer." Physical Chemistry Chemical Physics **4**(11): 2371-2378.
- Israelachvili, J. (1992). "Interfacial Forces." Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films **10**(5): 2961-2971.
- Jackman, J., W. Knoll, et al. (2012). "Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes." Materials **5**(12): 2637.
- Jadhav, S. R., D. Sui, et al. (2008). "Fabrication of highly insulating tethered bilayer lipid membrane using yeast cell membrane fractions for measuring ion channel activity." Journal of Colloid and Interface Science **322**(2): 465-472.
- Kahya, N., D. Scherfeld, et al. (2004). "Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy." Journal of Structural Biology **147**(1): 77-89.
- Keller, C. A. and B. Kasemo (1998). "Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance." Biophysical Journal **75**(3): 1397-1402.
- Kibrom, A., R. F. Roskamp, et al. (2011). "Hydrogel-supported protein-tethered bilayer lipid membranes: a new approach toward polymer-supported lipid membranes." Soft Matter **7**(1): 237-246.
- Kim, J., G. Kim, et al. (2001). "Investigations of Water Structure at the Solid/Liquid Interface in the Presence of Supported Lipid Bilayers by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy." Langmuir **17**(23): 7255-7260.
- Klose, C., C. S. Ejsing, et al. (2010). "Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains." J Biol Chem **285**(39): 30224-30232.
- Knoll, W., K. Bender, et al. (2010). Polymer-Tethered Bimolecular Lipid Membranes. Polymer Membranes/Biomembranes. W. P. Meier and W. Knoll, Springer Berlin Heidelberg. **224**: 197-233.
- Koenig, B. W., S. Krueger, et al. (1996). "Neutron Reflectivity and Atomic Force Microscopy Studies of a Lipid Bilayer in Water Adsorbed to the Surface of a Silicon Single Crystal." Langmuir **12**(5): 1343-1350.
- Krueger, S., C. W. Meuse, et al. (2001). "Investigation of Hybrid Bilayer Membranes with Neutron Reflectometry: Probing the Interactions of Melittin." Langmuir **17**(2): 511-521.

- Kucerka, N., M. A. Kiselev, et al. (2004). "Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods." *Eur Biophys J* **33**(4): 328-334.
- Kucerka, N., J. F. Nagle, et al. (2008). "Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data." *Biophysical Journal* **95**(5): 2356-2367.
- Kwak, K. J., G. Valincius, et al. (2010). "Formation and Finite Element Analysis of Tethered Bilayer Lipid Structures." *Langmuir* **26**(23): 18199-18208.
- Lahiri, J., P. Kalal, et al. (2000). "Method for Fabricating Supported Bilayer Lipid Membranes on Gold." *Langmuir* **16**(20): 7805-7810.
- Lalchev, Z. I. and A. R. Mackie (1999). "Molecular lateral diffusion in model membrane systems." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **15**(2): 147-160.
- Lang, H., C. Duschl, et al. (1994). "A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces." *Langmuir* **10**(1): 197-210.
- Lipowsky, R. (1995). "The morphology of lipid membranes." *Curr Opin Struct Biol* **5**(4): 531-540.
- Lipowsky, R. and U. Seifert (1991). "Adhesion of Vesicles and Membranes." *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **202**: 17-25.
- Liu, Y. and J. F. Nagle (2004). "Diffuse scattering provides material parameters and electron density profiles of biomembranes." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **69**(4 Pt 1): 040901.
- Love, J. C., L. A. Estroff, et al. (2005). "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology." *Chemical Reviews* **105**(4): 1103-1170.
- Lyatskaya, Y., Y. Liu, et al. (2001). "Method for obtaining structure and interactions from oriented lipid bilayers." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **63**(1 Pt 1): 011907.
- McCabe, I. P. and M. B. Forstner (2013). "Polymer Supported Lipid Bilayers." *Open Journal of Biophysics* **Vol.03No.01**: 11.
- McConnell, H. M., T. H. Watts, et al. (1986). "Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **864**(1): 95-106.
- McConnell, H. M., T. H. Watts, et al. (1986). "Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system." *Biochim Biophys Acta* **864**(1): 95-106.
- McGillivray, D. J., G. Valincius, et al. (2007). "Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes." *Biointerphases* **2**(1): 21-33.
- McIntosh, T. J. (2000). "Short-range interactions between lipid bilayers measured by X-ray diffraction." *Current Opinion in Structural Biology* **10**(4): 481-485.
- Mennicke, U. and T. Salditt (2002). "Preparation of Solid-Supported Lipid Bilayers by Spin-Coating." *Langmuir* **18**(21): 8172-8177.
- Merzlyakov, M., E. Li, et al. (2006). "Directed Assembly of Surface-Supported Bilayers with Transmembrane Helices." *Langmuir* **22**(3): 1247-1253.

- Mikrut, J. M., P. Dutta, et al. (1993). "Atomic-force and fluorescence microscopy of Langmuir-Blodgett monolayers of α -dimyristoylphosphatidic acid." Physical Review B **48**(19): 14479-14487.
- Mueller, P., D. O. Rudin, et al. (1962). "Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System." Nature **194**(4832): 979-980.
- Muresan, A. S. and K. Y. C. Lee (2001). "Shape Evolution of Lipid Bilayer Patches Adsorbed on Mica: an Atomic Force Microscopy Study." The Journal of Physical Chemistry B **105**(4): 852-855.
- Nagle, J. F. and S. Tristram-Nagle (2000). "Lipid bilayer structure." Current Opinion in Structural Biology **10**(4): 474-480.
- Nagle, J. F. and S. Tristram-Nagle (2000). "Structure of lipid bilayers." Biochim Biophys Acta **1469**(3): 159-195.
- Naumann, C. A., O. Prucker, et al. (2002). "The Polymer-Supported Phospholipid Bilayer: Tethering as a New Approach to Substrate-Membrane Stabilization." Biomacromolecules **3**(1): 27-35.
- Naumann, R., S. M. Schiller, et al. (2003). "Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces." Langmuir **19**(13): 5435-5443.
- Nuzzo, R. G., B. R. Zegarski, et al. (1987). "Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces." Journal of the American Chemical Society **109**(3): 733-740.
- Osborn, T. D. and P. Yager (1995). "Modeling success and failure of Langmuir-Blodgett transfer of phospholipid bilayers to silicon dioxide." Biophysical Journal **68**(4): 1364-1373.
- Plant, A. L. (1993). "Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold." Langmuir **9**(11): 2764-2767.
- Plant, A. L. (1999). "Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics." Langmuir **15**(15): 5128-5135.
- Prior, I. A., C. Muncke, et al. (2003). "Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains." The Journal of Cell Biology **160**(2): 165-170.
- Przybylo, M., J. Sýkora, et al. (2006). "Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions." Langmuir **22**(22): 9096-9099.
- Purrucker, O., A. Fortig, et al. (2004). "Supported membranes with well-defined polymer tethers--incorporation of cell receptors." ChemPhysChem **5**(3): 327-335.
- Raedler, J., H. Strey, et al. (1995). "Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces." Langmuir **11**(11): 4539-4548.
- Raguse, B., V. Braach-Maksvytis, et al. (1998). "Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization." Langmuir **14**(3): 648-659.

- Rand, R. P. and V. A. Parsegian (1989). "Hydration forces between phospholipid bilayers." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes **988**(3): 351-376.
- Reviakine, I. and A. Brisson (2000). "Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy." Langmuir **16**(4): 1806-1815.
- Richter, R., A. Mukhopadhyay, et al. (2003). "Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study." Biophysical Journal **85**(5): 3035-3047.
- Richter, R. P. and A. R. Brisson (2005). "Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry." Biophysical Journal **88**(5): 3422-3433.
- Richter, R. P., N. Maury, et al. (2005). "On the Effect of the Solid Support on the Interleaflet Distribution of Lipids in Supported Lipid Bilayers." Langmuir **21**(1): 299-304.
- Roder, F., S. Waichman, et al. (2011). "Reconstitution of Membrane Proteins into Polymer-Supported Membranes for Probing Diffusion and Interactions by Single Molecule Techniques." Analytical Chemistry **83**(17): 6792-6799.
- Roskamp, R. F., I. K. Vockenroth, et al. (2008). "Functional Tethered Bilayer Lipid Membranes on Aluminum Oxide." ChemPhysChem **9**(13): 1920-1924.
- Rothman, J. and J. Lenard (1977). "Membrane asymmetry." Science **195**(4280): 743-753.
- Sackmann, E. (1996). "Supported Membranes: Scientific and Practical Applications." Science **271**(5245): 43-48.
- Schiller, S. M., R. Naumann, et al. (2003). "Archaea Analogue Thiolipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ultrasoother Gold Surfaces." Angewandte Chemie International Edition **42**(2): 208-211.
- Schneider, J., Y. F. Dufrêne, et al. (2000). "Atomic Force Microscope Image Contrast Mechanisms on Supported Lipid Bilayers." Biophysical Journal **79**(2): 1107-1118.
- Sévin-Landais, A., P. Rigler, et al. (2000). "Functional immobilisation of the nicotinic acetylcholine receptor in tethered lipid membranes." Biophysical Chemistry **85**(2-3): 141-152.
- Shenoy, S., R. Moldovan, et al. (2010). "In-plane homogeneity and lipid dynamics in tethered bilayer lipid membranes (tBLMs)." Soft Matter **6**(6): 1263-1274.
- Sikes, H. D., Woodward, et al. (1996). "Pattern Formation in a Substrate-Induced Phase Transition during Langmuir-Blodgett Transfer." The Journal of Physical Chemistry **100**(21): 9093-9097.
- Simons, K. and G. Van Meer (1988). "Lipid sorting in epithelial cells." Biochemistry **27**(17): 6197-6202.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(4023): 720-731.
- Sprong, H., P. van der Sluijs, et al. (2001). "How proteins move lipids and lipids move proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 504-513.

- Stroumpoulis, D., A. Parra, et al. (2006). "A kinetic study of vesicle fusion on silicon dioxide surfaces by ellipsometry." *AIChE Journal* **52**(8): 2931-2937.
- Sui, S. F., T. Urumow, et al. (1988). "Interaction of insulin receptors with lipid bilayers and specific and nonspecific binding of insulin to supported membranes." *Biochemistry* **27**(19): 7463-7469.
- Sumino, A., T. Dewa, et al. (2011). "Construction and Structural Analysis of Tethered Lipid Bilayer Containing Photosynthetic Antenna Proteins for Functional Analysis." *Biomacromolecules* **12**(7): 2850-2858.
- Tamm, L. K. and H. M. McConnell (1985). "Supported phospholipid bilayers." *Biophysical Journal* **47**(1): 105-113.
- Tanaka, M. and E. Sackmann (2005). "Polymer-supported membranes as models of the cell surface." *Nature* **437**(7059): 656-663.
- Tristram-Nagle, S., D. J. Kim, et al. "Structure and Water Permeability of Fully Hydrated Diphytanoylpc." *Biophysical Journal* **98**(3): 282a.
- Tristram-Nagle, S., Y. Liu, et al. (2002). "Structure of gel phase DMPC determined by X-ray diffraction." *Biophysical Journal* **83**(6): 3324-3335.
- Valincius, G., D. J. McGillivray, et al. (2006). "Enzyme Activity to Augment the Characterization of Tethered Bilayer Membranes." *The Journal of Physical Chemistry B* **110**(21): 10213-10216.
- Van Gelder, P., F. Dumas, et al. (2000). "Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes." *Biophysical Chemistry* **85**(2-3): 153-167.
- Vanderah, D. J., R. S. Gates, et al. (2003). "Isostructural Self-Assembled Monolayers. 1. Octadecyl 1-Thiaoligo(ethylene oxides)." *Langmuir* **19**(7): 2612-2620.
- Wagner, M. L. and L. K. Tamm (2000). "Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker." *Biophysical Journal* **79**(3): 1400-1414.
- Wegner, G. (1993). "Control of Molecular and Supramolecular Architecture of Polymers, polymersystems and Nanocomposites." *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals* **235**(1): 1-34.
- Williams, L. M., S. D. Evans, et al. (1997). "Kinetics of formation of single phospholipid bilayers on self-assembled monolayer supports, as monitored by surface plasmon resonance." *Supramolecular Science* **4**(3-4): 513-517.
- Xie, A. F. and S. Granick (2002). "Phospholipid membranes as substrates for polymer adsorption." *Nat Mater* **1**(2): 129-133.
- Yan, L., C. Marzolin, et al. (1997). "Formation and Reaction of Interchain Carboxylic Anhydride Groups on Self-Assembled Monolayers on Gold." *Langmuir* **13**(25): 6704-6712.

TABLE DES MATIERES CH.II

CH. II. FONCTIONNALISATION D'ELECTRODES PAR MOLECULES ANCRE-HARPON POUR LES MEMBRANES..... 40

A. STRATEGIES POSSIBLES POUR LA FONCTIONNALISATION D'ELECTRODES EN VUE D'HARPONNER DES MEMBRANES.....	40
1. CHIMIE DE GREFFAGE DES MOLECULES ANCRE-HARPON ET DU COUSSIN HYDROPHILE	41
2. PRESENTATION DE NOTRE STRATEGIE DE FONCTIONNALISATION POUR L'IMMOBILISATION DE MOLECULES D'INTERET DE TYPE ANCRE-HARPON.....	43
3. PRE-FONCTIONNALISATION ORGANIQUE APPORTANT UNE FONCTION REACTIVE A -OH	44
B. PRE-FONCTIONNALISATION ELECTROCHIMIQUE ET ACTIVATION DE L'INTERFACE METAL/TAMPON SALIN	49
1. MODIFICATION DE SURFACE PAR ELECTRO-GREFFAGE. ELECTRO-REDUCTION DES SELS D'ARYLDIAZONIUMS POUR L'OBTENTION DE LA COUCHE ORGANIQUE PARA-BENZENE CHLORURE DE SULFONYLE (AR-SO ₂ CL).....	49
a. Electrodes.....	50
b. Technique de voltampérométrie cyclique (CV)	51
c. Electro-réduction des sels d'aryldiazoniiums. Formation de Métal-Ar-SO ₃ H	53
d. Obtention de la fonction para-benzene chlorure de sulfonyle. Formation de Métal-Ar-SO ₂ Cl 56	
2. CARACTERISATION DE LA COUCHE ORGANIQUE DE PRE-FONCTIONNALISATION PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE (EIS)	59
a. Technique EIS en mode non faradique.....	60
i. Comportement électrochimique et profil ionique d'une électrode idéale	61
ii. Comportement électrochimique d'une électrode non idéale.....	64
b. Caractérisation EIS en mode non faradique de la pré-fonctionnalisation.....	69
c. Technique EIS en mode Faradique (utilisation d'une sonde redox).....	76
d. Caractérisation EIS en mode faradique de la pré-fonctionnalisation	78
e. Conclusion sur les mesure EIS en mode non-Faradique et Faradique.....	82
C. SUR-GREFFAGE DES TERMINAISONS -OH DES BLOCS HYDROPHILES DES TENSIO-ACTIFS COMMERCIAUX	83
1. FONCTIONNALISATION PUREMENT HYDROPHILE (SUR-GREFFAGE PEO _N -OH) ET FONCTIONNALISATION POUR L'ANCRAGE DES MEMBRANES (SUR-GREFFAGE DES BRIJ).	83
a. Choix de la molécule ancre(hydrophile)-harpon(hydrophobe)	83
b. Choix du cousin hydrophile.....	83
c. Caractérisation faradique de la fonctionnalisation sur électrode d'or millimétrique.....	85
d. Conclusion sur les mesures EIS en mode faradique	89
e. Caractérisation EIS en mode non faradique de la fonctionnalisation sur électrode d'or millimétrique	90
f. Conclusion sur les mesure EIS en mode non-Faradique.....	92

*Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-
harpon pour les membranes.*

- g. Suivi de la fonctionnalisation sur couches d'or par microbalance à cristal de quartz (QCM)
96
- 2. CONCLUSIONS SUR LA STRATEGIE DE FONCTIONNALISATION CHOISIE 101

ANNEXES CH.II 103

A. NETTOYAGE DES ELECTRODES 103

1. L'ELECTRODE D'OR MILLIMETRIQUE 103

2. LES QUARTZ D'OR QUALITE MIROIR..... 103

B. FONCTIONNALISATION DES ELECTRODES 105

C. EIS EN MODE NON FARADIQUE DES FONCTIONNALISATIONS BRIJ58 ET PEO₉ A

DIFFERENTES CONCENTRATIONS 108

BIBLIOGRAPHIE CH.II 117

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

Dans cette partie, nous présentons le mécanisme de fonctionnalisation de surface (électro-greffage de la couche organique et sur-greffage des tensio-actifs) ainsi que la caractérisation de cette fonctionnalisation sur l'or, en utilisant la microbalance à cristal de quartz (QCM), la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), la microscopie à force atomique (AFM) et la mesure des angles de contact.

A. Stratégies possibles pour la fonctionnalisation d'électrodes en vue d'harponner des membranes.

Nous nous sommes intéressés aux stratégies de synthèse pour la formation de couches organiques hydratées sur électrodes métalliques et permettant de viser l'obtention d'une membrane biomimétique flottante avec un système d'harpons hydrophobes insérés dans la bicouche.

Directement en contact avec une surface solide et plane, les membranes supportées sont bien souvent figées et très rigides sur la surface. Le fait d'écarter la membrane de la surface, en diluant la fonction d'ancrage, permet d'une part, de rendre la membrane fluide et d'autre part, d'obtenir un volume aqueux interstitiel entre la membrane et la surface. Ce volume interstitiel est tout particulièrement intéressant pour caractériser les défauts ou la présence de pores (via la présence de peptides par exemple) le long de la membrane déposée en utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique, EIS (et le mouvement des ions dans le domaine fréquentiel balayé à un potentiel donné (Valincius, Meškauskas et al. 2011)). Rendre une membrane fluide, c'est bien souvent se rapprocher de l'état naturel de celle-ci et près d'une électrode nous espérons pouvoir observer des phénomènes tels que les transferts ioniques et polarisations de membrane par la caractérisation électrochimique.

La littérature rapporte différentes molécules permettant la formation de monocouches organiques intermédiaires entre la surface et la membrane (molécules auto-assemblées (SAM) par exemple, etc). Dans le cadre de notre travail, nous proposons de former une couche organique équivalente possédant une fonction d'ancrage pour les membranes. Cette couche organique devra pouvoir être envisagée sur différents types de supports et permettre l'emploi de différentes techniques d'observation (électrochimiques, microbalance à cristal de quartz, microscopies

optiques, etc). La couche organique ainsi formée devra apporter une faible rugosité et une faible épaisseur (donc une faible masse) et recouvrir de façon homogène la surface afin de pouvoir ensuite étudier la structure de la membrane (le premier critère est nécessaire pour l'emploi de techniques de champs proches comme l'AFM pour visualiser une membrane de seulement 4nm d'épaisseur, les deux derniers sont indispensables pour les études cinétiques par QCM par exemple).

1. Chimie de greffage des molécules ancre-harpon et du coussin hydrophile

Pour le système de membrane fluide supportée visé, il nous faut greffer des molécules ancre-harpon ainsi que des molécules apportant un coussin hydrophile entre la surface et la bicouche. Nous présentons brièvement ici les stratégies de chimie utilisées généralement pour cela.

Les méthodes citées dans la littérature pour l'immobilisation de fonctions chimiques d'intérêt sur une surface sont très nombreuses (enchevêtrement, interaction physique, liaison chimique). Le principal mécanisme sur lequel nous nous concentrons est celui de la fonctionnalisation de surface qui permet de créer des fonctions chimiques réactives, c'est-à-dire utilisables pour la fixation d'une autre molécule.

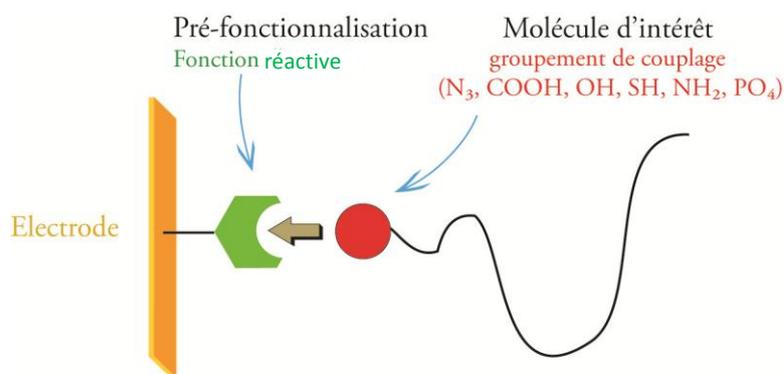


Figure 1 : Schéma de reconnaissance moléculaire

Pour cela il existe différentes méthodes d'immobilisation : par liaison covalente ou par affinité. Même si la voie d'immobilisation par affinité peut se rapprocher d'une liaison covalente (par exemple, $K_d(\text{biotine/streptavidine}) = 4 \times 10^{-14} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (Green 1990), $K_d(\text{Histidine-Tag/Cu}^{2+}) = 5 \times 10^{-10} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (Ng, Pack et al. 1995)), nous choisissons d'orienter notre stratégie sur le greffage des molécules d'intérêt par liaison covalente pour la stabilité de la liaison et sa résistance aux changements de solvants et à l'application de potentiels électriques. Il existe différentes réactions chimiques permettant d'atteindre

la liaison covalente : les fonctions chimiques N_3 , $COOH$, OH , SH , NH_2 (par exemple EDC/NHS), PO_4 , peuvent être initiatrices de réactions permettant de former une liaison covalente entre la molécule d'intérêt et la surface.

Une approche très utilisée dans la littérature est celle du couplage EDC/NHS (Figure 2). Ce processus a souvent été utilisé pour greffer les molécules de type ancre-harpon (Daniel, Sohn et al. 2007).

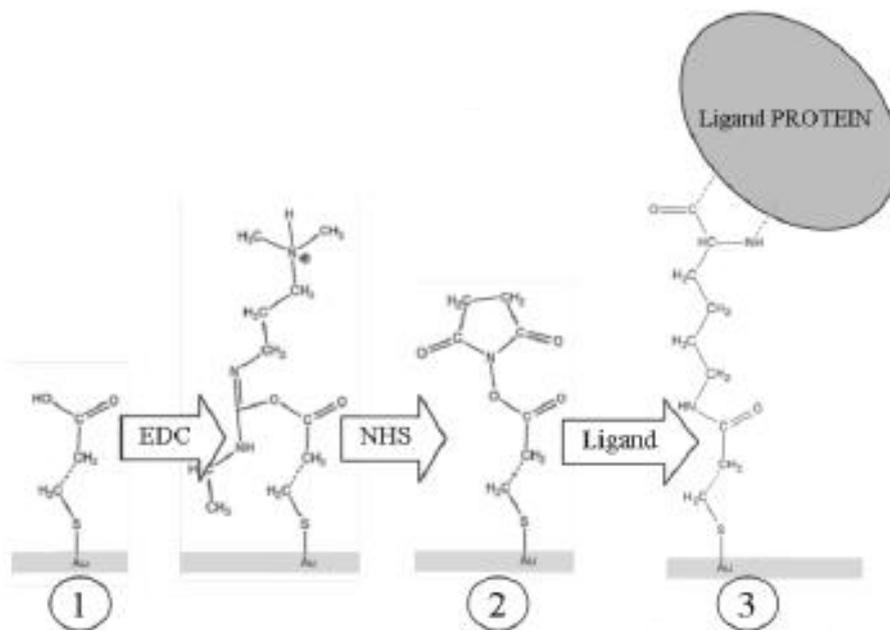


Figure 2 : Schéma de la réaction de couplage EDC/NHS pour l'immobilisation de protéines (Roussille, Brotons et al. 2011)

L'EDC réagit avec l'acide carboxylique de la molécule liée au substrat (exemple de SAMs : 16-MHDA (Roussille, Brotons et al. 2011) , octenyltrichlorosilane (Daniel, Sohn et al. 2007)) pour former un intermédiaire réactionnel (une amine réactive isourée acylée entre l'étape 1 et 2 sur la Figure 2). Cet intermédiaire est peu stable et a tendance à s'hydrolyser pour redonner l'acide carboxylique. L'ajout de NHS conduit à un intermédiaire réactionnel plus stable (l'ester succinimide). Les groupements ester actifs peuvent réagir avec l'amine ou l'hydroxyle terminale d'une molécule telle que les PEG et former des liaisons très stables. Le mélange EDC/NHS doit cependant être préparé juste avant son utilisation.

Dans le cadre de la formation de membrane harponnée, le couplage EDC/NHS est très souvent utilisé pour immobiliser par liaison covalente, sur une SAM, les molécules de type PEO ou PEO-harpon (McGillivray, Valincius et al. 2007; Hertrich, Stetter et al. 2014). Cependant, comme nous venons de l'expliquer, cette méthode est aussi coûteuse et délicate.

Ainsi, les exemples de chimies de surface de la littérature souvent utilisées, notamment pour la réalisation de systèmes d'ancrage des membranes, montrent que ces molécules d'intérêt doivent généralement être modifiées pour présenter les fonctions chimiques réactives avec la pré-fonctionnalisation, ce qui nécessite des étapes de synthèses supplémentaires. D'autre part, il faut souvent des intermédiaires réactifs tels que le couplage EDC/NHS pour les immobiliser sur la pré-fonctionnalisation. Dans le cas du sur-greffage de molécules amphiphiles commerciales possédant une extrémité amine ou alcool primaire, le couplage par activation de la surface en utilisant le couple EDC/NHS permettrait d'introduire une amine primaire sur une couche organique pré-déposée, possédant un acide carboxylique. Cependant, cette réaction est peu efficace lorsque le groupement nucléophile est un alcool primaire (cas de nombreux produits commerciaux répertoriés). Il est donc important de trouver des réactions permettant d'immobiliser des molécules d'intérêt *via* des fonctions chimiques déjà présentes. De plus, la couche organique de pré-fonctionnalisation, alors déposée, doit répondre non seulement aux attentes de faible rugosité, d'homogénéité latérale et de stabilité dans le temps. Pour l'utilisation de l'électrochimie, il faut de même qu'elle corresponde à une espèce qui supporte l'application de potentiels. En effet les SAMs classiques greffées *via* un thiolate, ne sont pas stables sous champ (formation d'oxyde de soufre et détérioration de la couche organique lors du passage d'un courant d'oxydation) (Liu and Gooding 2006).

2. Présentation de notre stratégie de fonctionnalisation pour l'immobilisation de molécules d'intérêt de type ancre-harpon

Comme nous l'avons évoqué, greffer des molécules ancre-harpon sur une surface nécessite généralement un effort conséquent de synthèse organique, nous avons donc cherché à contourner cette étape, en détournant de leur utilisation habituelle des molécules commerciales pouvant jouer le rôle de système ancre-harpon *via* une approche plus rapide, moins chère et versatile. Du fait de l'existence d'une grande variété de molécules commerciales amphiphiles, il nous semblait intéressant de proposer une voie chimique originale les immobilisant sur une surface pré-fonctionnalisée (fonctions hydrophiles sur la surface et fonctions hydrophobes s'insérant dans la membrane). Mélangées avec des molécules purement hydrophiles, elles apporteraient ainsi une fonctionnalisation globalement hydrophile de l'interface avec un harpon hydrophobe pour ancrer les membranes. Suivant les proportions des brins hydrophiles et lipophiles on peut aussi imaginer obtenir des fonctionnalisations hydrophiles/hydrophobes ajustables. La plupart des molécules commerciales envisageables sont de type C_iE_j, Brij, AKYPO, Pluronic, etc et possèdent souvent une fonction amine ou alcool primaire en extrémité hydrophile, fonction qui pourrait être

alors engagée dans une réaction de substitution nucléophile avec une couche organique réactive déjà présente sur la surface. Les méthodes de greffage de type thiols-métal, souvent employées dans la littérature, manquent de stabilité sous champ et ne sont pas adaptées aux analyses électrochimiques. Nous avons donc identifié un moyen d'ancrer les molécules d'intérêt sur une surface métallique modifiée préalablement par électro-greffage, stratégie que nous présentons dans la partie suivante. La couche organique intermédiaire ainsi formée par électro-greffage aboutit à la liaison covalente d'un aryle radical sur la surface. L'extrémité de cet aryle est activée pour présenter la fonction SO_2Cl qui sera réactive au groupement $-\text{OH}$ des molécules commerciales. L'utilisation d'une interface métallique offre ici la possibilité d'engager ensuite des techniques électrochimiques et est commune à la fabrication de nombreux types de biocapteurs supportés.

3. Pré-fonctionnalisation organique apportant une fonction réactive à $-\text{OH}$

Dans ces conditions, nous avons décidé de partir sur la formation d'une première couche active par l'électro-greffage de molécules organiques sur électrode de métal (Pt, Au, Cr, ...). Le terme électro-greffage, directement traduit de "electrografting", caractérise une réaction électrochimique qui permet de générer une couche organique sur une surface conductrice via une liaison covalente (Belanger and Pinson 2011). Il s'agit d'un mécanisme au cours duquel un radical est formé et vient se coupler avec la surface de travail, formant alors une liaison covalente très résistante avec l'électrode. Il existe une grande quantité de voies électrochimiques et de molécules permettant l'électro-greffage (par voie oxydante, réductrice, ..., amine, vinyle, etc), mais dans ce cas, la voie de l'électro-greffage par réduction électrochimique des sels d'aryldiazonium se trouve être bien adaptée à nos besoins.

Les composés organiques qui se prêtent à ce processus sont nombreux (Belanger and Pinson 2011) mais l'électro-réduction des sels de diazonium aromatiques (dits d'aryldiazonium, $\text{R-Ar-N}^+\equiv\text{N X}^-$) est très documentée dans la littérature et permet de créer une liaison covalente forte entre le substrat et la couche organique ainsi que d'introduire de nombreux groupements sur des supports variés, conducteurs ou semi-conducteurs (C, Au, Pt, Zn, ITO, Fe, Cr, Si, ...) (Pinson and Podvorica 2005). Cette réaction se fait par « dédiazonation », le sel d'aryldiazonium perd son diazote pour former le radical $\text{Ar}\cdot$ qui se liera à la surface s'il en est proche. La première mise en évidence de la réduction des sels d'aryldiazonium a été obtenue par Elfonso en 1958. Celui-ci avait mis clairement en avant la formation de l'aryl radicalaire (réduction à un électron) sur une électrode au mercure (Elofson 1958).

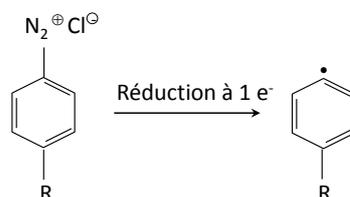


Figure 3 : Schéma réactionnel de l'électro-réduction des sels d'aryldiazonium lors d'un processus à un électron pour l'obtention d'aryles radicalaires

La première chose que nous pouvons retenir, sur les sels d'aryldiazonium, est leur facilité d'obtention et la stabilité du radical formé une fois lié à un substrat.

Concernant leur obtention. Le sel d'aryldiazonium peut être synthétisé (Belanger and Pinson 2011), mais également formé *in situ* à partir de l'amine (du type R-Ar-NH₂) correspondante et directement utilisé dans une cellule électrochimique pour former l'aryle radical (Baranton and Bélanger 2005). C'est ce dernier processus que nous avons choisi car le sel d'aryldiazonium étant peu stable à l'air et exposé à la lumière, il est nécessaire de le produire *in situ* juste avant de l'utiliser pour avoir le maximum de produit. En milieu acide contenant du nitrite de sodium (NO₂⁻ Na⁺), le composé de type R-Ar-NH₂ est directement transformé en sel d'aryldiazonium via le nitrite de sodium. A partir de là, le sel d'aryldiazonium est réduit pour obtenir le radical Ar[•]. Il a été démontré que la modification de l'électrode par une couche organique selon ce procédé se fait de façon irréversible et passive l'électrode (au sens d'un greffage homogène).

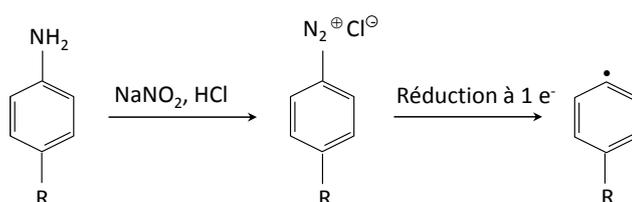


Figure 4 : Schéma réactionnel pour l'obtention d'aryles radicalaires à partir d'un composé de type R-Ar-NH₂

Pour réduire le sel d'aryldiazonium, il existe plusieurs voies : chimique (agent chimique réducteur), électrochimique (application d'un potentiel réducteur), UV (irradiation décompose la molécule et forme l'aryle radical) et auto-greffage (décomposition dans le temps et en présence de la lumière du sel d'aryldiazonium pour former l'aryle radical). Dans notre cas, ayant besoin de recouvrir toute la surface de façon homogène, nous nous sommes orientés vers la voie électrochimique, qui reste

la plus versatile, et permet d'obtenir rapidement un fort taux de greffage à la surface de l'électrode sans ajout d'un composé chimique tiers pouvant polluer la surface de l'électrode.

Concernant leur stabilité. La robustesse de la couche organique ainsi liée à la surface a été démontrée face aux lavages aux ultrasons dans différents types de solvants (acétonitrile, DMF, DMSO, benzène, benzonitrile, acétone, éthanol, méthanol, dichlorométhane et chloroforme) et aux hautes températures (stable autour de 200°C, dégradée entre 300 et 500 °C), balayant ainsi l'hypothèse d'une simple adsorption de la molécule sur l'électrode (Allongue, Delamar et al. 1997; Toupin and Bélanger 2007). Il a aussi été démontré, par XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy), que la couche organique pouvait résister en solution aqueuse à l'application de forts potentiels électrochimiques (+1,8V/ECS et -2 V/ECS) (D'Amour and Bélanger 2003).

Les discussions se portent aujourd'hui sur la formation de mono et de multi-couches organiques à la surface. Il est généralement admis que quelques couches organiques peuvent se former suite à la réaction d'électro-greffage (Figure 5).

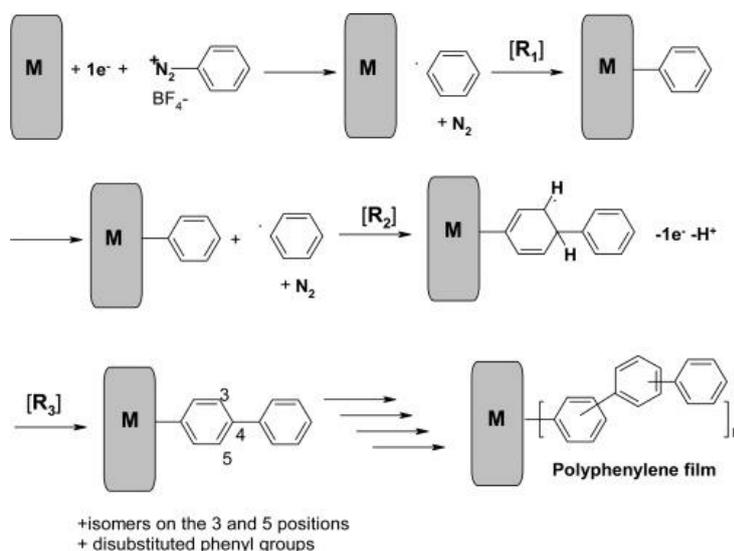


Figure 5 : Schéma du mécanisme de formation de multi-couches (Adenier, Combellas et al. 2006)

Cependant, certains cas peuvent orienter la réaction vers la formation d'une quasi-monocouche organique. Ainsi, l'intégration d'un groupement encombrant R en position *para* du sel d'aryldiazonium permettra de protéger la surface des radicaux formés en solution qui pourraient se coupler aux groupements aryles déjà greffés sur la surface (Leroux, Fei et al. 2010). Une molécule d'intérêt peut, par exemple, être utilisée directement en tant que groupement encombrant comme dans le cas des travaux de Gooding et al. qui synthétisent le sel d'aryldiazonium avec des molécules PEO₃ pour le

greffer en une étape (Liu and Gooding 2006). Par contre ceci demande de former au préalable le sel avec les complications liées à la réactivité des sels en solution, la manipulation du produit, ou des étapes de purification additionnelles, par rapport à notre stratégie (Bahr, Yang et al. 2001).

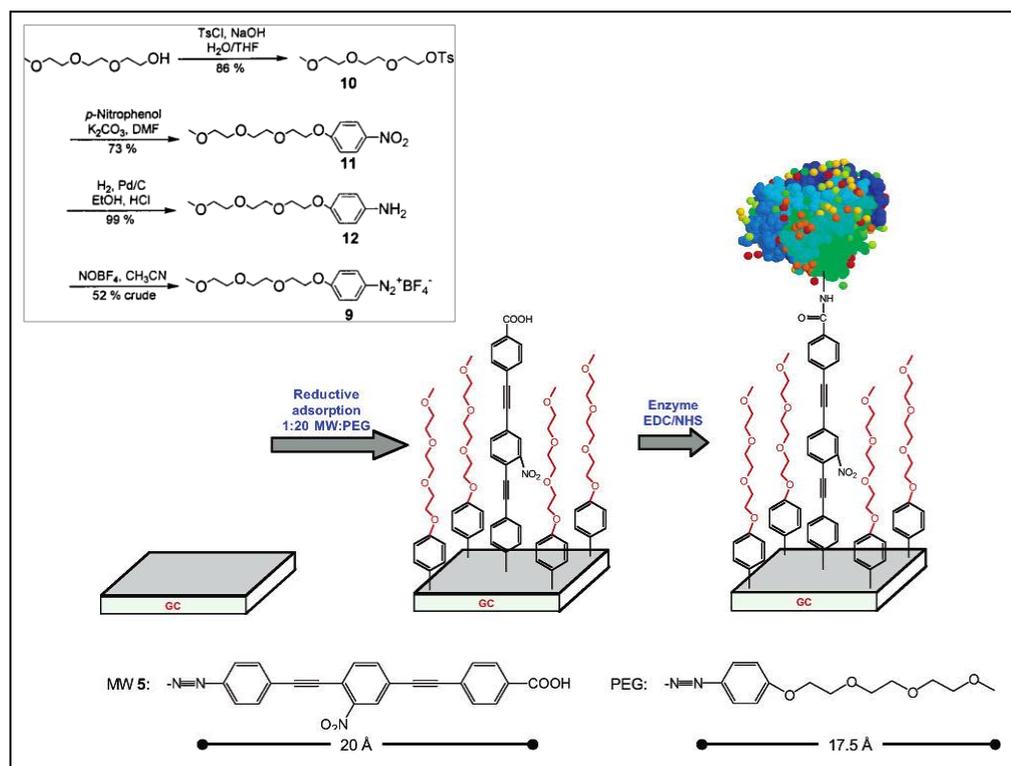


Figure 6 : Synthèse d'un sel d'aryldiazonium portant une molécule PEG et représentation schématique de l'interface d'un carbone vitreux (GC) fonctionnalisée pour l'adsorption de protéines

Dans le cadre de notre sur-greffage de molécules ancre-harpon, il faut que cette monocouche organique puisse réagir avec la terminaison hydroxyle des tensio-actifs commerciaux. Nous devons donc utiliser une molécule R-Ar-NH₂ qui puisse se transformer par la suite en sel d'aryldiazonium et dont le groupement R soit réactif à -OH, tel que le chlorure de sulfonyl (-SO₂Cl), molécule très réactive avec les nucléophiles faibles comme les alcools primaires (Pilard, Marchand et al. 1998). Il existe deux précurseurs commerciaux permettant d'aboutir au résultat souhaité. Cependant, au vu des travaux récents réalisés sur ces deux fonctions (Thèse Esnault, Université du Maine, 2012), seul le précurseur acide sulfanilique (H₂N-Ar-SO₃H) permet de conserver une faible rugosité, une épaisseur de type mono-couche et une bonne homogénéité de greffage. Nous profitons aussi de la présence du groupement -SO₃H en position *para* dont la charge électrostatique joue en défaveur de la formation de multicouches (Leroux, Fei et al. 2010). Pour obtenir une monocouche organique,

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

nous suivons la réaction d'électro-greffage de la fonction $\text{H}_2\text{N-Ar-SO}_3\text{H}$ par réduction des sels d'aryldiazonium présentée dans la Figure 7.

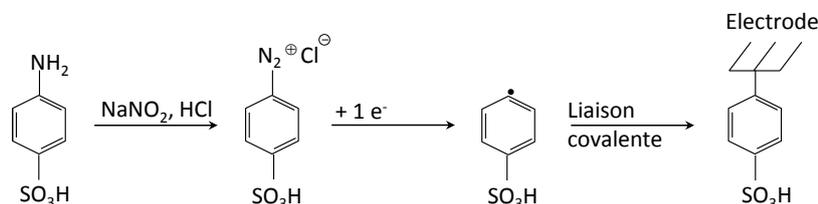


Figure 7 : Schéma réactionnel de l'électro-greffage des sels d'aryldiazonium pour former la fonction $\text{Ar-SO}_3\text{H}$. L'amine est précurseur du sel d'aryldiazonium et la fonction acide sulfanilique est précurseur du chlorure de sulfonyle.

Pour l'activation de la surface $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ en $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$, nous nous baserons sur des travaux précédemment effectués au sein du laboratoire de chimie de l'IMMM et rapportés dans la littérature (Chen, Zhang et al. 2008; Hu, Yang et al. 2010; Esnault, Chénais et al. 2013). La surface de l'électrode modifiée $\text{Ar-SO}_3\text{H}$, est trempée dans une solution de dichlorométhane (CH_2Cl_2) contenant 5mM de PCl_5 , pendant 3 min, pour obtenir une couche organique de type $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$. La réaction de chloration des fonctions $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ s'opère selon le schéma réactionnel de la Figure 8.

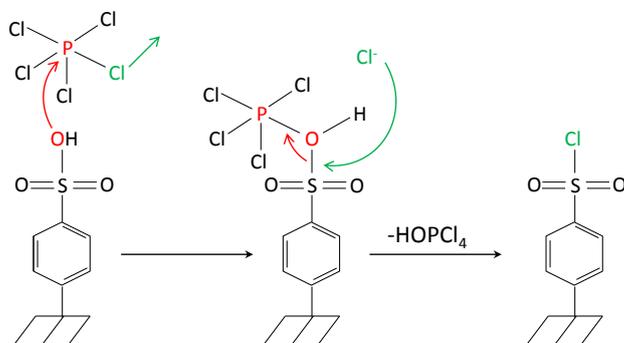


Figure 8 : Schéma général de la réaction de PCl_5 sur la couche organique $\text{Ar-SO}_3\text{H}$

Le schéma réactionnel complet pour l'obtention de la couche organique Métal- $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ est représenté Figure 9.

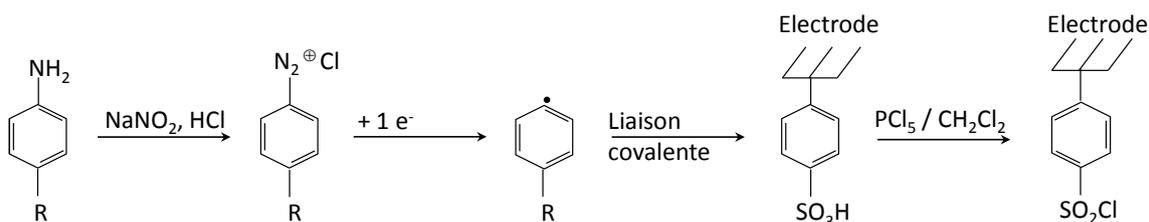


Figure 9 : Schéma réactionnel pour l'obtention de la couche organique $\text{Au-Ar-SO}_2\text{Cl}$

La couche organique Métal-Ar-SO₂Cl formée (à l'étape dite de pré-fonctionnalisation) permet principalement de réagir avec de bon nucléophiles (HN₂, OH) et donc d'introduire un grand nombre de groupements chimiques différents pour fonctionnaliser l'électrode (étape de sur-greffage). En effet le chlore du groupement chimique Ar-SO₂Cl, est un très bon groupe partant (bon nucléofuge). Il peut ainsi être engagé dans une réaction dite de substitution nucléophile et permettre l'immobilisation de molécule d'intérêt possédant une fonction chimique NH₂, OH (Figure 10).

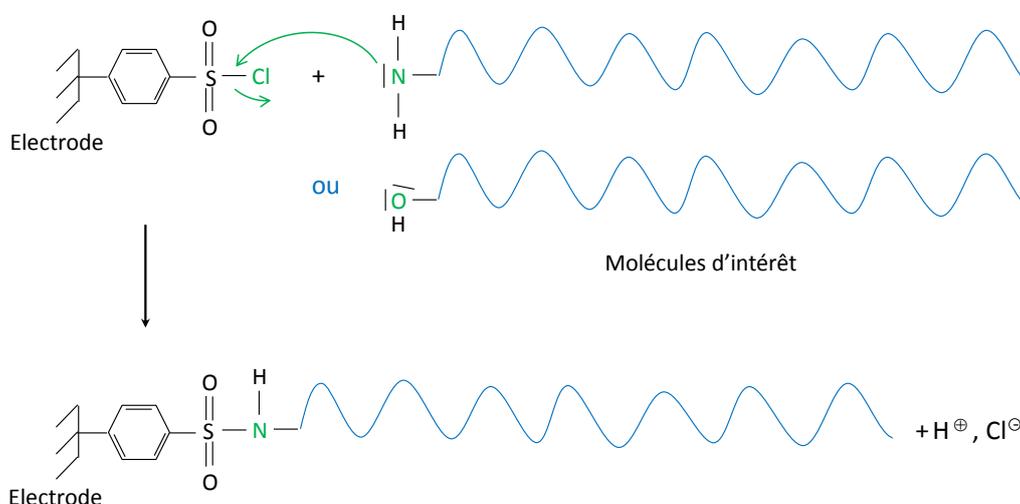


Figure 10 : Schéma réactionnel de la pré-fonctionnalisation Ar-SO₂Cl avec la terminaison NH₂ ou OH d'une molécule d'intérêt

B. Pré-Fonctionnalisation électrochimique et activation de l'interface métal/tampon salin

Cette partie présente les résultats obtenus sur la pré-fonctionnalisation des électrodes Métal-ArSO₂Cl qui permettra d'immobiliser les molécules d'intérêt Brij et PEO par leur terminaison -OH.

1. Modification de surface par électro-greffage. Electro-réduction des sels d'aryldiazoniums pour l'obtention de la couche organique para-benzène chlorure de sulfonyle (Ar-SO₂Cl)

Dans le cadre de l'étude des interfaces électrode|électrolyte, différentes techniques électrochimiques sont couramment utilisées. Elles mettent toutes en jeu des mesures

de potentiel et/ou de courant, et peuvent être classées en deux groupes. Le premier regroupe les techniques dites stationnaires, comme la chronopotentiométrie, la chronoampérométrie, la voltampérométrie, etc. Ces techniques permettent de recueillir des informations liées à la thermodynamique du système étudié et à sa cinétique. Le second regroupe un certain nombre de techniques dites transitoires, basées sur l'utilisation des fonctions de transfert et dont la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) fait partie.

a. Electrodes

L'association d'un métal à un électrolyte constitue une électrode. Lorsque ces deux phases conductrices de l'électricité (métal et électrolyte) sont en contact, différents phénomènes physiques et physico-chimiques s'amorcent, chacun suivant sa propre cinétique, ils conduisent le système vers un équilibre thermodynamique. Ces phénomènes vont dépendre en partie du potentiel de la surface l'électrode et de celui au sein de l'électrolyte. Le potentiel de l'électrode est constant en tout point de la surface mais celui de l'électrolyte suit un gradient. Ceci a pour conséquence de créer une variation de potentiel et de courant dans l'électrolyte. En rattachant une électrode à un circuit électrique extérieur fermé, il est possible de mesurer le courant électrique issu du déplacement des charges ioniques à l'interface métal|électrolyte, ce courant est dit capacitif voir non-Faradique. Il est aussi possible de transférer des électrons de l'électrode à une espèce en solution pouvant recevoir ou donner des électrons. Ce transfert résulte en un courant électrique mesurable qu'on qualifie de courant Faradique. Ceci ouvre la voie aux techniques d'électrochimie en solution, comme la voltampérométrie cyclique et l'impédance électrochimique. Ici, nous rappelons les principes de la technique que nous utilisons pour l'électro-greffage : la voltampérométrie cyclique à trois électrodes. Dans un système à trois électrodes, l'électrode de travail est l'électrode sur laquelle on applique une différence de potentiel (ddp) et ainsi est celle sur laquelle les réactions électrochimiques auront lieu. La ddp sera appliquée par rapport à une électrode de référence (par exemple de type Ag|Ag⁺) permettant alors de contrôler constamment le potentiel au cours des différentes expériences contrairement à l'utilisation d'un système à deux électrodes. Le courant passant à travers l'électrode de travail suite à l'application de la ddp est mesuré via une contre-électrode inerte (généralement du platine).

Pour la réalisation et la caractérisation de notre fonctionnalisation, nous utilisons trois types d'électrode de travail :

- Une électrode d'or millimétrique commerciale utilisée pour l'électrochimie et polie à la main (diamètre 0,3 cm soit $S_{WE} = 0,07 \text{ cm}^2$) ;

- Un quartz recouvert d'un film d'or, utilisé pour les expériences de QCM ($S_{WE} = 0,196 \text{ cm}^2$), à usage unique ;

- Une couche mince de chrome (~30nm) déposée sur une lamelle couvre objet (épaisseur ~170µm et indice optique ~1,5) ou une lame de verre épaisse pour la microscopie, à usage unique.

Dans ce chapitre, nous ne parlons que des fonctionnalisations sur surface d'or, le chapitre IV étant consacré à l'étude des surfaces de chrome.

b. Technique de voltampérométrie cyclique (CV)

La voltampérométrie est une technique électrochimique stationnaire couramment employée dans les laboratoires, notamment en chimie de surface. Le principe de la technique consiste à imposer une rampe linéaire de potentiel E sur le système étudié et à mesurer sa réponse I en courant. La vitesse de balayage en potentiel utilisée doit être faible pour que le système puisse être considéré dans un état quasi-stationnaire. Dans le cas présent, elle a été fixée à 100 mV s^{-1} , plutôt rapide. Le résultat obtenu est alors généralement représenté en traçant la courbe $I = f(E)$. Pour comparer différents systèmes, le courant est ramené à une densité de courant correspondante à une surface de 1 cm^2 .

Dans le cas particulier des réactions d'oxydoréduction, la CV permet d'étudier les mécanismes chimiques/électrochimiques, cinétiques, de transfert électronique, intervenant à l'interface électrode|électrolyte en présence d'espèces redox. En effet, lorsqu'une réaction d'oxydoréduction $\alpha \text{Ox} + n\text{e}^- \leftrightarrow \beta \text{Red}$ (où Ox est l'espèce oxydante et Red l'espèce réductrice) a lieu à la surface d'une électrode, il est possible de déterminer le potentiel d'équilibre associé au couple redox mis en jeu. En effet, le potentiel pris par l'électrode obéit à la loi de Nernst, dont la formulation générale est la suivante :

Équation 1

$$E_{eq}(\text{Ox}/\text{Red}) = E^\circ(\text{Ox}/\text{Red}) + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{\text{Ox}}^\alpha}{a_{\text{Red}}^\beta} \right),$$

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

T : température de mesure exprimée en Kelvin,

n : nombre d'électrons mis en jeu dans la demi-équation redox,

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

a : activité de l'espèce considérée,

E° : potentiel standard du couple.

Lorsqu'un potentiel est imposé au système (E_{app}), l'équilibre de la réaction redox est déplacé. Les concentrations en oxydant et en réducteur vont devoir évoluer afin que le système s'adapte aux nouvelles conditions qui lui sont imposées (Figure 11).

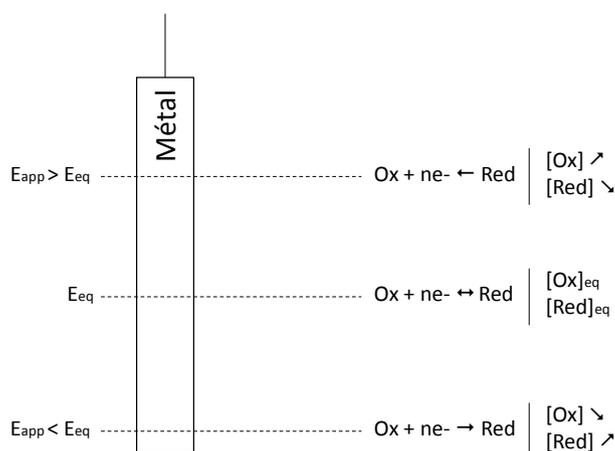


Figure 11 : Evolution du système redox en fonction du potentiel appliqué

L'évolution du système ($E_{eq} \rightarrow E_{appliqué}$) va donc s'effectuer en oxydant ou en réduisant, à la surface de l'électrode, une espèce présente en solution. Ces transformations redox faisant intervenir un échange d'électrons, il sera possible d'étudier la cinétique de la transformation (vitesse d'échange électronique) en suivant l'évolution du courant électrique qui parcourt l'électrode en fonction de la vitesse de balayage des potentiels, technique que l'on nomme « voltampérométrie cyclique ». Ces études sont réalisées en traçant les courbes « intensité/potentiel » ou $i=f(E)$, encore appelées voltampérogrammes.

- Cas 1 : Si on applique un potentiel supérieur au potentiel d'équilibre, le système subit une oxydation, le courant obtenu est dit anodique (par convention le courant est positif).
- Cas 2 : Si on applique un potentiel inférieur au potentiel d'équilibre, le système subit une réduction, le courant obtenu est dit cathodique (par convention le courant est négatif).

Le montage classique que nous avons utilisé et destiné à effectuer la mesure des courbes « intensité/potentiel », est un montage dit « à trois électrodes » (Figure 12).

Le potentiel de l'électrode de travail est imposé par rapport à une électrode de référence (Ag|AgCl ou ECS en milieu aqueux) et mesuré à l'aide d'un potentiostat. On le fait varier sur un domaine délimité par des bornes supérieure (E_1) et inférieure (E_2)

fixées par le solvant, à une vitesse v souvent comprise entre 1 mV/s et 1 V/s par rapport à l'électrode de référence. Le potentiel appliqué ainsi à l'électrode de travail est le suivant : $E = E_i \pm vt$ avec E_i le potentiel de départ choisit de telle sorte qu'aucune substance ne soit électro-active à ce potentiel. Le courant issu de la transformation électrochimique est mesuré entre l'électrode de travail et la contre-électrode (souvent un fil de platine). La courbe de polarisation correspondante présente alors un pic de courant. Il est important de préciser que si l'on effectue une réduction à l'électrode de travail (polarisation anodique), une polarisation cathodique a lieu à la contre-électrode (et inversement). Dans tous les cas, seule la réaction qui a lieu à l'électrode de travail nous intéresse et est étudiée par le biais de la mesure de courant en fonction du potentiel appliqué. La contre électrode elle est choisie pour éviter toute réaction.

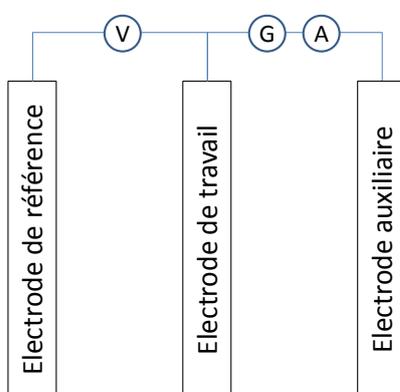


Figure 12 : Schéma de montage électrochimique à trois électrodes

c. Electro-réduction des sels d'aryldiazoniums. Formation de Métal-Ar-SO₃H

La première étape de notre fonctionnalisation consiste à former la couche organique Ar-SO₃H. Nous présentons ici l'obtention expérimentale de cette fonction par l'électro-réduction des sels d'aryldiazonium à partir de l'acide sulfanilique.

Cette première couche organique est formée sur les électrodes de travail par voltampérométrie cyclique et a été contrôlée par la même expérience en E-QCM (microbalance à cristal de quartz couplée à l'électrochimie) sur quartz d'or. Pour cela nous utilisons une « cellule électrochimique ». L'électrode d'or millimétrique (surface 0,07 cm²) est placée en solution dans un bécher, avec une contre-électrode (fil de Pt) et une électrode de référence (Ag|AgCl), le tout étant connecté à un potentiostat* qui impose un potentiel. Le quartz recouvert d'or, quant à lui, est fonctionnalisé dans une cellule téflon étanche adaptée à sa forme, assurant l'étanchéité pour pouvoir mettre la

* potentiostat/galvanostat modèle VMP2/Z fournit par Bio-Logic et piloté par le logiciel EC-Lab

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

surface d'or du quartz au contact de la solution dans laquelle plongent la contre-électrode et l'électrode de référence. La prise de masse est suivie *in-situ* par QCM sous champ dans ce cas.

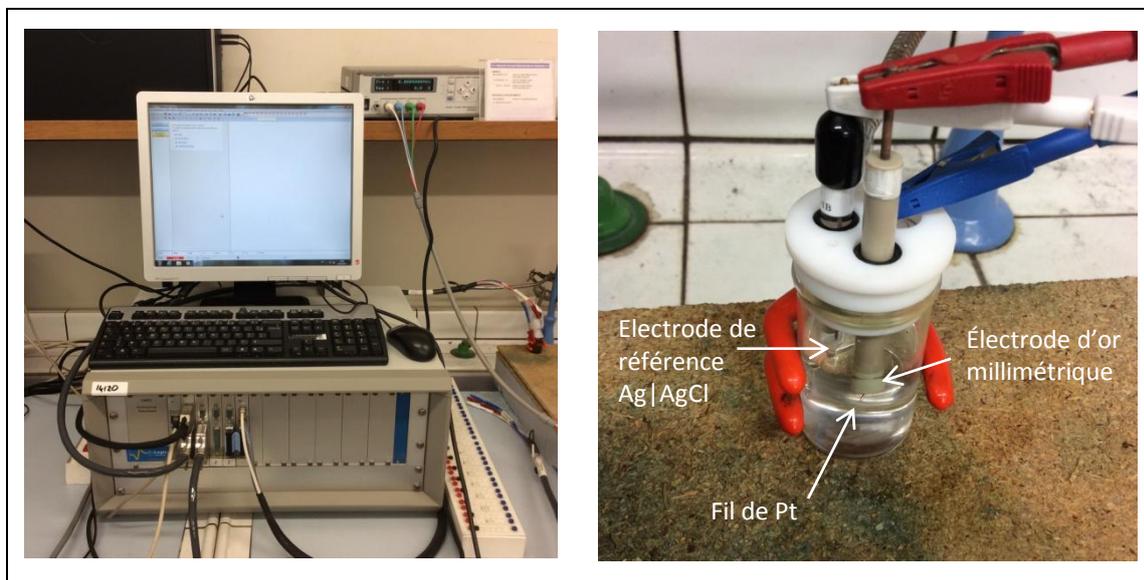


Figure 13 : Photos du matériel utilisé pour l'électrochimie : potentiostat (à gauche), cellule électrochimiques pour l'électrode millimétrique d'or (à droite)

Après nettoyage, nous introduisons les électrodes dans la solution contenant l'acide sulfanilique (NaNO_2 (10mM) + $\text{H}_2\text{N-Ar-SO}_3\text{H}$ (10mM) + HCl (10mL, 1M)). La présence de NaNO_2 en milieu acide permet de former rapidement une amine en sel d'aryldiazonium. La réduction irréversible à un électron en aryle radicalaire (N_2^+ à Ar^*) et l'électro-greffage sur l'or se font en appliquant une gamme de potentiel allant de 0,2V à -0,2V/ Ag|AgAgCl (Figure 14).

Lors du premier voltampérogramme cyclique qui démarre de 0,2V, on enregistre un pic de réduction à un potentiel de 0,06 V / (Ag|AgCl) et possédant un courant de réduction de -0,57 mA, qui est caractéristique de la réduction du sel d'aryldiazonium et la formation de l'aryl-radical en milieu aqueux sur une électrode d'or. Cette première vague se voit parfaitement sur le signal QCM par une prise de masse nette. Le deuxième voltampérogramme cyclique montre que le pic de réduction a diminué de moitié en intensité. L'intensité du courant est directement reliée à la quantité de matière réduite à la surface. Dans le cas de l'électro-greffage par la réduction des sels d'aryldiazonium, le principal critère démontrant la fonctionnalisation de la surface est la passivation de l'électrode. Cette passivation entraîne une forte diminution de l'intensité du courant. L'effet commun de la prise de masse et la passivation progressive de l'électrode nous encourage alors à supposer que dans la vague de réduction à - 0,57 V/(Ag|AgCl), nous observons la réduction du sel d'aryldiazonium

($N_2^+ \rightarrow Ar^*$) formé suite à la réaction entre l'amine et le $NaNO_2$ et son greffage sur la surface.

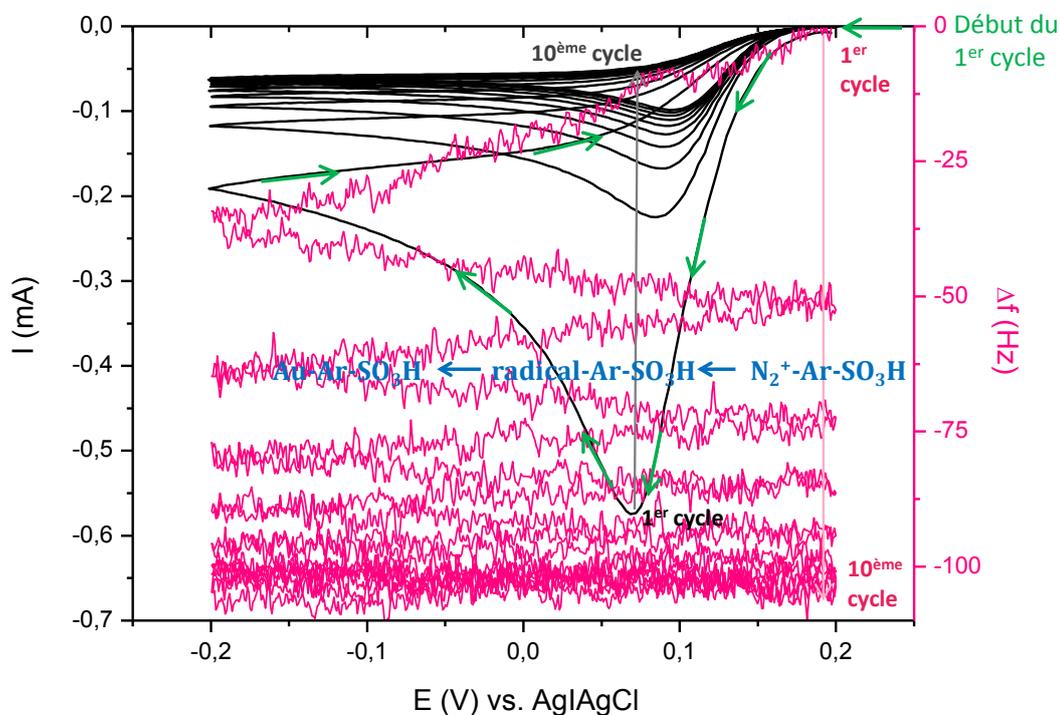


Figure 14 : Voltampérogrammes cycliques enregistrés sur électrode d'or (vitesse de balayage, 100 mV/s, 10cycles) et variation de fréquence au cours des 10 cycles aboutissant à la fonctionnalisation d'ancre Au-Ar-SO₃H

Sur les voltampérogrammes cycliques suivants, le pic de réduction continue de diminuer progressivement en intensité avec le nombre de cycles, de -0,22 à -0,09mA. La littérature rapporte néanmoins que la passivation de l'électrode doit être quasiment complète à la fin du premier cycle et que la masse enregistrée sur cristal de quartz arrête de croître à la fin du premier cycle (Haccoun, Vautrin-UI et al. 2008). Or, nous voyons sur les 5 premiers cycles ici, que le courant ne disparaît pas complètement et que la masse continue de croître très légèrement. Elle se stabilise après le 5ème cycle à $\Delta m \approx 110,7$ ng, soit une densité surfacique de 3×10^{-9} mol cm^{-2} , correspondant à une surface par molécule d'environ 6 \AA^2 . Nous pouvons donc supposer que l'électro-greffage ne s'effectue pas complètement au premier cycle de façon compacte et que la couche se densifie aux suivants. La variation de masse enregistrée par QCM reste très basse et proche de ce que l'on attend pour une quasi-monocouche. Nous constatons également que le pic de réduction se décale au niveau de son potentiel électrochimique, de 0,06 V au premier cycle à 0,09 V/ Ag|AgCl au dixième. L'intensité du courant étant liée à la résistance au transfert électronique entre l'électrode de travail et la solution, ce faible décalage du potentiel de réduction

est probablement dû à une hausse ohmique liée au changement d'état de la surface de l'électrode après chaque cycle.

d. Obtention de la fonction para-benzène chlorure de sulfonyle. Formation de Métal-Ar-SO₂Cl

A ce stade, la surface de l'électrode est fonctionnalisée Au-Ar-SO₃H. La couche organique électro-greffée doit maintenant être activée en Ar-SO₂Cl pour la réaction avec la terminaison -OH des molécules de surfactant. La surface de l'électrode est trempée dans une solution de dichlorométhane contenant 5mM de PCl₅ pendant 3 min. Nous avons utilisé la voltampérométrie cyclique et la spectroscopie d'impédance électrochimique pour mettre en évidence les différents états de surface et notamment justifier le passage de la fonction Au-Ar-SO₃H à la fonction Au-Ar-SO₂Cl.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, lorsqu'on applique un potentiel par le biais d'une CV, le système redox évolue en faisant intervenir un échange d'électrons. Le courant enregistré résulte des phénomènes de transfert de charges (ioniques et électroniques) à la surface de l'électrode. Dans le cas d'une électrode plane le courant dit capacitif (lié aux charges ioniques) est négligeable devant le courant Faradique (lié à la réaction redox). On peut alors étudier par CV le transfert électronique entre l'électrode de travail et une espèce redox se trouvant en solution. Le courant résultant du transfert électronique et sa cinétique seront alors dépendant de la concentration en espèce redox mais aussi de l'état de surface de l'électrode de travail.

On peut alors étudier l'état d'une surface d'électrode en étudiant le signal électrochimique d'une espèce redox se trouvant en solution. Ainsi, en fonction de la sonde redox choisie, différents paramètres peuvent être estimés et comparés entre deux états de surfaces différents. Par exemple, la sonde redox [Ru(NH₃)₆]³⁺ est chargée positivement, son interaction avec l'électrode sera modifiée en fonction de l'état de charge de celle-ci. Par exemple, une couche organique globalement chargée positive, expulsera cette sonde redox, ce qui affectera globalement le transfert électronique entre l'électrode et la sonde redox par rapport à l'électrode nue (Figure 15).

La sonde redox que nous utilisons ici est le couple redox l'hexacyanoferrate (II)/(III) de tétrapotassium : [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻, avec K⁺ en contre-ion (réaction [Fe(CN)₆]³⁻ + e⁻ ↔ [Fe(CN)₆]⁴⁻). L'utilisation de ce couple redox dit négatif est justifiée par son signal reproductible et servant de modèle dans la littérature (avec le [Ru(NH₃)₆]³⁺ dans le cas de sondes redox dites positives).

Ces expériences d'électrochimie en régime Faradique sont menées sur l'électrode d'or millimétrique plongée dans la cellule contenant une solution aqueuse à 5mM de

$[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-} + NaCl$ (10mL, 0,15M). Nous utilisons une quantité équimolaire du couple redox pour avoir un signal équivalent en oxydation et en réduction.

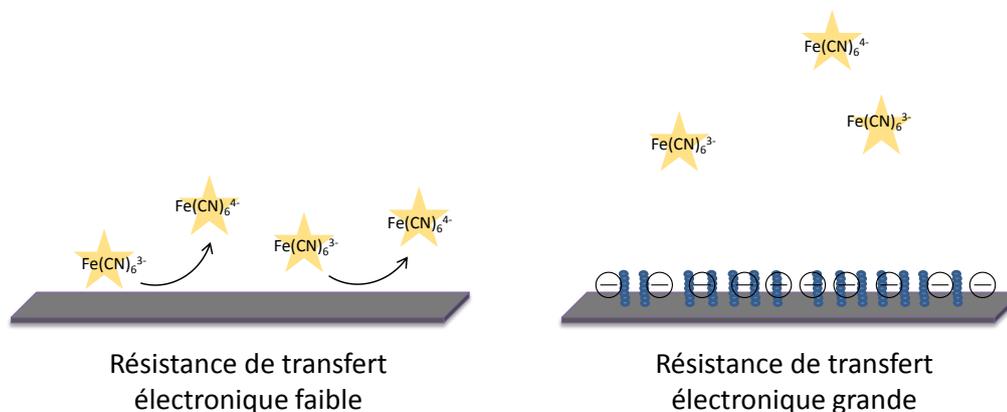


Figure 15 : Schéma illustrant l'effet de la fonctionnalisation de surface sur la résistance de transfert de charge d'une solution Faradique

Nous avons enregistré les voltampérogrammes cycliques pour trois différents états de surface de l'électrode d'or :

- Au (la surface est polie, nettoyée à l'eau mais non fonctionnalisée) ;
- Au-Ar-SO₃H (la surface est modifiée par la couche organique) ;
- Au-Ar-SO₂Cl (la couche organique est activée pour réagir avec -OH).

Sur la Figure 16, la voltampérométrie cyclique du couple redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/4-}$ enregistrée sur électrode d'or non modifiée (courbe noire), présente un pic d'oxydation à $E_{ox} = +0,26V$ correspondant à l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) et un pic de réduction à $E_{red} = +0,16V$ correspondant à la réduction du Fe(III) en Fe(II). Ce système caractéristique présente un faible écart de potentiel entre les pics d'oxydation et de réduction ($\Delta E = E_{ox} - E_{red} = 0,1V$). Cet écart est fonction de l'électrolyte, de la surface (rugosité, dépôt, ...) et du transfert électronique (courant Faradique qui dépend aussi de la vitesse de cycle). Plus le ΔE mesuré est faible, plus rapide est le transfert électronique. Ce faible écart de potentiel témoigne donc d'un transfert électronique efficace entre l'électrode et l'espèce en solution. Il est d'autant plus efficace que la vitesse de balayage est plus lente (nous travaillons $v = 100$ mV/s mais testé à d'autres).

Lorsque l'électrode est modifiée par la couche organique Ar-SO₃H (courbe gris foncé), la voltampérométrie cyclique présente un courant moins important que celui de l'électrode nue, ainsi qu'un écart de pic (0,29V) à pic (0,14V) légèrement plus grand ($\Delta E_{ArSO_3H} = 0,15V$), caractéristiques d'un transfert électronique plus lent, c'est-à-dire d'une résistance au transfert électronique (R_{ct}) plus grande. L'abaissement du courant

et par conséquent, l'augmentation de la différence de potentiel de pic à pic ΔE , sont dus à la passivation de l'électrode provoquée par la modification de la surface lors de la réduction d'un sel d'aryldiazonium. La couche organique rend le transfert électronique plus difficile par hausse ohmique et la quantité d'espèces oxydée ou réduite à la surface diminue.

Ces effets sont encore plus prononcés sur la courbe gris-clair avec le passage à la fonction Ar-SO₂Cl ($\Delta E_{ArSO_2Cl} = 0,23V$), probablement dû à la charge partiellement négative du SO₂Cl, ce qui peut alors augmenter la résistance R_{ct} couplée à une composante hydrophobe de la surface.

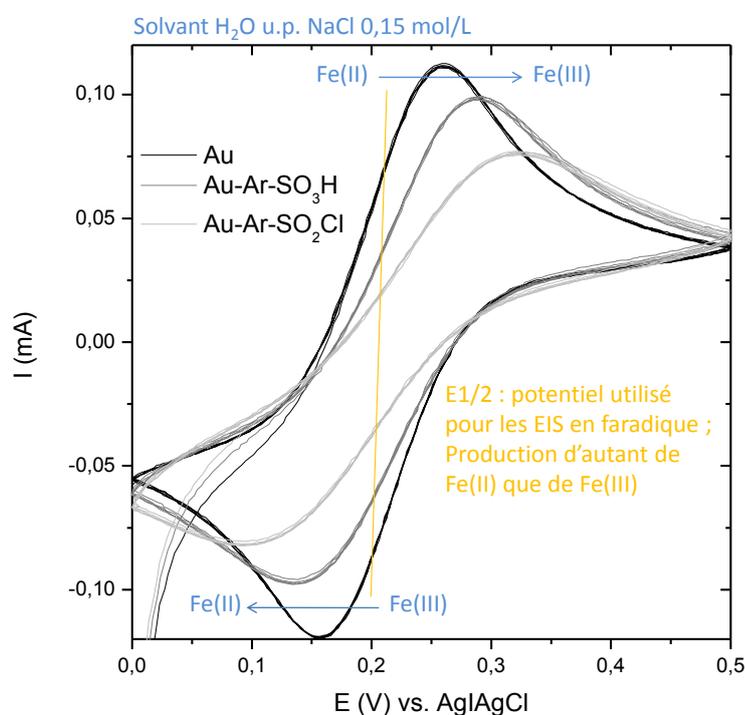


Figure 16 : Voltampérogrammes cycliques enregistrés sur électrode d'or dans NaCl (0,15M) contenant 5mM du couple $[Fe(Cn)_6]^{3-/4-}$ (vitesse de balayage, 100 mV/s, 10cycles)

La CV nous a permis de mettre en évidence la modification de surface par un effet direct sur l'intensité du courant faradique que nous avons interprété comme une variation de résistance de transfert électronique. Dans la suite, nous verrons qu'il existe une autre technique pour mieux visualiser la variation de la R_{ct} de ces surfaces, il s'agit de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) en régime faradique. Celle-ci est présentée juste après l'EIS en régime non faradique.

2. Caractérisation de la couche organique de pré-fonctionnalisation par Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

Contrairement à la CV qui permet de suivre le courant sur une gamme de potentiel appliqué, la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) consiste à induire une perturbation autour d'un potentiel fixé et de mesurer la perturbation du courant résultante. Classiquement cette perturbation est sinusoïdale et s'étend sur une gamme de fréquence imposée. En mode harmonique (signaux alternatifs), le potentiel appliqué prend la forme $E(t) = E_0 + \Delta E \cos(\omega t + \varphi_E)$ et le courant alternatif résultant suit $I(t) = I_0 + \Delta I \cos(\omega t + \varphi_I)$, où E_0 et I_0 sont les composantes continues du courant et du potentiel et $\omega = 2\pi f$ est la fréquence de pulsation. L'impédance est une généralisation de la loi d'Ohm et correspond au rapport entre le potentiel appliqué et le courant recueilli en sortie :

$$Z(\omega) = \Delta E(\omega) / \Delta I(\omega),$$

où $\Delta E(\omega)$ est la perturbation imposée à un potentiel choisi E_0 , et $\Delta I(\omega)$ la réponse en courant du système étudié avec une composante continue I_0 . Pour des signaux alternatifs, l'impédance électrochimique se définit comme le nombre complexe $Z(\omega) = \text{Re}(Z(\omega)) + j \text{Im}(Z(\omega))$ où $j = \sqrt{-1}$, qui se décompose en partie réelle ($\text{Re}(Z)$) et imaginaire ($\text{Im}(Z)$) qui sont respectivement d'origine résistive et capacitive, ou encore $Z(\omega) = |Z(\omega)|e^{j\varphi(\omega)}$, $|Z(\omega)|$ étant le module de l'impédance et φ le déphasage.

Lors de l'application de la perturbation autour du potentiel E_0 , différents phénomènes se produisent à l'interface électrode|électrolyte tels que (pour le cas non faradique) :

- La restructuration de la double couche ionique, dont une perturbation sinusoïdale lors de la mesure EIS entraîne sa charge et sa décharge tel un condensateur ;
- La chute ohmique liée à la variation de potentiel et de courant dans l'électrolyte.

Il peut aussi se produire des processus d'oxydoréduction (pour le cas faradique).

Il semble alors assez naturel de faire l'analogie entre impédance électrochimique et impédance électrique. Les différents processus se déroulant à l'interface électrode|électrolyte peuvent être modélisés par la construction d'un circuit électrique équivalent. Chacun des composants utilisés, branchés en série ou en parallèle, représente un phénomène physique particulier. Ces modèles sont ensuite utilisés pour ajuster les diagrammes expérimentaux afin d'extraire les paramètres nécessaires à la

compréhension du système étudié. Il existe différentes représentations graphiques des spectres EIS, quelque soit le mode, faradique ou non. Habituellement, il existe deux modes de représentation des diagrammes d'impédance électrochimique. Ils peuvent être tracés en coordonnées cartésiennes dans le plan complexe de Nyquist (ou Côte-Côte) en plaçant les valeurs $\text{Re}(Z)$ ou $\text{Re}(C)$ en abscisse et $-\text{Im}(Z)$ ou $-\text{Im}(C)$ en ordonnée, avec

$$Z_C(\omega) = \frac{1}{j\omega C} \quad \text{et} \quad C = \frac{1}{j\omega(\text{Re}(Z) + j\text{Im}(Z))}.$$

Pour cette représentation (plan complexe), l'angle entre l'abscisse et la courbe décrit la phase du signal, il est donc nécessaire d'utiliser des repères orthonormés pour pouvoir identifier des phénomènes en regardant l'angle (par exemple $\alpha=45^\circ$ correspond à la diffusion d'une espèce redox à la surface et donc d'une impédance de Warburg). La représentation de Bode est une autre façon classique de visualiser les diagrammes. Dans ce cas, le module de l'impédance $|Z|$ et le déphasage φ sont tracés en fonction de la fréquence (représentée en échelle logarithmique). Ces deux visualisations différentes d'un même résultat sont complémentaires. Chacune d'elles montre un aspect particulier du diagramme d'impédance. La représentation de Nyquist permet l'identification visuelle des éléments électriques caractéristiques : les résistances et capacités (ou pseudo-capacités) R_{ci} , R_{ct} , C_{dc} , etc. Par contre, elle comprime la région des hautes fréquences, alors que la représentation de Bode offre la vision complète du domaine de fréquence.

Dans le cadre de nos travaux, nous faisons varier la fréquence f de 200 000 Hz à 0,1 Hz et perturbons le potentiel autour de sa valeur E_0 avec une amplitude $\Delta E = 25\text{mV}$. Nous prenons pour valeur E_0 du potentiel appliqué, 0 V/Ag|Ag⁺ (utilisé comme potentiel de référence en régime non faradique) et $E_{1/2}$ de la sonde redox (en régime faradique). Nous commencerons par aborder l'EIS en régime non faradique.

a. Technique EIS en mode non faradique.

La spectroscopie d'impédance électrochimique en mode non-Faradique permet d'étudier le courant capacitif et le mouvement des charges de surface (Lasia 2014). Dans un premier temps nous présenterons les principes théoriques de l'EIS en mode non faradique nécessaires pour l'exploitation de nos résultats sur les trois étapes de pré-fonctionnalisation correspondant aux surfaces : Au, Au-Ar-SO₃H et Au-Ar-SO₂Cl. Pour ces expériences, nous utilisons le même montage que celui décrit auparavant mais les électrodes plongent cette fois dans un milieu NaCl à 0,15mol/L (sans sonde redox).

i. Comportement électrochimique et profil ionique d'une électrode idéale

En théorie, le comportement électrochimique de l'interface métal|solution d'une électrode nue, plane et idéalement polarisée, peut être décrit électriquement par un condensateur et une résistance en série (R_sC). En effet, lorsqu'un potentiel est imposé au métal, qui devient par exemple globalement chargé positivement, les ions en solution vont s'organiser et s'accumuler au voisinage de l'électrode de manière à compenser parfaitement la charge présente en surface de l'électrode (Figure 17). Cette zone au contact de l'électrode (épaisseur de l'ordre de quelques angströms) où deux plans de charges opposées apparaissent est nommée « double couche » ou « couche de Helmholtz » et s'assimile à un condensateur plan (C_{dc}) dont la capacité varie entre 10 et 80 $\mu\text{F cm}^{-2}$ en fonction du métal et de l'électrolyte utilisé. Au-delà, des ions s'organisent dans la couche diffuse de Gouy-Chapman engendrée par le potentiel résultant de la double couche et le modèle de Gouy-Chapman permet de déterminer leur profil de densité. L'excès de densité de charge en fonction de la distance à l'électrode est ainsi obtenu en considérant l'organisation des charges dans un potentiel (via l'équation de Poisson) et l'agitation thermique du liquide (statistique de Boltzmann à la température T) :

$$\rho(r) = \sum_i^{\text{tous ions}} z_i F C_i \quad \text{où} \quad C_i(r) = C_i^0 \exp(-z_i F \Psi(r)/RT) \text{ en mol/L,}$$

pour les ions de charge $z_i e$ et dans le profil de potentiel $\Psi(r)$ qui est obtenu par l'équation de Poisson-Boltzmann (PB). Elle se simplifie pour un électrolyte binaire et symétrique :

$$\frac{d^2 \varphi(r)}{dr^2} = -4\pi L_B \sum_i^{\text{tous ions}} z_i \rho_i \exp(-z_i \varphi(r)) = \kappa^2 \sinh(\varphi(r))$$

$$\text{où } L_B = e^2 / k_B T 4\pi \epsilon_r \epsilon_0 \quad \text{et} \quad \kappa^{-1} = r_D = \left(\sqrt{k_B T \epsilon_0 \epsilon_r \epsilon_{eau}} / \sqrt{2e^2 N_A} \right) / \sqrt{I},$$

ce qui nous donne pour une solution de NaCl de force ionique égale à $I=0,15\text{M}$ et à température ambiante, une longueur de Bjerrum égale à $L_B= 0,72 \text{ nm}$ et une longueur de Debye $r_D=0,78 \text{ nm}$. En ne considérant qu'un unique plan chargé (théorie de Gouy-Chapman) de potentiel de surface φ_S (en $r=0$), nous obtenons la solution :

$$\tanh(|z_{sel}| \varphi_i(r)/4) = \gamma \exp(r/r_D) \quad \text{où} \quad \gamma = \tanh(\varphi_S/4) \quad \text{et} \quad \sinh(\varphi_S/2) = 2\pi L_B z_{plan} \Sigma r_D$$

Dans l'expression précédente dite de Graham, qui relie le potentiel de surface et la densité de charge de surface Σ (m^{-2}), on reconnaît la longueur de Gouy-Chapman $\lambda_{GC} = s_{charge} / 2\pi L_B$ qui mesure la distance sur laquelle chute le potentiel dans la couche diffuse. On obtient ainsi le potentiel et les profils ioniques en regard de l'électrode :

$$\varphi(r) \equiv \Psi(r) \frac{e}{k_B T} = 2|z_{sel}| \log \left| \frac{1 + \gamma \exp(-r/r_D)}{1 - \gamma \exp(-r/r_D)} \right| \quad \text{et} \quad C_i(r) = C_i^0 \exp(-z_i e \Psi(r)/k_B T).$$

Nous avons tracé, sur la Figure 17, les profils pour un potentiel de surface $\Psi_S = 25$ mV, ce qui correspondrait à une interface chargée de $\sigma_S = 0,0232$ C/m² ou encore à une charge élémentaire tous les $s_{charge} = \Sigma^{-1} = 6,9$ nm², conduisant à une chute du profil sur $\lambda_{GC} \sim 1,5$ nm. En pointillés nous avons tracé le cas d'un potentiel de surface très élevé (180 mV) généré par $s_{charge} = 0,2$ nm², provoquant une chute abrupte du profil ionique sur $\lambda_{GC} \sim 0,05$ nm et des densité de contre-ions gigantesques près de l'électrode.

L'impédance d'un condensateur de capacité C est donnée par l'équation générale :

$$Z_C(\omega) = \frac{1}{j\omega C} \quad \text{avec} \quad C = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{S}{e},$$

où C est la capacité (F), ϵ_r la permittivité relative du diélectrique, ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide (F/m), S l'aire de réaction et e l'épaisseur du diélectrique. Quand le potentiel de surface est très faible ($\ll 25$ mV) à température ambiante et la force ionique faible, nous pouvons utiliser l'approximation de Debye-Hückel (linéariser PB) et approcher la capacité de double couche par l'expression : $C_{dc,DH} = \epsilon_r \epsilon_0 / r_D$. Nous ne sommes pas dans ce cas et estimons la capacité différentielle associée aux profils ioniques introduits ci-dessus en dérivant l'expression de la densité de charge :

$$C = \frac{d\Sigma}{d\Psi_S} \quad \text{où} \quad \Sigma = \frac{\sqrt{8k_B T \epsilon_0 \epsilon_{r,eau} N_A I}}{z_{plan} e} \sinh\left(\frac{e\Psi_S}{2k_B T}\right) \quad \text{soit :} \quad C_{dc,GC} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_{r,eau}}{r_D} \cosh\left(\frac{e\Psi_S}{2k_B T}\right),$$

mais ces modèles ont une limite intrinsèque puisqu'ils considèrent qu'une charge est ponctuelle et peut infiniment s'approcher de l'électrode, ce qui conduit à des capacités surestimées tout comme a des densité d'ions élevées au contact (Figure 17 b pour 180mV). Le modèle de Stern tient compte du montage en série (couche d'Helmholtz et de Gouy-Chapman) et introduit la notion de distance minimale d'approche des ions avec une couche d'ions au contact de l'électrode dont l'épaisseur vaut environ un demi rayon ($r=r_{Stern}$) :

$$C_{dc,Stern} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{GC}} = \frac{r_{Stern}}{\epsilon_0 \epsilon_{r,eau}} + \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon_{r,eau}}{r_D} \cosh\left(\frac{e\Psi_S}{2k_B T}\right) \right)^{-1}.$$

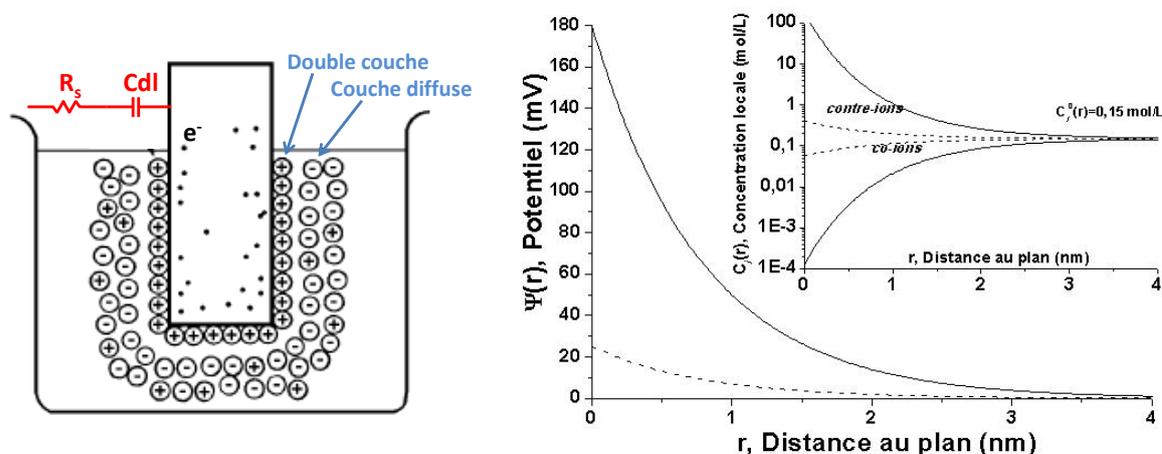


Figure 17 : Schéma illustrant le principe de la double couche d'après Kauffman 1997 (à gauche) avec le circuit électrique équivalent d'une électrode polarisée idéalement. Profils du potentiel électrostatique prédit par la théorie de Poisson-Boltzmann et profil des concentrations en co-ions et contre-ions en face d'une électrode chargée au potentiel de surface $\Psi_s = 25$ mV (traits pleins) ou $\Psi_s = 180$ mV (traits pointillés) dans du NaCl à 0,15M (à droite).

La prise en compte de la couche diffuse (GC) est d'autant plus importante que la force ionique est faible et on retrouve rapidement des valeurs de capacité déterminées par la structure de la couche d'Helmholtz à forte salinité et fort potentiel de surface. Les mesures de capacité obtenues sur une simple électrode nue par EIS sont très dispersées dans la littérature et notamment en raison de limitations propres à la technique liées à l'utilisation de circuits électriques équivalents trop simples, des hypothèses faites pour établir les expressions de la capacité de double couche et d'effets spécifiques au comportement des ions qui sont polarisables et ne se comportent pas comme des charges ponctuelles. Ces aspects sont très discutés dans la littérature et Wang et al. (Wang and Pilon 2012) montre que les mesures EIS de capacité d'électrode nue sont intrinsèquement surestimées à faible force ionique et surestimées à forte force ionique. Les auteurs ont utilisé comme référence un modèle de type "Poisson-Nernst-Planck" (très utilisé pour le transport ionique en solution (Bard and Faulkner 2001) en y ajoutant des effets de taille finie pour les ions. L'erreur intrinsèque de la mesure est moins grande en travaillant à de très faibles potentiels alternatifs ($<0,01$ V) et aux basses fréquences (Macdonald 1953; Macdonald 1971).

Après la capacité d'électrode, vient le reste de la solution où les espèces chargées peuvent diffuser vers la surface de l'électrode suivant un régime résistif ce qui introduit une résistance de solution (R_s), liée à la nature de l'électrolyte et au montage électrique de la cellule électrochimique. Cette impédance est donnée par :

$$Z_{R_s}(\omega) = R_s .$$

Dans le cas idéal, l'impédance de l'électrode idéalement polarisée se présente donc comme une ligne droite verticale dans le diagramme de Nyquist et sa capacitance, comme un demi-cercle (Figure 18).

ii. Comportement électrochimique d'une électrode non idéale

Lorsque l'électrode n'est pas idéale, les diagrammes d'impédance électrochimique montrent souvent une dispersion en fréquence (Figure 18). La droite dans le diagramme de Nyquist est inclinée d'un certain angle par rapport à la verticale. Cette dispersion ne peut être modélisée en considérant un comportement capacitif pur de l'interface. L'impédance d'un tel système va alors être représentée par une ligne de transmission infinie de circuits $R_s C$ en série (Figure 18). Cette fois, la construction du circuit équivalent ne peut pas se faire en utilisant uniquement des composants électriques classiques (R,L,C). Un autre composant spécifique est alors introduit, l'élément à phase constante ou CPE.

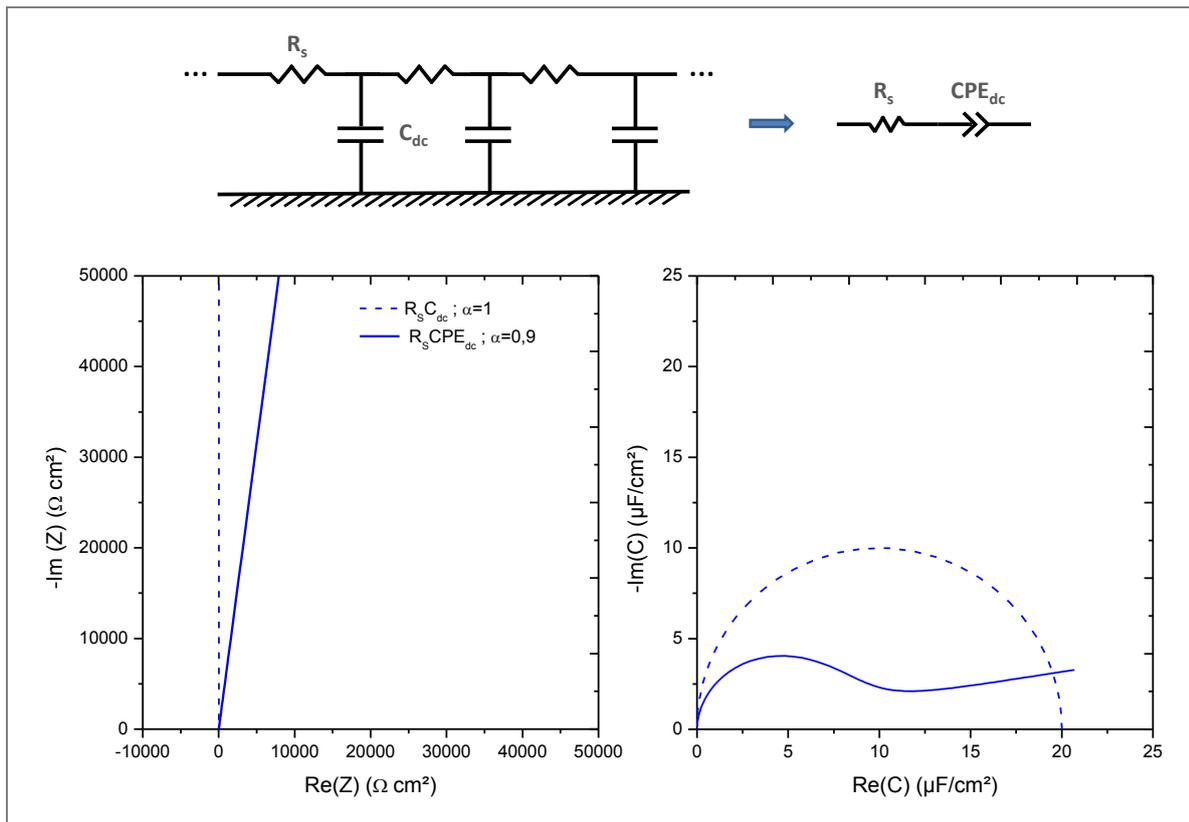


Figure 18 : Représentation schématique du CPE par une ligne de transmission infinie de circuit $R_s C$ en série représentation des spectres EIS dans les diagrammes de Nyquist de l'impédance et de la capacitance selon les modèles $R_s CPE_{dc}$ et $R_s C_{dc}$ (avec $R_s=10\Omega$; $Q = 20\mu\text{F}$; $\alpha = 1$ ou $0,9$)

C'est en utilisant la capacité comme paramètre d'investigation, lors de l'étude de la dispersion et l'adsorption sur les diélectriques, que Cole et Cole (Cole and Cole 1941) ont retrouvé le comportement CPE, décrit dans la littérature comme une dispersion de capacités ou un changement de capacité en fonction de la fréquence (Fricke 1932). Le travail théorique qui en découle considère que le CPE peut être associé à une distribution de capacités à l'interface.

Pour mettre en équation ce phénomène, la littérature propose différentes définitions dont l'une d'elles (Lasia 1999) présente l'impédance d'un CPE comme étant :

$$Z_{\text{CPE}}(\omega) \equiv \text{CPE}_Q = \frac{1}{(j\omega)^\alpha Q} \quad (\text{en } F^{-1} s^{-\alpha} \text{ cm}^2),$$

où Q est une pseudo-capacité exprimée en $F s^{\alpha-1} \text{ cm}^{-2}$ et l'exposant α compris entre 0 et 1 détermine l'angle de phase qui vaut $\alpha\pi/2$, soit l'angle de rotation de la droite purement capacitive dans le plan complexe de Nyquist. Pour certaines valeurs particulières de l'exposant, le CPE peut présenter un comportement analogue aux composants classiquement utilisés dans les circuits équivalents. En effet, si α est proche de 0 le CPE représente une résistance, si α est égal à 1, le comportement est celui d'une capacité pure :

- $\alpha = 1 \Rightarrow \text{CPE}_{dc} = Z_C(\omega) = \frac{1}{j\omega C}, Q = C_{dc}$
- $\alpha = 0 \Rightarrow \text{CPE}_R = Z_R = R_S, Q = 1/R_S$
- $0,5 < \alpha < 1 \Rightarrow Q$: pseudo-capacité
- $0 < \alpha < 0,5 \Rightarrow Q$: pseudo-résistance
- $\alpha = -1 \Rightarrow Q = C_{dc} < 0$, comportement purement inductif

Le cas de figure $\alpha = 0,5 \Rightarrow \text{CPE}_W = Z_W(\omega) = \frac{1}{j\omega W}, Q = W = 1/\sigma\sqrt{2}$ s'utilise pour le mode faradique discuté plus loin (impédance, dite de Warburg, liée à la diffusion d'espèces en solution).

Pour une pseudo-capacité nous pouvons écrire :

Équation 2

$$Z_{\text{CPE}}(\omega) = \frac{Q\omega^\alpha \cos(\alpha\pi/2)}{\sqrt{(Q\omega^\alpha \cos(\alpha\pi/2))^2 + (Q\omega^\alpha \sin(\alpha\pi/2))^2}} - j \frac{Q\omega^\alpha \sin(\alpha\pi/2)}{\sqrt{(Q\omega^\alpha \cos(\alpha\pi/2))^2 + (Q\omega^\alpha \sin(\alpha\pi/2))^2}}.$$

Le fait que le CPE puisse prendre différentes unités et donc significations physiques, en fait un élément très versatile pour ajuster les mesures mais dont la signification physique peut devenir difficile à identifier. La littérature propose un certain nombre de phénomènes physique liés à l'apparition d'un CPE, dont quelques uns que nous citons ici :

- Hétérogénéités et rugosité de surface. D'après Sapoval et al. la rugosité des électrodes peut-être modéliser en utilisant la théorie des fractales, qui donnent un comportement CPE à l'électrode (Sapoval 1995). D'autres travaux plus récents montrent que la dispersion de capacité serait plutôt liée à des hétérogénéités de surface à l'échelle atomique qu'à la rugosité de l'électrode où l'échelle des hétérogénéités est bien plus grande (Kerner and Pajkossy 1998; Kim, Pyun et al. 2003).
- Phénomènes d'adsorption lents. En étudiant l'adsorption d'anions Br^- sur des électrodes d'or monocristallin, Pajkossy et al. (Pajkossy, Wandlowski et al. 1996) ont observé une dispersion de capacités. Cette dispersion peut être attribuée, soit à un phénomène de diffusion ou d'adsorption lents, soit à des transformations au sein de la couche adsorbée ou à la surface du substrat.
- Influence de la distribution du champ électrique. Le courant n'étant pas uniforme à la surface d'une électrode, une distribution de potentiel s'ensuit, le tout étant fonction de la géométrie de l'électrode. Dans le cas d'un disque, Newman J. (Newman 1966) a calculé cette répartition de courant et de potentiel. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une distribution de résistances ohmiques qui dépendent de la fréquence (Newman 1970; Nisancioglu and Newman 1974). C'est cette distribution qui entraîne la dispersion en fréquence et conduit à l'apparition du comportement CPE.

L'apparition du comportement CPE est donc liée à la présence de distributions de constantes de temps : distributions latérales à la surface de l'électrode provenant du champ ainsi que d'adsorptions lentes d'espèces chargées, et distributions normales à la surface comme celles provenant de la rugosité de surface, la porosité ou la variation de composition en profondeur au sein d'un revêtement (Hirschorn, Orazem et al. 2010).

A l'interface métal/tampon salin, la mise en équation du circuit $R_s \text{CPE}_{dc}$ en série conduit à l'impédance totale (Z) et au temps caractéristique du circuit (τ_0) suivants :

Équation 3

$$Z_{R_S \text{ CPE}_{dc}}(\omega) = R_s + \frac{1}{(j\omega)^\alpha Q} = R_s \left[1 + \frac{1}{(j\omega)^\alpha (QR_s)} \right] = R_s \left[1 + \frac{1}{(j\omega\tau_c)^\alpha} \right] \Rightarrow \tau_c = \frac{1}{\omega_{RC}}$$

$$= R_s C_{dc},$$

avec R_s la résistance de solution (Ωcm^2), Q la pseudo-capacité ($F s^{\alpha-1} cm^{-2}$) provenant ici de la double couche ionique et α compris entre 0 et 1. Quand la capacité est pure ($\alpha=1$), le temps caractéristique τ_c correspond à une charge d'environ 63,2% des armatures et la fréquence de coupure (filtre type passe basses fréquences) correspondant à une atténuation de -3dBm vaut $f_c = \omega_{RC}/2\pi = 1/2\pi\tau_c = (2\pi R_s C_{dc})^{-1}$ et correspond au passage de la moitié de la puissance et à une phase de -45° . Dans le cas d'une pseudo-capacité ($0.5 < \alpha < 1$) suite à une distribution des constantes à la surface, nous pouvons retrouver la valeur de la capacité moyenne équivalente pour la double couche (C_{dl}) à partir de Q ajusté pour le modèle (Lasia 2014) :

Équation 4

$$\Rightarrow Q = C_{dc}^\alpha R_s^{-(1-\alpha)} \Rightarrow C_{dc} = Q^{\frac{1}{\alpha}} R_s^{\frac{(1-\alpha)}{\alpha}} \quad (\text{en } F cm^{-2}).$$

La modélisation de l'interface électrode|électrolyte peut encore être améliorée en utilisant un autre circuit électrique équivalent $R_s(R_{ci} \text{ CPE}_{dc})$ qui intègre une résistance au déplacement de la charge ionique vers la surface (que nous choisissons d'appeler R_{ci}) hors passage par les armatures de la capacité (nous parlerons d'un courant de fuite par rapport à la capacité). C'est une évolution du modèle de l'électrode bloquante (idéale) où une résistance R_{ci} est ajoutée en parallèle avec la pseudo-capacité de double couche (Figure 19). Dans la branche parallèle du circuit ($R_{ci} \text{ CPE}_{dc}$), nous voyons ci-dessous que la pulsation de relaxation vaut $\omega_{||} = 1/(R_{ci} Q_{dc})^{1/\alpha}$. On en déduit la valeur de capacité de double couche équivalente dans la branche parallèle :

Équation 5

$$Z_{R_S(R_{ci} \text{ CPE}_{dc})}(\omega) = R_s + \frac{1}{1/Z_{\text{CPE}_{dc}} + 1/R_{ci}} = R_s + \frac{1}{(j\omega)^\alpha Q + 1/R_{ci}}.$$

Pour une capacité pure ($Q=C$) on fait apparaître maintenant deux temps caractéristiques : $\tau_{c1} = R_{ci}C$ et $\tau_{c2} = R_{ci}R_s C/(R_{ci} + R_s)$, soit deux fréquence caractéristiques ($f_c = 1/2\pi\tau_c$). La première fréquence marque la transition dans le circuit parallèle entre un régime "basses fréquences" pour lequel l'impédance est dominée par le terme $1/R_{ci}$ et un régime dominé par le CPE aux plus "hautes fréquences". Sous cette fréquence, le module de l'impédance est constant et vaut $|Z_{R_S(R_{ci} \text{ CPE}_{dc})}| \rightarrow |\log_{10}(R_{ci} + R_s)|$. La seconde fréquence caractéristique à plus haute

fréquence sépare un régime dominé par le circuit parallèle ($R_{ci}CPE_{dc}$) et un régime très hautes fréquences dominé par la résistance de cellule ($|Z_{R_S(R_{ci}CPE_{dc})}| \rightarrow R_S$).

Dans le cas d'un CPE et par analogie, nous déduisons le lien entre la pseudo-capacité Q et la capacité moyenne équivalente de double couche C_{dc} :

Équation 6

$$\Rightarrow Q = C_{dc}^\alpha \left(\frac{1}{R_S} + \frac{1}{R_{ci}} \right)^{(1-\alpha)} \Rightarrow C_{dc} = Q^{\frac{1}{\alpha}} \left(\frac{1}{R_S} + \frac{1}{R_{ci}} \right)^{\frac{(\alpha-1)}{\alpha}} \quad (\text{en } F \text{ cm}^{-2}).$$

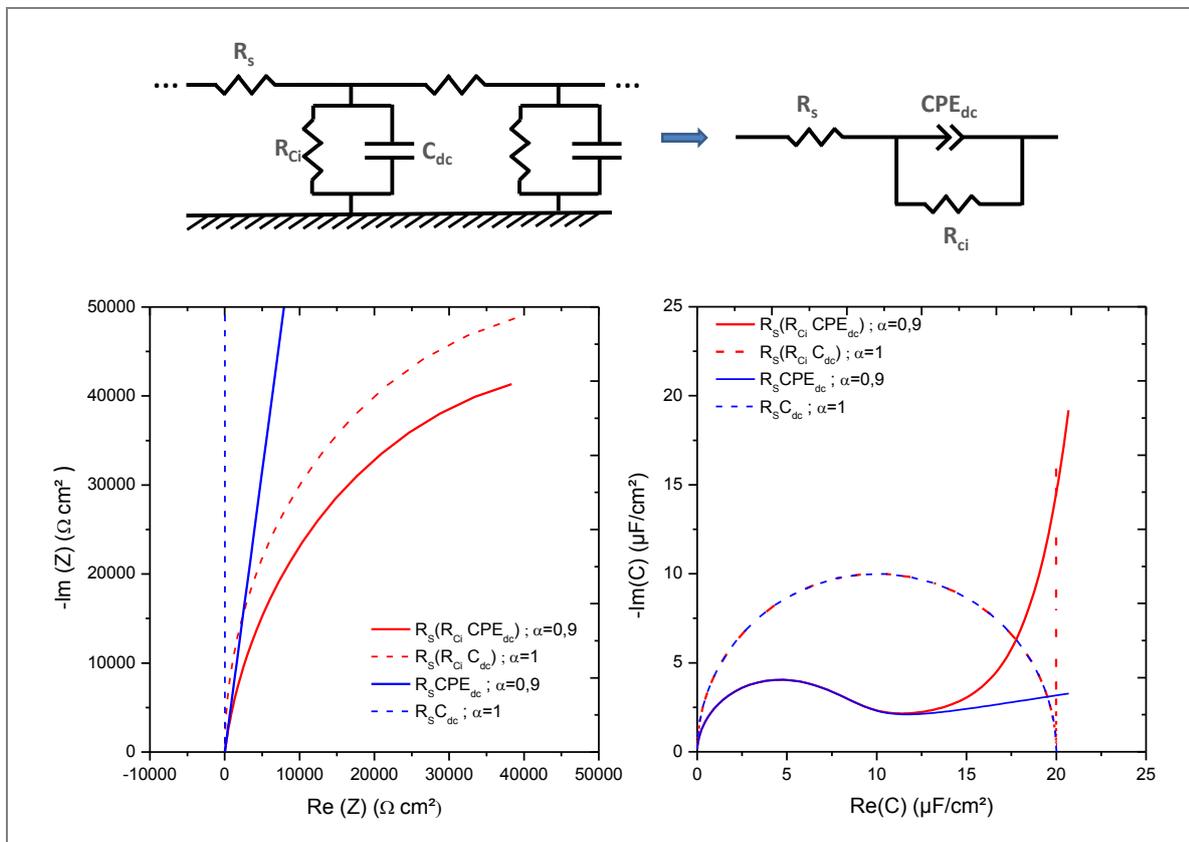


Figure 19 : Représentation schématique du CPE par une ligne de transmission infinie de circuit $R_S(R_{ci}C_{dc})$ en série et représentation des spectres EIS dans les diagrammes de Nyquist de l'impédance et de la capacitance selon les modèles $R_S(R_{ci}CPE_{dc})$ et $R_S(R_{ci}C_{dc})$ (avec $R_S=10\Omega\text{cm}^2$; $Q = 20\mu F\text{cm}^{-2}$ pour $\alpha = 1$ ou $Q = 20\mu F\text{s}^{-0,1}\text{cm}^{-2}$ pour $\alpha = 0,9$; $R_{ci}=10^5\Omega\text{cm}^2$).

Il existe bien d'autres types de circuits équivalents possibles. La manière dont est branché chaque composant ainsi que l'ordre de leur apparition sont importants, pour le calcul de l'impédance et la signification du modèle. Les processus successifs sont branchés en série en commençant par ceux apparaissant aux plus hautes fréquences alors que les processus simultanés sont branchés en parallèle. Par exemple, dans le cas du circuit considéré ici (Figure 20c), seul R_S existe loin de l'interface pour la résistance

ionique de la solution ainsi que celles des câbles qui entrent en jeu dès les hautes fréquences. Proche de l'interface, l'établissement de la double couche et le transfert de charges ioniques s'effectuent simultanément et aux plus basses fréquences. C'est pourquoi le circuit commence par R_s branché en série avec le CPE_{dl} et R_{ci} tous deux connectés en parallèle.

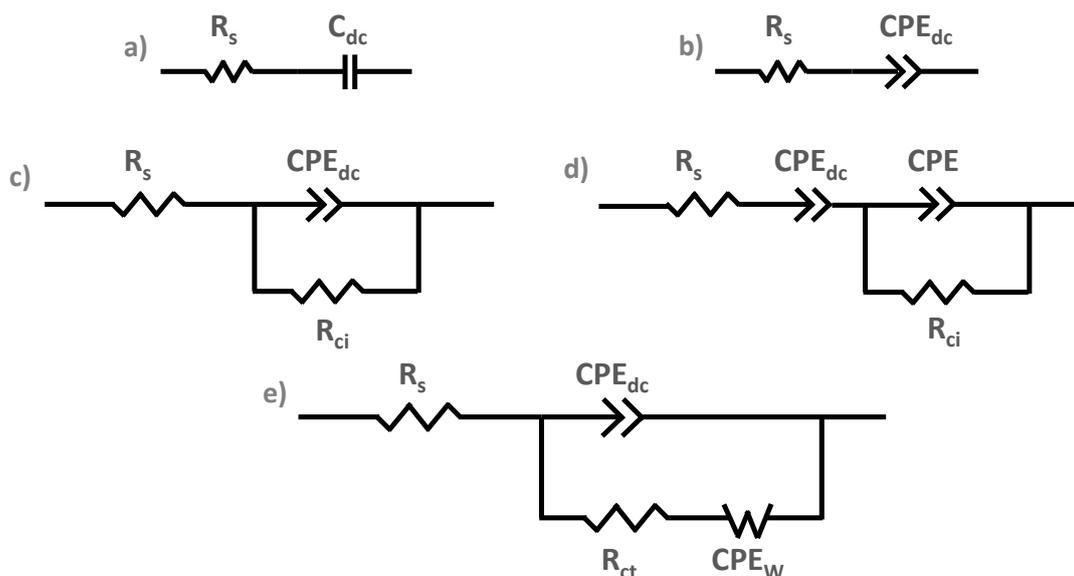


Figure 20 : Schémas des circuits électriques testés

a) électrode bloquante idéalement polarisable, b) électrode bloquante avec comportement CPE, c) avec ajout d'une résistance à la diffusion ionique, e) modèle de Randles.

b. Caractérisation EIS en mode non faradique de la pré-fonctionnalisation

Nous avons présenté les spectres EIS expérimentaux des surfaces : or brut, Au-Ar-SO₃H et Ar-SO₂Cl, dans les diagrammes de Nyquist et de Bode (Figure 21). Ceux-ci sont superposés aux meilleurs ajustements (modèle des moindres carrés discuté ultérieurement) calculés avec le circuit équivalent $R_s(R_{ci} CPE_{dc})$ (Figure 19c).

Ce modèle donne l'impédance complexe $Z(\omega)$ (Équation 4) suivant un jeu de quatre paramètres (la résistance de cellule R_s , la résistance de charge ionique R_{ci} , la pseudo-capacité de l'interface CPE_{dl} et le facteur α que nous commenterons par la suite.

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

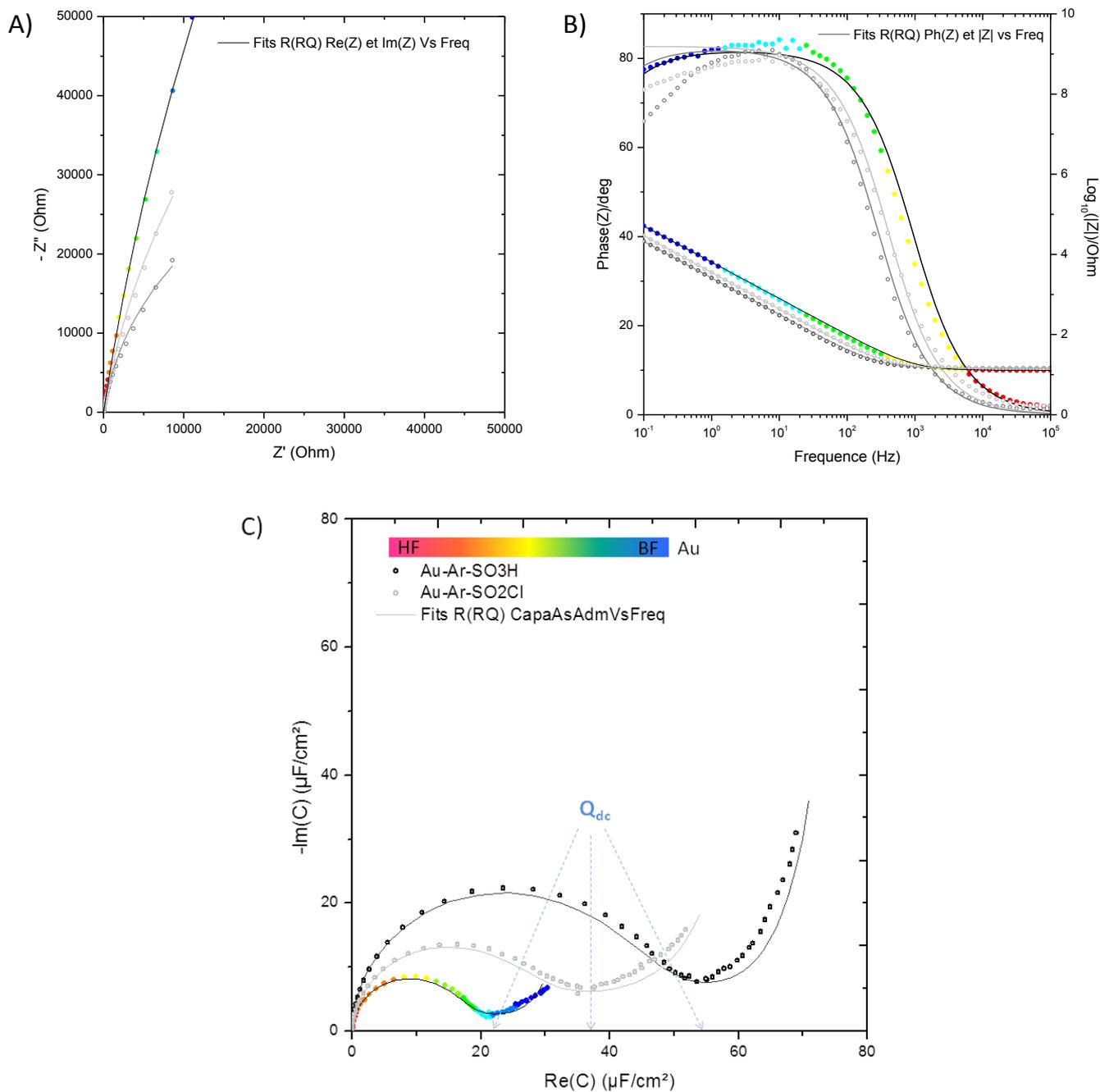


Figure 21 : Données expérimentales EIS sur électrodes d'or, pré-fonctionnalisées Ar-SO₃H et Ar-SO₂Cl en mode non Faradique dans NaCl (0,15M) représentées dans les diagrammes A) de Nyquist en impédance, B) de Bode et C) de Nyquist en capacitance. Ajustements des données dans leur propre représentation par le modèle $R_s(R_dQ_{SAM})$.

L'ajustement des données expérimentales est conduit dans leur propre représentation graphique :

- Sur le diagramme de Nyquist de la Figure 21A, la partie réelle et imaginaire de l'impédance mesurée est ajustées en fonction de la fréquence avec le même jeu de paramètres d'ajustement. Il serait possible d'ajuster chacune de ces deux courbes indépendamment ($\text{Re}(Z)=f(f)$ et $\text{Im}(Z)=f(f)$) mais ceci conduit à deux jeux de paramètres et contraint moins la confrontation de la mesure au modèle.
- Dans la représentation de Bode, nous ajustons simultanément la phase et l'amplitude de l'impédance mesurée en fonction de la fréquence (Figure 21B). De même ajuster ces courbes indépendamment ($-\arg(Z)=f(f)$ et $|Z|=f(f)$) conduit à plus de dispersion sur la détermination des paramètres.
- En représentation Nyquist de la capacitance, on ajuste la partie réelle et imaginaire du complexe C en fonction de la fréquence (Figure 21C).

Pour comparer sur un même graphe ces différentes stratégies d'ajustement, nous avons choisi de représenter les trois ajustements, tous rapportés à la représentation en capacitance (Figure 22). L'ajustement obtenu dans cette représentation (ajustement capacitance en gris) est bien entendu celui qui donne le meilleur accord visuel dans cette représentation et nous pouvons constater que l'ajustement conduit en représentation Nyquist de l'impédance (en bleu) a donné plus de poids aux basses fréquences (aux valeurs élevées de $\text{Re}(C)$) alors que celui conduit en représentation Bode (en rouge) ajuste mieux les hautes fréquences (aux faibles valeurs de $\text{Re}(C)$).

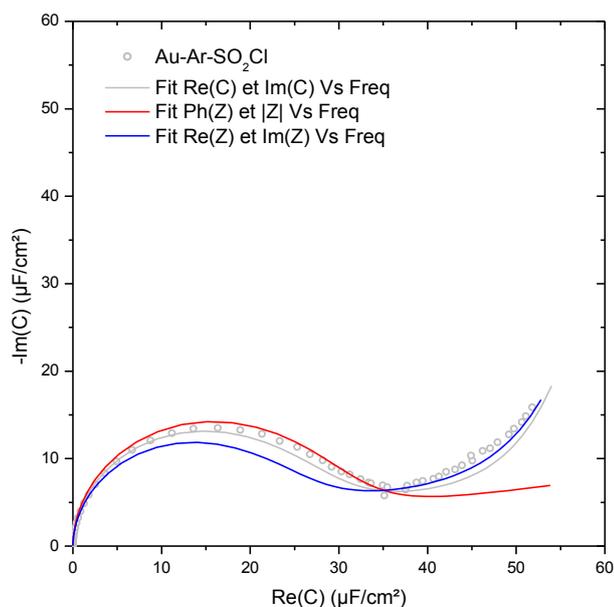


Figure 22 : Superposition des différents ajustements sur la représentation de la capacitance dans le diagramme de Nyquist

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

Les paramètres issus de ces différentes stratégies d'ajustement sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Ensemble des paramètres d'ajustements obtenus dans les différentes représentations EIS et issus du même modèle $R_s(R_{Ci} CPE_{dl})$ et des mêmes données expérimentales (surface Au-Ar-SO₂Cl)

Paramètres d'ajustement (Modèle $R_s(R_{Ci} CPE_{dl})$)	Bode : Phase et $ Z $ vs Fréquence	Nyquist impédance : Re(Z) vs Im(Z) vs Fréquence	Nyquist capacitance : Re(C) et Im(C) vs Fréquence
Ajustement rmse	0,8	0,6	1,8
R_s ($\Omega \text{ cm}^2$)	14	14	14
Q_{dc} ($\mu\text{F s}^{\alpha-1} \text{ cm}^{-2}$)	52	51	52
α_{dc}	0,92	0,89	0,91
R_{Ci} ($\text{k}\Omega \text{ cm}^2$)	184	192	151

La qualité de l'ajustement est désignée par un paramètre rmse (l'erreur standard, « root mean square error » en anglais) qui traduit un meilleur ajustement plus sa valeur est faible.

La comparaison des paramètres de ce tableau montre que les différentes stratégies d'ajustement donnent des résultats similaires même si certaines accordent plus de poids aux hautes ou aux basses fréquences. La littérature représente très souvent l'impédance $Z(\omega)$ dans le diagramme de Nyquist et son module $|Z(\omega)|$ ou sa phase φ dans le diagramme de Bode. En revanche, la représentation Nyquist de la capacitance est peu utilisée mais les travaux EIS de Valincius et al. sur les modèles de membrane harponnées se basent uniquement sur cette représentation puisqu'elle donne directement l'information concernant la capacité de surface. Pour cette raison, nous présenterons principalement les résultats sous forme de la capacitance dans le diagramme de Nyquist et les paramètres discutés sont ceux ajustés dans cette représentation.

Ainsi, nous avons comparé les propriétés électrochimiques des surfaces, de par les paramètres obtenus grâce au modèle $R_s(R_{Ci} CPE_{dc})$ dans la représentation de la capacitance du diagramme de Nyquist (Tableau 2).

*Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-
harpon pour les membranes.*

Tableau 2 : Paramètres d'ajustement des surfaces Au, Au-Ar-SO3H et Au-Ar-SO2Cl (Q : pseudo-capacité, Cdl : capacité de la double couche, Rct et Rs : Résistance de transfert de charge et de cellule) ; fc et τ : fréquences caractéristiques du circuit et temps correspondants.

Modèle	Paramètres d'ajustement. Des paramètres déduits sont en italique	Au	Au-Ar-SO3H	Au-Ar-SO2Cl
Rs(RciCPEdc)	Q (μF s ^{α-1} cm ⁻²)	44	69	52
	C (μF cm ⁻²) [†]	<i>19</i>	<i>40</i>	<i>24</i>
	α	0,91	0,93	0,91
	R _{ci} (kΩ cm ²)	204	55	151
	R _s (Ω cm ²)	6,2	7,9	8,3
	<i>f_{c1} (Hz) ; τ_{c1} (s)</i>	<i>0,014 ; 11,4</i>	<i>0,038 ; 4,2</i>	<i>0,016 ; 9,7</i>
	<i>f_{c2} (Hz) ; τ_{c2} (ms)</i>	<i>1307,2 ; 0,1</i>	<i>495 ; 0,3</i>	<i>800 ; 0,2</i>
Ajustement rmse	1,4	1,5	1,8	

Pour ces trois surfaces, la fréquence caractéristique du circuit parallèle, $f_{c1} = 1/(R_{ci}Q_{dc})^{1/\alpha}2\pi$, apparait à des fréquences plus basses que celles que nous mesurons ($f_{c1} < 0,1$ Hz). Aux plus basses fréquences utilisées, la capacité d'interface ne se charge pas complètement au cours d'un cycle et le circuit n'atteint pas le régime purement résistif aux basses fréquences avec $|Z_{Tot}| \rightarrow |R_{ci} + R_s|$. Notre gamme de mesure commence après ce plateau d'impédance, où prend place une chute du module de l'impédance alors que sa phase atteint $\alpha\pi/2$ (~82 à 84° ici, Figure 20 b). A plus haute fréquence, nous mesurons par contre très précisément la transition à $f_{c2} = 1/(R_{ci}R_sQ/(R_{ci} + R_s))^{1/\alpha}2\pi$ (ici entre 495 et 1307Hz), qui marque le passage au régime purement résistif de la cellule ($|Z_{Tot}| \rightarrow |R_s|$ où sa phase s'annule).

Suite aux ajustements sur les paramètres R_s , Q , R_{ci} , et α , nous pouvons constater que le courant de fuite passant par R_{ci} (ions ne participant pas à la charge des armatures de la capacité) est ici suffisamment faible pour que l'estimation de la capacité moyenne équivalente (C_{dc}) obtenue à partir de Q suivant l'Équation 6 (circuit $R_s(R_{ci}CPE)$) soit équivalente à celle obtenue par l'équation 3 (simple circuit R_sCPE). Nous remarquons que l'électrode d'or brute présente la plus faible capacité de double

[†] Rappel du calcul de la capacité de double couche : Équation 4

couche avec $\sim 20 \mu\text{F cm}^{-2}$ (valeur attendue pour un métal nu d'électrode plane 10 à $60 \mu\text{F cm}^{-2}$, ex : $C_{\text{Pt}} = 40 \mu\text{F cm}^{-2}$ d'après le Handbook ; $C_{\text{Au}} \sim 10 \mu\text{F cm}^{-2}$ d'après McGillivray 2007). Celle-ci augmente avec l'ajout de la couche organique puisque $Q_{\text{Au}} = Q_{\text{dc}}$ est remplacé par $Q_{\text{Au-ArX}} = 1/(Q_{\text{Ar}}^{-1} + Q_{\text{X}}^{-1} + Q_{\text{dc}}^{-1})$ (Wang and Pilon 2012). La plus forte capacité est atteinte pour la surface Au-Ar-SO₃H ($C \sim 40,7 \mu\text{F cm}^{-2}$) et la surface Au-Ar-SO₂Cl présente une valeur plus proche de l'or avec $24,1 \mu\text{F cm}^{-2}$. Cette évolution de la capacité d'interface, qui inclue celle de la double couche ionique, dénote une meilleure aptitude de la surface à accumuler les charges en regard. La couche organique Ar-SO₃H formée en milieu neutre (pH \sim 7) est la plus hydrophile et est globalement chargée négativement (pKa \sim 3,24 (Chen, Zhang et al. 2008)). Celle-ci va mieux organiser l'eau et accumuler les ions, sur les armatures d'une bonne capacité (forte valeur de Q). L'analyse EIS est bien sensible au changement d'état de surface lié au passage de la couche Ar-SO₃H à la couche moins hydrophile et moins chargée Ar-SO₂Cl. Dans la branche parallèle du circuit équivalent, nous pouvons considérer qu'une faible résistance R_{ci} correspond à plus de courants de fuite et donc à moins d'ions participant en parallèle à la capacité d'interface. Plus hydrophobe, l'or nu présente la plus forte résistance R_{ci} , c'est-à-dire le moins de courants de fuite en parallèle de la pseudo-capacité. C'est l'interface pour laquelle la fraction d'ions participant à la capacité d'interface est la plus grande et, en l'occurrence, sous forme d'une distribution en double couche ionique.

Sur l'or nu, nous mesurons une capacité moyenne de double couche équivalente de $C_{\text{dl}} = 19,7 \mu\text{F.cm}^{-2}$ (pour $Q = 44,67 \mu\text{F.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Dans le cas d'une fonctionnalisation organique homogène par-dessus (ici Au-ArX et X = SO₂Cl ou SO₃H), on empile en série des strates supplémentaires de constante diélectriques et épaisseurs différentes et la capacité totale s'obtient avec :

$$(C_{\text{tot}})^{-1} = (C_{\text{AuArX}})^{-1} + (C_{\text{dl}})^{-1}.$$

Nous voyons que pour $C_{\text{tot}} = 24,1$ ou $40,7 \mu\text{F.cm}^{-2}$, aucune valeur positive de C_{AuArX} ne permettra d'avoir une valeur de capacité de double couche ionique (C_{dc}) dans la gamme généralement observée dans la littérature (10 à $80 \mu\text{F cm}^{-2}$).

En supposant un montage en parallèle des capacités à l'interface, soit avec des zones recouvertes par AuArX et sa double couche ionique (C_{dlX}) et d'autres zones nues ne présentant qu'une double couche ionique (C_{dl}), avec des fractions de surface apparente recouverte égales à ϕ et de $(1-\phi)$, respectivement, nous obtenons (Parsons 1959):

$$C_{\text{tot}} = (\phi) \frac{1}{(C_{\text{AuArX}})^{-1} + (C_{\text{dlX}})^{-1}} + (1 - \phi)C_{\text{dl}} \quad \text{où} \quad C_{\text{AuArX}} = \epsilon_0 \epsilon_r \text{AuArX} \cdot \frac{S_{\text{AuArX}}}{d_{\text{AuArX}}}$$

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

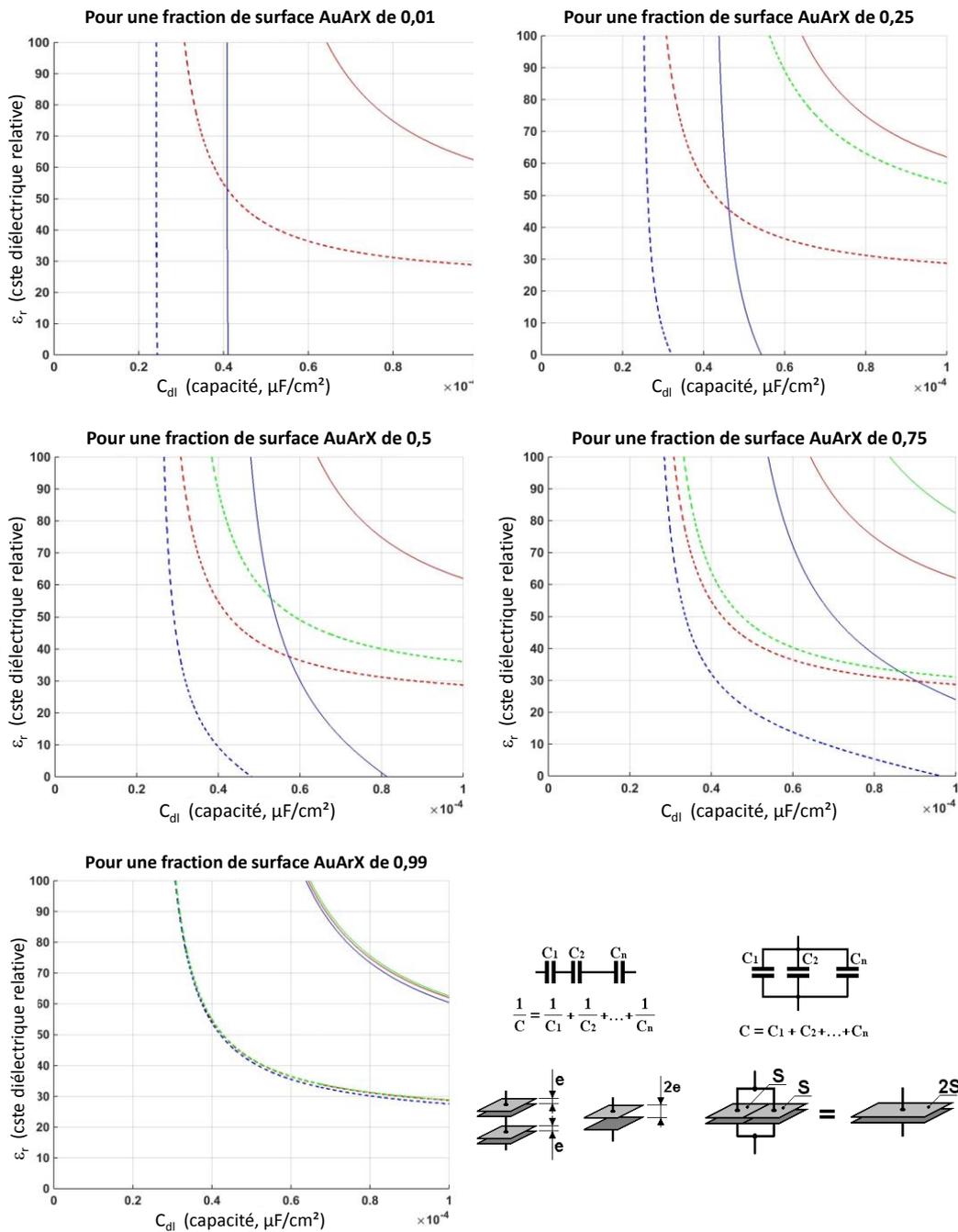


Figure 23 : Courbes de correspondance entre les valeurs de capacité des zones nues (C_{dl}) et les valeurs de constante diélectrique des zones pré-fonctionnalisées (ϵ_r) calculées à différentes fraction de surface fonctionnalisée (de 0,01 à 0,99)

Hypothèses du calcul des courbes présentées dans le texte ci-dessous

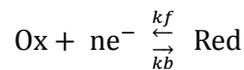
Le greffon $-\text{ArSO}_2\text{Cl}$ mesure environ $d_{\text{ArSO}_2\text{Cl}} = 0,8\text{nm}$ (par microscopie à force atomique et est estimé à $0,7\text{nm}$ par mécanique moléculaire, logiciel Avogadro (Esnault, Thèse 2012)). On s'attend à une taille comparable pour $-\text{ArSO}_3\text{H}$ et une densité de

greffage identique. Afin d'estimer des valeurs de $\epsilon_{r,AuArSO_2Cl}$ et $\epsilon_{r,AuArSO_3H}$, qui sont liées à celles de C_{dlX} et C_{dl} dans ce modèle, nous avons tracé sur la Figure 23 les solutions possibles suivant trois hypothèse : **i)** En parallèle et en supposant que $C_{dlX} = C_{dl}$, c'est-à-dire que les doubles couches au dessus du greffage et au dessus des zones nues se comportent à l'identique (traits bleus, pleins pour $-SO_3H$ et hachurés pour $-SO_2Cl$) ; **ii)** En parallèle et en supposant seulement que la double couche sur les zones sans greffage se comporte comme sur l'or nu ($C_{dl} = C_{dl,Au} = 19,7\mu F/cm^2$) mais est différente de celle au dessus du greffage (traits verts). Plusieurs calculs sont présentés en fonction de la fraction de couverture apparente ϕ ; **iii)** En série soit pour une couche complète, le calcul devient indépendant du taux de couverture et est tout de même tracé sur toutes les figures en rouge. Il donne la correspondance : ϵ_r et C_{dl} .

Nous voyons par exemple sur la Figure 23 e), que pour un greffage de 99% de la surface tous les calculs se rejoignent (soit pratiquement sans l'apport en parallèle de C_{dl}), les valeurs de $\epsilon_{r,AuArX}$ comprises entre 40 et 80 correspondraient à une valeur de C_{dl} entre 30 et 50 $\mu F/cm^2$ ce qui semble élevé. En réduisant le taux de greffage suivant les hypothèses en parallèle, on réconcilie les valeurs de $\epsilon_{r,AuArX}$ possibles avec une capacité de double couche dans la gamme de 25 à 35 $\mu F/cm^2$ proche de celle mesurée sur l'or ($C_{dl,Au} = 19,7\mu F/cm$). De même, la constante diélectrique relative des greffons difficile à estimer, peut alors atteindre des valeurs plus faibles que celle de l'eau salée ($\epsilon_r = \epsilon/\epsilon_0 \sim 78.5$ pour NaCl à 0,15M (Gavish and Promislow 2012))

c. Technique EIS en mode Faradique (utilisation d'une sonde redox)

Dans le cas de l'utilisation d'une sonde redox en solution, la mesure d'impédance génère des réactions d'oxydoréduction (processus faradiques). En considérant l'équation suivante



deux cas sont à prendre en considération : soit la cinétique de réaction est strictement contrôlée par le transfert de charge, soit elle est de type activation-diffusion avec un contrôle de diffusion discuté ci-dessous. Dans le cas où la cinétique de réaction est limitée uniquement par le transfert de charge, l'impédance mesurée est :

$$Z_{Rct}(\omega) = R_{ct} = RT/nFi_0$$

où la résistance de transfert de charge suit l'inverse du courant de charges (i_0).

Si la cinétique est contrôlée par un processus d'activation-diffusion, il faut prendre en compte le courant lié au phénomène de relaxation des éléments actifs dans la

couche de diffusion en plus du courant faradique. L'impédance de diffusion est connue sous le nom d'impédance de Warburg ($Z_W = Z_{W,Ox} + Z_{W,Red}$). Il s'agit du cas où le CPE se définit par $\alpha = 0,5$ et $Q=W$. Dans l'hypothèse où la couche de diffusion est considérée comme semi-infinie et que la concentration de surface des espèces en solution suit l'équation de Nernst : $C_{Ox}(0)/C_{Red}(0) = \exp(nF(E - E^0))$, l'impédance de Warburg (ou l'impédance de transfert de masse) prend la forme suivante (Gabrielli 1998).

$$Z_W(\omega) = \frac{1}{\sqrt{j\omega} W} = \frac{\sigma\sqrt{2}}{\sqrt{j\omega}} = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1 - j) \quad \text{avec} \quad \frac{1}{\sqrt{j}} = \frac{1}{\sqrt{2}}(1 - j) \quad \text{et} \quad \frac{1}{W} = \sigma\sqrt{2}$$

$$\sigma = \sigma_{Ox} + \sigma_{Red} = \frac{RT}{\sqrt{2} n^2 F^2 S} \left[\frac{1}{\sqrt{D_{Ox} C_{Ox}(0)}} + \frac{1}{\sqrt{D_{Red} C_{Red}(0)}} \right]$$

Ici, σ est le coefficient de transfert de masse ($\Omega \text{ s}^{-1/2} \text{ cm}^2$), R représente la constante molaire des gaz ($8,314621 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T la température ($295,15 \text{ K}$), n le nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction, F la constante de Faraday ($96485,33289 \text{ C mol}^{-1}$), S la surface de l'électrode (cm^2), $C_{Ox}(0)$ et $C_{Red}(0)$ sont les concentrations initiales en solution des espèces appartenant au couple redox (mol/cm^3), D_{Ox} et D_{Red} sont leurs coefficients de diffusion respectifs ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

En présence d'un couple redox, lorsqu'un potentiel est appliqué à l'interface d'une électrode non idéale, deux phénomènes non faradiques (courant capacitif et double couche d'Helmholtz) et faradiques (transfert électronique et diffusion en solution) ont lieu en parallèle (Figure 24). L'établissement de la double couche d'Helmholtz (CPE_{dc}) et le transfert de charge (R_{ct}) s'effectuent simultanément. Par contre, il est nécessaire que l'espèce active ait accès à la surface de l'électrode pour que la réaction d'oxydoréduction se produise. Pour cette raison, la diffusion et le transfert de charges s'effectuent simultanément ($Z_{Faradique} = CPE_W + R_{ct}$). Dans un circuit électrique équivalent, les deux éléments CPE_W et R_{ct} sont branchés en série, le tout étant connecté en parallèle avec CPE_{dc} . L'ensemble peut être résumé par le circuit dit de « Randles » de la Figure 20e. La mise en équation de l'impédance totale de ce circuit est

$$Z_{Randles}(\omega) = Z_S + \frac{1}{\frac{1}{CPE_{dc}} + \frac{1}{Z_W + Z_{Rct}}}$$

L'impédance totale dans un diagramme de Nyquist présente un demi-cercle aux hautes fréquences (parfait dans le cas d'une capacité et ici aplati dans le cas d'un CPE) et une droite inclinée à 45° aux basses fréquences représentant la diffusion de Warburg (Figure 24).

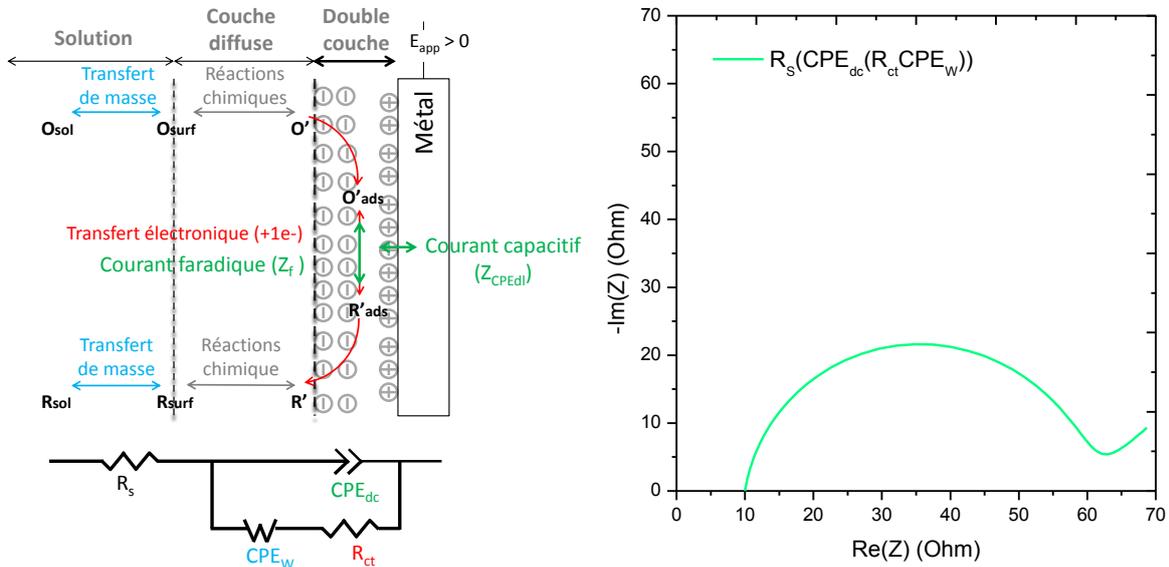


Figure 24 : Circuit équivalent théorique de l'interface Au/solution faradique $R_s(CPE_{dc}(R_{ct}CPE_w))$ et représentation de l'impédance dans le diagramme de Nyquist (avec $R_s=10\Omega$; $Q_{dc} = 200\mu F$; $\alpha_{dc} = 0,9$; $Q_w=0,005$; $\alpha_w = 0,5$; $R_{ct}=50$)

d. Caractérisation EIS en mode faradique de la pré-fonctionnalisation

La mesure EIS en mode faradique doit s'effectuer en appliquant un potentiel dit $E_{1/2}$. Avant une mesure EIS, $E_{1/2}$ doit être déterminé par CV. Ce potentiel est la somme $(E_a+E_c)/2$, or dans le cas d'un système réversible le courant anodique (d'oxydation) est égal au courant cathodique (de réduction). Ainsi, à ce potentiel, il y a autant d'oxydation que de réduction, d'où l'introduction en quantité équimolaire de la sonde redox au degré d'oxydation II et III (permet de conserver une même quantité d'espèce oxydée et réduite à la surface de l'électrode). Dans notre cas, $E_{1/2} \sim 0,2V$ (Figure 16). Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites pour la CV (même cellule et solution faradique avec le couple redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ pour sonde).

Les spectres EIS des trois surfaces : l'or, la couche organique avant et après activation (Au-Ar-SO₃H et Au-Ar-SO₂Cl) sont présentés Figure 25. L'apogée du demi-cercle aux hautes fréquences (vers la gauche) marque la première pulsation caractéristique du circuit ($\omega_{c1} = 1/(R_{ct}C_{dc})^{1/\alpha}$) et le régime où le transfert de charges (courant) à l'électrode vient de la variation de tension et est bien contrôlé par la cinétique de réaction alors qu'aux basses fréquences (vers la droite), le courant est limité par la vitesse de diffusion des espèces actives (régime de Warburg où la pente de $-Im(Z)$ versus $Re(Z)$ vaut 1).

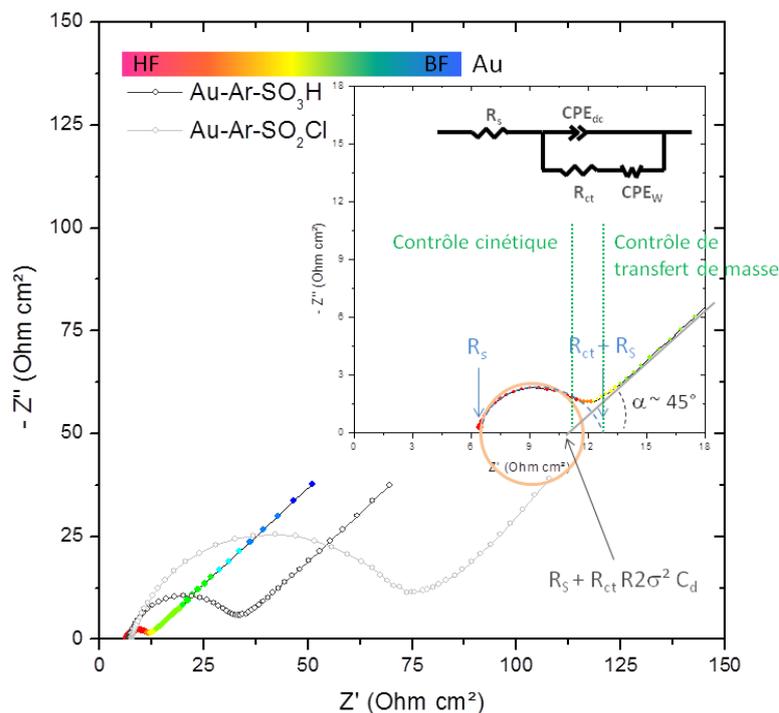


Figure 25 : Diagramme Nyquist d'impédance électrochimique en mode Faradique sur électrodes d'or et pré-fonctionnalisées Ar-SO₃H et Ar-SO₂Cl dans NaCl (0,15 mol/L) contenant 5 mol/L du couple [Fe(Cn)₆]^{3-/4-}.

Les paramètres d'ajustement obtenus grâce au modèle $R_s(CPE_{dc}(R_{ct} CPE_w))$ sont Q , α , σ , α_w , R_{ct} et R_s . Leurs valeurs sont présentées dans le Tableau 2, ainsi que d'autres grandeurs qui en découlent notées en italique. La forme légèrement aplatie du demi-cercle des moyennes fréquences (insert Figure 25), montre que l'interface se comporte comme une pseudo-capacité avec α_{SAM} égal à 0,89 (une capacité pure donne un demi-cercle parfait avec $\alpha_{dc}=1$). Cette valeur concorde avec la rugosité et les inhomogénéités de surface attendues pour une électrode d'or polie manuellement. La résistance de surface attendues pour une électrode d'or polie manuellement. La résistance de cellule, qui se lit sur l'axe des abscisses au démarrage des courbes, n'évolue que très peu quelque soit la surface, car elle dépend essentiellement de la solution et cellule électrochimique (les valeurs de R_s ne seront plus commentées). La résistance de transfert de charge, R_{ct} , traduit le transfert électronique entre l'électrode et la sonde redox qui dépend de l'interface et de la facilité pour la sonde redox d'approcher la surface. Ainsi, nous remarquons sur l'électrode d'or, que $R_{ct} < 10 \Omega \text{ cm}^2$ ce qui est très faible et atteste de la propreté de l'interface nettoyée (électrode millimétrique d'or polie, voir Annexe : Protocole de nettoyage des électrodes). Nous pouvons en déduire la constante cinétique hétérogène apparente pour le transfert électronique du couple [Fe(Cn)₆]^{3-/4-} avec :

$$k_{RedOx,app} = \frac{RT}{n^2 F^2 S} \frac{1}{C_{RedOx} R_{ct}}.$$

*CH. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-
harpon pour les membranes.*

Pour l'or nu, nous obtenons : $k_{RedOx,app} = 0,011 \text{ cm/s}$, valeur cohérente avec celle obtenue par Umadevi et al. ((Umadevi, Ganesh et al. 2014) ; $k_{RedOx,app} = 0,015 \text{ cm/s}$ pour $R_{ct} = 17,63 \Omega \text{cm}^2$) sur une surface d'ITO avec la même sonde mais cinq fois plus diluée et en présence de NaCl moins concentré (0,1M au lieu de 0,15 dans notre cas).

Tableau 3 : Paramètres d'ajustement des surfaces Au, Au-Ar-SO₃H et Au-Ar-SO₂Cl (Q : pseudo-capacité, R_{ct} et R_s : Résistance de transfert de charge et de cellule, σ : transfert de masse)

Modèle	Paramètres d'ajustement. Des paramètres déduits sont en italique	Au (deux séries de mesures indépendantes)	Au-Ar-SO ₃ H	Au-Ar-SO ₂ Cl
R _s (CPE _{dc} (R _{ct} CPE _w))	Q ($\mu\text{F s}^{\alpha-1} \text{cm}^{-2}$)	235	420	405
	α	0,89	0,88	0,85
	σ ($\Omega \text{s}^{-0,5} \text{cm}^2$)	12	12	13
	D_{RedOx} ($10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)	37	38	29
	α_w	0,50	0,50	0,43
	R _{ct} (Ωcm^2)	5	24	62
	$k_{RedOx,app}$ (cms^{-1})	<i>0,01</i>	<i>0,002</i>	<i>8,5.10⁻⁴</i>
	ϕ_{AuArX} (%)	<i>100</i>	<i>78</i>	<i>91</i>
	R _s (Ωcm^2)	6	7	8
	f_{c1} (Hz) ; τ_{c1} (s)	<i>291 ; 5.10⁻⁴</i>	<i>29 ; 0,005</i>	<i>12 ; 0,01</i>
	f_D (Hz) ; τ_D (s)	<i>2 ; 0,07</i>	<i>2 ; 0,08</i>	<i>0,02 ; 10</i>

Pour la surface Au-Ar-SO₃H, nous constatons l'augmentation de R_{ct} (~ 25 Ωcm^2 , soit une diminution de $k_{RedOx,app}$) liée au changement d'interaction entre la sonde et l'interface, effet identifié et décrit précédemment par CV. La couche organique de pré-fonctionnalisation a donc légèrement passivé l'électrode pour cette sonde. La valeur de $\alpha = 0,88$ est proche de celle de l'or nettoyé, ce qui témoigne d'une bonne homogénéité de la modification de surface. D'autre part, le paramètre α_w très proche de 0,5 (comme

pour l'électrode d'or brut) montre que la diffusion des espèces est bien linéaire avec le champ, c'est-à-dire qu'à faible fréquence, par exemple, toutes les espèces proches de l'électrode sont consommées, il faut donc attendre que celles de la solution diffusent pour de nouveau oxyder/réduire.

Pour la surface Au-Ar-SO₂Cl, la résistance de transfert de charge a davantage augmenté ($R_{ct} \sim 62 \Omega \text{ cm}^2$) montrant un changement d'interaction entre la sonde et la surface. Nous pouvons donc supposer que la modification de la chimie de surface est bien efficace. De plus, le paramètre α_w dévie de 0,5 en diminuant, ce qui signifie que la diffusion vers la surface est plus résistive qu'auparavant (Bisquert and Compte 2001). Dans ce cas nous comprenons que l'espèce redox a plus de mal à diffuser vers l'électrode, ce qui est probablement lié au caractère plus hydrophobe de ArSO₂Cl. Pour des greffages très isolants, il est courant d'assimiler le pic d'intensité des CV et la résistance de transfert de charge mesurée en régime Faradique à la présence de zones d'or nu. Dans ce cas la fraction de surface couverte apparente est obtenue par comparaison avec l'or nu suivant la formule : $\phi_{AuArX} = 1 - R_{ct,Au}/R_{ct,AuArX}$ et la fraction d'or nu apparent est $\phi_{Au} = 1 - \phi_{AuArX}$. Avec ces mesures complétées par d'autres nous avons obtenu $\phi_{AuArSO_3H} = 0,78$ à 0,3 et $\phi_{AuArSO_2Cl} = 0,91$ à 0,7, ce qui indiquerait une bonne couverture de surface, en accord avec le reste des résultats. Bien qu'on s'attendait à une valeur plus faible pour -SO₂Cl qui se construit sur -SO₃H, il faut considérer que leur pouvoir bloquant au transfert de charge n'est pas égal et que le transfert électronique peut aussi se faire par exemple sur une zone fonctionnalisée -SO₂Cl, ce qui n'est pas étonnant pour de si petites molécules comportant un cycle aromatique assez "conducteur".

Les courbes EIS mesurées sur l'or nu sont proches de celles obtenues par Janek et al. (Janek, Fawcett et al. 1998), utilisant la même sonde mais cinq fois plus diluée et un autre sel (Na⁺ClO₄⁻ à 0,5M). Nous mesurons par contre une valeur de σ dix fois plus faible ($\sigma_{Au,Janek} = 133 \Omega \text{ s}^{-0,5} \text{ cm}^2$), ce qui conduit à une nette augmentation du coefficient de diffusion apparent des espèces redox. En supposant que les concentrations et coefficients de diffusions à l'électrode sont proches de ceux du volume (Bard and Faulkner 2001) :

$$D = \left(\frac{\sqrt{2}RT}{n^2 F^2 S} \frac{1}{C \sigma} \right)^2 \quad \text{où} \quad \sigma = \sigma_{Ox} + \sigma_{Red} .$$

Avec une concentration de 5mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} dans NaCl à 0,15M, nous obtenons pour l'or nu une impédance de Warburg de $\sigma = 12,21 \Omega \text{ s}^{-0,5} \text{ cm}^2$, soit un coefficient de diffusion $D = 37,28 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Des valeurs trouvées dans la littérature pour le couple Red-Ox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} sont de $D_{Ox} = 7,63 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ et $D_{Red} = 6,32 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Hu, Karweik et al. 1985; Janek, Fawcett et al. 1998) mais elles dépendent de la nature du sel et de sa

concentration. Nous constatons que la diffusion du couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ près de l'interface est peu affectée par la nature de nos pré-fonctionnalisations, ce qui était attendu.

La surface ainsi modifiée (rappel du schéma réactionnel complet en Figure 9) a été utilisée par la suite pour le suivi par QCM de l'immobilisation des oligomères (Brij58 et PEO₉-CH₃) sur la surface et l'étude de cette fonctionnalisation « harpon » par voltampérométrie cyclique et par impédance électrochimique.

e. Conclusion sur les mesure EIS en mode non-Faradique et Faradique

Les mesures EIS en mode non faradique permettant d'accéder à la proportion des ions impliqués dans un comportement capacitif ou dans des courants de fuite purement résistifs (via C et R_{ci}) et elles se sont montrées sensibles au changement d'état de surface lors de la pré-fonctionnalisation. Ainsi, la surface la plus hydrophile Au-Ar-SO₃H accumule mieux les ions sur les armatures de la capacité d'interface, que la surface Au-Ar-SO₂Cl, par contre c'est celle qui a en proportion le moins d'ions y participant. Ces mesures ont aussi permis d'approcher les valeurs de constantes diélectriques ainsi qu'un taux de couverture de ces surfaces. La correspondance entre les constantes diélectriques organique et la capacité d'interface indique aux forts taux de couverture un comportement similaire des zones d'or nus et pré-fonctionnalisées de l'électrode ($C_{dlX} = C_{dl}$) mais une constante diélectrique élevée de la monocouche. Dans l'hypothèse d'un taux de pré-fonctionnalisation faible de la surface, peu compatible avec nos autres observations, la monocouche peut prendre des valeurs faibles de sa constante diélectrique. Ajouté à cela, les mesures en mode faradique ont montré des changements d'interactions spectaculaires entre la sonde redox et l'interface, en termes de diffusion et de résistance aux transferts de charge. La cinétique de diffusion de la sonde est plus lente sur la surface Ar-SO₂Cl au caractère plus hydrophobe (R_{ct} = 62 Ω cm²). Cette grandeur, qui peut être reliée à la présence de zones d'or nu, montre que le taux de couverture de la fonction Ar-SO₂Cl se situe entre 70 et 90%. Ces deux modes de mesure ont mis en évidence des comportements très différents entre les surfaces Au, Au-Ar-SO₃H, Au-Ar-SO₂Cl permettant de valider les étapes de pré-fonctionnalisation (ici sur or et transformation de la couche Ar-SO₃H en Ar-SO₂Cl) et ont montré que la couche organique obtenue est homogène et dense. D'autre part, les propriétés de surface (capacités, constantes diélectriques, constantes cinétiques) sont du même ordre de grandeur que celles documentées dans la littérature.

C. Sur-greffage des terminaisons -OH des blocs hydrophiles des tensio-actifs commerciaux

Dans la suite, nous étudions la réactivité de la pré-fonctionnalisation de surface Au-Ar-SO₂Cl pour le sur-greffage d'oligomères hydrophiles et amphiphile commerciaux *via* la fonction -OH qui termine nombre de ces molécules de type PEO (molécules CH₃-PEO₉-OH, ...) et Brij.

1. Fonctionnalisation purement hydrophile (sur-greffage PEO_n-OH) et fonctionnalisation pour l'ancrage des membranes (sur-greffage des Brij).

a. Choix de la molécule ancre(hydrophile)-harpon(hydrophobe)

Nous avons porté notre choix sur les tensio-actifs Brij (ou polyéthylène glycol hexadécyle éther) commerciaux (Figure 26) qui sont particulièrement peu chers (Brij 58 à 250 €/kg), peu réactifs et présentant une unique fonction hydroxyle terminale. Nous avons utilisé le Brij58 ayant une chaîne PEO de 20 monomères et un harpon hydrophobe de type alkyl à 16 carbones, en raison des considérations discutées au chapitre I.

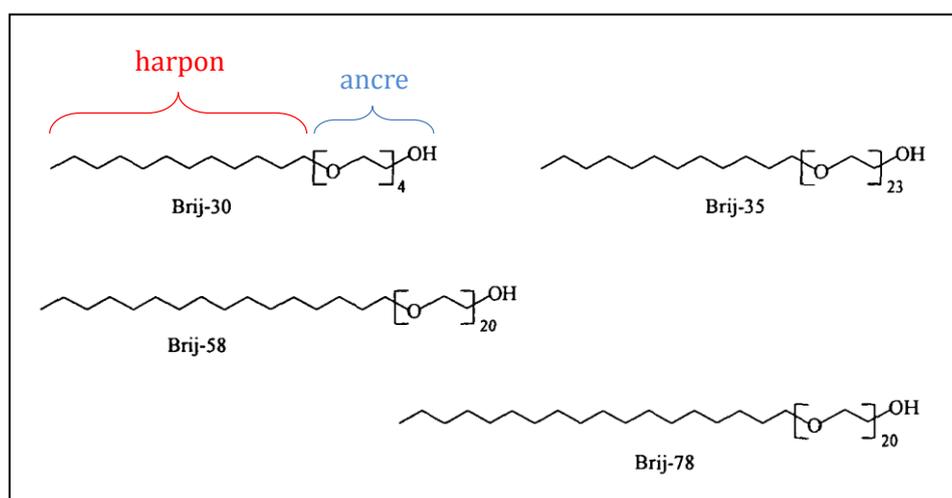


Figure 26 : Formules chimiques de quelques molécules tensio-actives Brij

b. Choix du cousin hydrophile

Pour assurer la présence d'une couche d'hydratation entre la surface et la bicouche, nous avons sélectionné différentes longueurs de brin PEO_n (n=9 et 23) dont le rôle est de combler les espaces entre molécules ancre-harpon et assurer la fluidité de la membrane. La bibliographie traitant de ce choix a été discutée au chapitre I et

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

converge vers des nombres autour de 17 monomères (Hertrich, Stetter et al. 2014) pour que la couche joue son rôle d'anti-adhésion aux membranes.

L'apport d'oligomères PEO de petite taille permet déjà de transformer complètement les propriétés de surface quand la couverture est homogène. Comme le montrent Chapman et al. (Figure 27), des SAMs présentant le groupement oligo(éthylène glycol)_n (n = 3-6) sont les surfaces les plus efficaces de leur groupe de SAMs étudiées pour l'anti-adhésion des protéines (Chapman, Ostuni et al. 2000). Pour cette raison nous avons testé l'utilisation de petites chaînes en n=9 qui présentent l'avantage de diffuser rapidement vers la surface en raison de leur petite taille et ainsi pouvoir combler les espaces entre molécules ancre-harpon.

Table 1. Amount of Fibrinogen (Fib) and Lysozyme (Lys) Adsorbed to Mixed SAMs

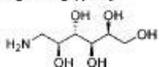
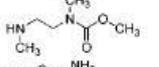
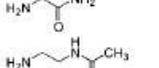
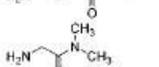
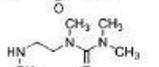
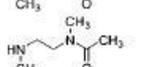
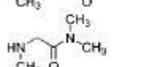
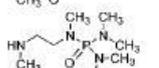
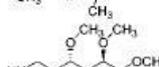
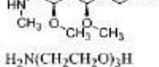
Entry No.	HNRR'	% ML		θ ₁ ^d
		Fib ^{a, b, c}	Lys ^{a, b, c}	
1	H ₂ N(CH ₂) ₁₁ CH ₃	100	100	163 ^c
2		68	20	37
3		58	43	75
4		58	30	39
5		40	5	49
6		33	15	61
7		25	11	62
8		12	4	53
9		9	2	65
10		4	<1	66
11		3	6	81
12	H ₂ N(CH ₂ CH ₂ O) ₃ H	2	1	54

Figure 27 : Pourcentage de mono-couche de protéines adsorbée sur des surfaces fonctionnalisées par des SAMs (Chapman, Ostuni et al. 2000)

Cependant, nous avons constaté qu'il faut plus de monomères pour empêcher l'adsorption des membranes biomimétiques de type DOPC (expériences discutées au chapitre III). Notre choix est resté guidé par l'idée de ne pas greffer de brin PEO d'extension supérieure aux brins PEO de la molécule ancre-harpon utilisée pour ne pas gêner sa fonction d'harponnage.

c. Caractérisation faradique de la fonctionnalisation sur électrode d'or millimétrique

Une fois l'électrode d'or modifiée Ar-SO₂Cl, nous l'avons trempée dans une solution aqueuse contenant les tensio-actifs purs ou en mélange. Pour les mélanges nous avons étudié différentes fractions volumiques de Brij58 et PEO₉-CH₃, indexées par leur pourcentage de Brij58 (x1 pour 100% de Brij58 ; x0,75 pour 75% de Brij58 ; x0,5 ; x0,25 ; x0,1 ; x0,01). Ces pourcentages indexés pour les solutions mères ne représentent en aucune manière la fraction de couverture des surfaces obtenues en Brij58 ou PEO₉-CH₃. En effet, on s'attend dans l'eau à une diffusion plus rapide du petit PEO devant le Brij qui de plus possède une CMC et peut être ralenti par la formation de micelles ou d'agrégats via son brin hydrophobe. En l'absence d'une technique quantitative permettant après trempage de connaître la proportion réellement greffée des deux espèces, nous avons exploré différentes fractions entre molécules et différentes concentrations en tensio-actif : à la concentration molaire critique du Brij58 ($C = 0,09 \text{ mM}$ et $C_{mc} = 0,08 \text{ mM}$), au-dessus et au-dessous de la C_{mc} (facteurs multiplicatifs 0,5 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000).

Dans un premier temps, pour comparer les surfaces Ar-SO₂Cl fonctionnalisées à différentes fractions de Brij58 et PEO₉-CH₃, nous avons étudié le transfert électronique entre l'électrode de travail et la sonde redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ par CV. Les résultats sont présentés pour des solutions mères Brij58 et PEO₉-CH₃ de concentration égale à la C_{mc} (concentration maximale en monomères avec très peu de micelles), Les courbes CV enregistrées sur ces différentes surfaces sont superposées Figure 28.

Nous voyons sur la CV enregistrée sur électrode d'or non modifiée (courbe noire), un pic d'oxydation du Fe(II) en Fe(III) à $E_{ox} = +0,42V$ et un pic de réduction du Fe(III) en Fe(II) à $E_{red} = +0,56V$ (voir Tableau 4). L'écart de potentiel entre les pics d'oxydation et de réduction vaut $\Delta E = 0,14V$. Lorsque l'électrode est modifiée par une couche organique Ar-SO₂-Brij58 (courbe verte), la voltampérométrie cyclique présente un courant d'oxydation et de réduction beaucoup plus faibles, ainsi qu'un écart de pic (0,35V) à pic (0,61V) plus grand ($\Delta E = 0,26V$). Cette chute ohmique peut provenir de la présence d'une couche organique passivant la surface de l'électrode. La couche organique rend le transfert électronique plus difficile (hausse ohmique) et la quantité d'espèces oxydées ou réduites diminue à la surface. Lorsque la surface est modifiée à la fois par la molécule Brij58 et la molécule PEO₉-CH₃, les courants d'oxydation (I_a) et de réduction (I_c) du couple $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ augmentent par rapport à la surface modifiée uniquement avec Brij58, mais sont tout de même plus faibles que pour l'électrode non

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

modifiée. De même, la valeur moyenne des écarts de pic à pic est intermédiaire entre une surface d'or nu et fonctionnalisée Brij58 ($\Delta E \sim 0,2$ V).

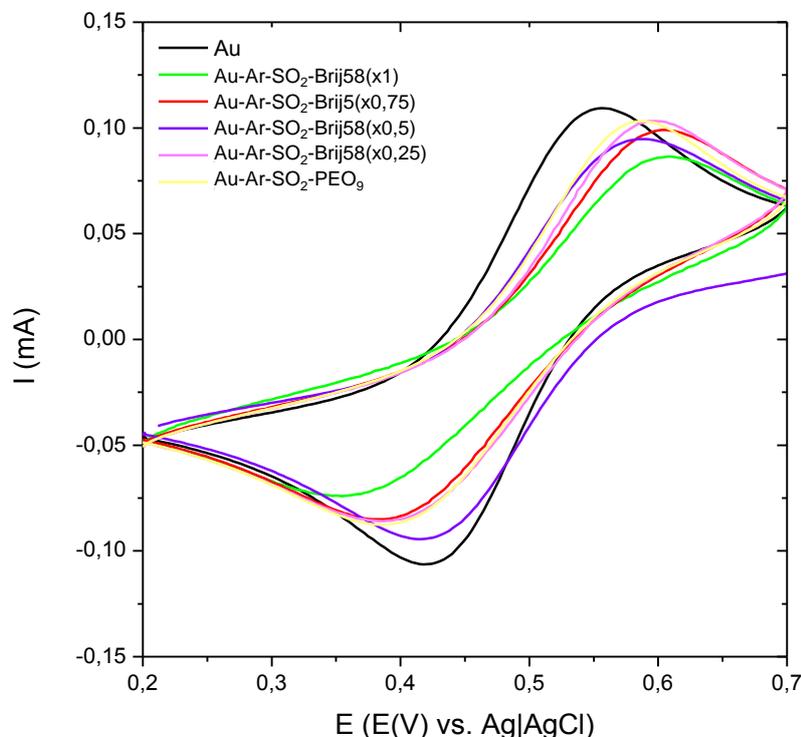


Figure 28 : Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans NaCl (0,15M) contenant 5mM du couple $[Fe(Cn)_6]^{3-/4-}$ (vitesse de balayage, 100 mV/s, 10cycles) sur électrode d'or brute et fonctionnalisée Ar-SO₂-Brij58, Ar-SO₂-Brij58(x0,75), Ar-SO₂-Brij58(x0,5), Ar-SO₂-Brij58(x0,25) et Ar-SO₂-PEO₉-CH₃

Tableau 4 : Valeurs des pics d'intensité anodique (Ia) et cathodique (Ic) et valeur d'écart de pics (ΔE) correspondant aux CV réalisées sur les surfaces Au, Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0$

Surfaces	Ia (mA)	Ic (mA)	ΔE (V)
Au	0,109	- 0,106	0,14
Au-Ar-SO ₂ -Brij58	0,086	- 0,074	0,26
Au-Ar-SO ₂ -Brij58(75%)	0,099	- 0,085	0,22
Au-Ar-SO ₂ -Brij58(x50%)	0,095	- 0,094	0,17
Au-Ar-SO ₂ -Brij58(x25%)	0,103	- 0,086	0,22
Au-Ar-SO ₂ -PEO ₉ -CH ₃	0,104	- 0,087	0,20

Nous voyons donc que la sonde redox interagit plus facilement avec la surface d'or brut, fonctionnalisée PEO₉ seul ou avec une fraction de Brij58 (hydrophiles comme

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

nous le verrons plus loin), qu'avec le Brij58 seul (plus hydrophobe). Nous avons justement remarqué précédemment que c'était la surface la plus hydrophobe (Ar-SO₂Cl) qui conduisait à la cinétique de diffusion de la sonde la plus lente (R_{ct} et angle de contact seront mis en relation plus loin).

Dans un second temps, nous avons mené des mesures EIS en mode faradique sur ces mêmes fonctionnalisations, juste après la CV (Figure 29). Les paramètres d'ajustements de ces courbes sont présentés dans le Tableau 5 ci-dessous en ayant utilisé le circuit équivalent R_s(CPE_{dc}(R_{ct}CPE_w)) (Figure 20e).

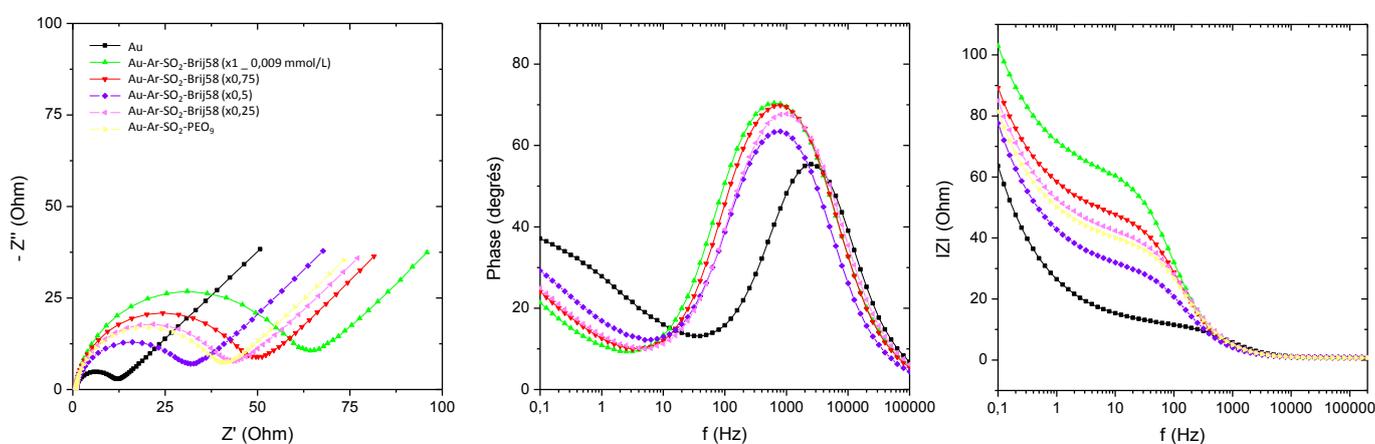


Figure 29 : Résultats EIS en mode Faradique (NaCl 0,15mol/L) sur surfaces fonctionnalisées Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO9-CH₃ (1-xi) avec i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0 et [Brij58] = [PEO9-CH₃] = 0,09 mmol/L : A) diagramme de Nyquist (impédance), B) diagramme de Bode (Phase=f(f)), C) diagramme de Bode (|Z|=f(f)).

Tableau 5 : Paramètres d'ajustement des surfaces Au, Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO9-CH₃ (1-xi) avec xi = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0 (Q : pseudo-capacité, R_{ct} et R_s : Résistance de transfert de charge et de cellule, σ : transfert de masse) en mode faradique

Modèle R _s (CPE _{dc} (R _{ct} CPE _w))	Au	Au-Ar-SO ₂ -Brij58...				
		100%	75%	50%	25%	0%
Q (μF s^{α-1} cm⁻²)	307	304	301	238	540	357
α_{dc}	0,89	0,86	0,86	0,85	0,799	0,83
σ (Ω s^{-0,5} cm²)	201	16	17	16	14	17
D_{RedOx} (10⁻⁶ cm²s⁻¹)	0,1	21	18	20	25	17
α_w	0,5	0,5	0,49	0,5	0,48	0,46
R_{ct} (Ω cm²)	18	58	45	28	39	36

CH. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

$k_{RedOx,app}$ ($cm s^{-1}$)	0,003	0,0009	0,0012	0,0018	0,0013	0,0014
f_{c1} (Hz) ; τ_{c1} (s)	66 ; 0,0023	17 ; 0,009	23 ; 0,007	56 ; 0,003	19 ; 0,008	29 ; 2
f_D (Hz) ; τ_D (s)	39 ; 0,004	0,03 ; 7	0,05 ; 3	0,1 ; 2	0,05 ; 4	0,07 ; 2

Pour toutes les surfaces, α est inférieur à 0,86 ce qui décrit l'interface comme ayant une forte distribution de capacités (noter qu'en mode faradique, la charge de l'espèce redox entre en ligne de compte et affecte la distribution dans la double couche ionique). Ceci n'est pas étonnant de par le sur-greffage de molécules, nous nous attendions à la diminution de α lors du passage de l'or nu, aux surfaces pré-fonctionnalisées (Au-Ar-SO₃H et Au-Ar-SO₂Cl) puis aux surfaces fonctionnalisées par la couche organique hydratée (Brij58 et/ou PEO). Nous remarquons aussi que les valeurs de α_w restent proches de 0,5 quelque soit la surface, c'est-à-dire que la diffusion est bien linéaire pour les espèces redox avec le champ près de l'interface. Nous obtenons à partir des valeurs de l'impédance de Warburg (σ_w), des coefficients de diffusion apparente pour les espèces redox compris entre 18 et 25 $10^{-6} cm^2 s^{-1}$ près de la surface et en accord avec les valeurs de la littérature pour la sonde utilisée (Hu, Karweik et al. 1985; Janek, Fawcett et al. 1998).

Ces mesures EIS en mode faradique, permettent aussi d'observer des différences notables entre ces fonctionnalisations de surface réalisées avec des fractions plus ou moins importantes de Brij58. Nous constatons que les changements de résistance de transfert de charge sont fonction des états de surface : R_{ct} diminue globalement quand la fraction de Brij58 diminue (valeur la plus faible pour $x = 50\%$: nous constatons que le comportement de cette fonctionnalisation ne suit pas parfaitement la tendance des autres surfaces, nous reviendrons dessus dans la discussion du mode non faradique et dans l'annexe « Mesures EIS en mode non faradique sur les fonctionnalisations Brij58 et PEO, à différentes concentrations »). La molécule amphiphile est celle qui pose le plus de résistance au transfert de charge et à l'approche des espèces redox à l'électrode, comme attendu. La valeur de la constante de transfert de charge apparente, $k_{RedOx,app}$, chute avec la fonctionnalisation pour atteindre des valeurs comprises entre $9 \cdot 10^{-4}$ et $1,8 \cdot 10^{-3} cm s^{-1}$.

Nous avons mesuré l'angle de contact de l'eau sur ces surfaces fonctionnalisées et mis ces valeurs au regard des résistances de transfert de charge mesurée en EIS-Faradique. La Figure 30 montre une bonne concordance entre ces deux grandeurs. Lorsque la surface est hydrophobe (Brij58) le transfert de charge pour la sonde redox est plus difficile (R_{ct} plus élevée) alors que lorsqu'elle est plus hydrophile (PEO, PEO/Brij58) la résistance baisse, la sonde hydratée peut alors mieux approcher la

surface. C'est ce qu'ont montré les analyses par CV précédentes, où nous avons vu que la sonde redox interagissait plus facilement avec les surfaces d'or et fonctionnalisées PEO, seul ou avec Brij58. Ainsi, la nature de la surface a un véritable impact sur sa cinétique d'interaction avec la sonde redox qui se révèle en EIS faradique *via* R_{ct} ou $k_{RedOx,app}$. Les mesures de mouillage ne pouvant se faire sur l'électrode d'or (car bien trop rugueuse et de petit diamètre), elles ont été réalisées sur les électrodes de chrome élaborées au laboratoire et auxquelles nous consacrons le chapitre IV.

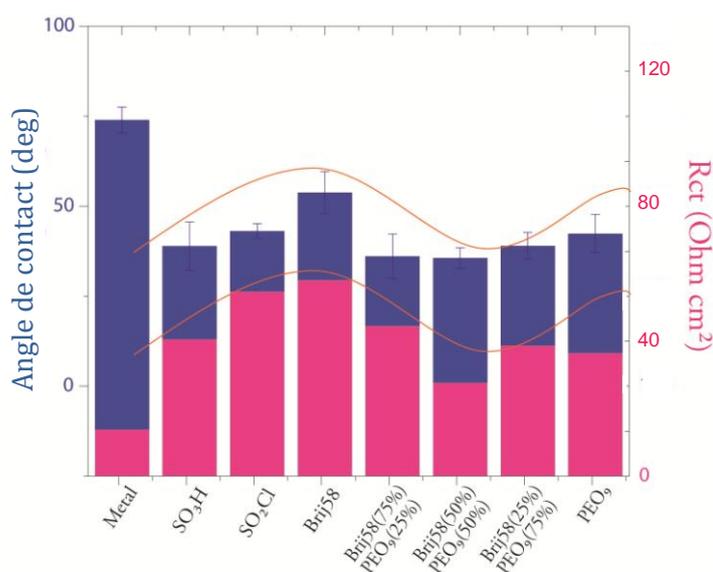


Figure 30 : Comparaison de la résistance de transfert de charges et de l'angle de contact de l'eau sur surfaces de chrome fonctionnalisées Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0$ pour [Brij58]=0,08mmol/L (~Cmc)

Les lignes orange sont placées pour guider les yeux

Dans la partie suivante nous abordons la caractérisation EIS en mode non faradique de ces mêmes fonctionnalisations de surface.

d. Conclusion sur les mesures EIS en mode faradique

Comme attendu, la cinétique de diffusion de la sonde vers l'électrode est plus lente avec le sur-greffage des molécules Brij58 et PEO (diminution de R_{ct} et α) concordant avec l'augmentation de distribution de capacité qu'engendre la couche de polymères hydratée nouvellement formée. De plus, ces valeurs diminuent avec la fraction de molécules Brij58 supposée sur la surface, ce qui montre que les solutions de différentes fractions Brij58/PEO utilisées pour le sur-greffage génèrent bien des surfaces de fractions différentes en Brij58. Ceci se conforte également avec l'évolution marquée de R_{ct} mise en regard avec celle des angles de contact, qui montre que les interactions de la sonde redox changent avec l'augmentation du caractère hydrophile des surfaces à mesure que la fraction de Brij58 diminue.

e. Caractérisation EIS en mode non faradique de la fonctionnalisation sur électrode d'or millimétrique

Dans cette partie nous présentons les spectres EIS en mode non faradique (NaCl à 150mM), pour les différentes fractions de Brij58, préparé à la Cmc soit [Brij58] = 0,09 mmol/L (Figure 31). Nous affichons quatre représentations graphiques :

- Le diagramme de Nyquist en capacitance : $-Im(C) = f(Re(C))$
- Le diagramme de Nyquist en impédance : $-Im(Z) = f(Re(Z))$
- Le diagramme de Bode de la phase en fonction de la fréquence : $-Phase = f(f)$ et sur le même graphique, le module de l'impédance en fonction de la fréquence : $|Z|=f(f)$

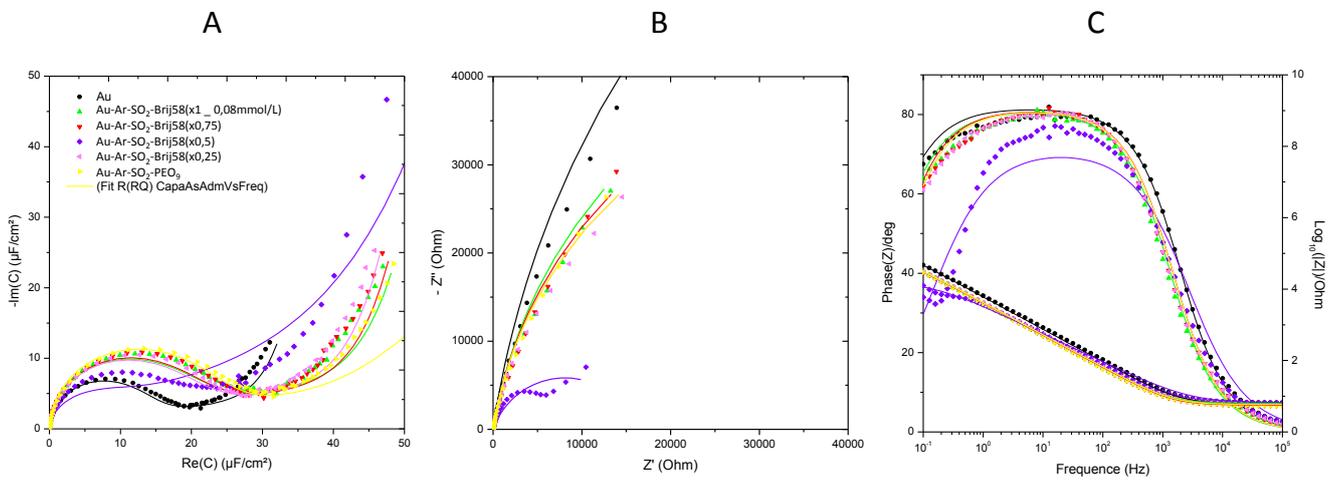


Figure 31 : Résultats et ajustements EIS en mode non Faradique (NaCl 0,15mol/L) sur surfaces fonctionnalisées Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0$ et [Brij58] = [PEO₉-CH₃] = 0,089 mmol/L

A) diagramme de Nyquist en capacitance, B) diagramme de Nyquist en impédance, C) diagramme de Bode et $|Z|=f(f)$

Les paramètres d'ajustement de ces courbes obtenus grâce au modèle $R_s(CPE R_{Ci})$ sont présentés dans le Tableau 6. Nous constatons un comportement relativement proche pour toutes les mesures d'EIS (Figure 31) réalisées par sur-greffage de la pré-fonctionnalisation Au-Ar-SO₂Cl sur électrode d'or millimétrique. La fréquence caractéristique f_{c2} est bien visible sur l'ensemble des mesures et se situe entre 1219 et 1445Hz. Seul le comportement singulier de la fonctionnalisation à partir des mélanges 50/50 de Brij58 et PEO₉-CH₃ se démarque et est discuté ci-dessous. Dans l'ensemble, les sur-greffages conservent un bon accord avec le circuit EIS utilisé pour l'ajustement et un comportement quasi-capacitif (pour tous $\alpha \sim 0,91$). La capacité d'interface diminue avec le sur-greffage certainement par augmentation de l'épaisseur diélectrique entre les "armatures" et certainement l'abaissement conjoint de sa constante diélectrique (estimée grossièrement à $\epsilon_{r,PEO} \sim 5$ pour PEO hydraté et

Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

$\epsilon_{\text{Alkyl}} \sim 2,3$ pour des chaînes alkyles, devant $\epsilon \sim 78,5$ pour l'eau pure, rappelons que $\epsilon_r = \epsilon / \epsilon_0$ avec $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-14}$ F/cm, (Vanderah, Gates et al. 2003). Nous voyons de même une diminution de la résistance en parallèle à la capacité, soit une augmentation de la fréquence caractéristique de cette section du circuit, f_{c1} (se traduisant par une chute de la phase aux basses fréquences, Figure 29 c). Ceci correspond à une augmentation des courants de fuite associés aux ions qui traversent l'espace diélectrique sans s'accumuler aux armatures de la pseudo-capacité d'interface. Nous concluons de ces valeurs, que les densités de greffage, l'accessibilité des ions au travers de la couche greffée et la capacité globale d'interface qui intègre la valeur de la double couche ionique, varient peu entre ces sur-greffages. Nous avons mesuré des différences bien plus marquées sur électrode de chrome au chapitre IV. La rugosité de l'électrode millimétrique d'or est bien moins bonne, ce qui provoque un lissage des différences entre ces sur-greffages. Rappelons qu'en mode faradique sur les mêmes surfaces, nous avons par contre mesuré une variation spectaculaire de la résistance au transfert de charge pour l'espèce redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Tableau 6 : Paramètres d'ajustement des surfaces Au, Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0 (Q : pseudo-capacité, R_{ct} et R_s : Résistance de transfert de charge et de cellule, σ : transfert de masse) en mode non faradique

Modèle R _S (CPE _{dc} R _{ci})	Au-Ar-SO ₂ Cl	Pourcentage supposé en Au-Ar-SO ₂ -Brij58 complété par Au-Ar-SO ₂ -PEO ₉ -CH ₃				
		100%	75%	50%	25%	0%
Q ($\mu\text{F s}^{\alpha-1} \text{cm}^{-2}$)	52	45	45	62	44	47
C_{dc} ($\mu\text{F cm}^{-2}$) [‡]	24	20	20	11	19	21
α	0,91	0,91	0,91	0,82	0,91	0,91
R _{ci} (k Ω cm ²)	151	86	77	14	71	84
R _S (Ω cm ²)	8	6	5	6	5	5
f_{c1} et f_{c2} (Hz)	0,016 1307	0,035 1219	0,040 1445	0,183 2190	0,045 1365	0,034 1376

‡ Rappel du calcul de la capacité de double couche : Équation 4

Face aux résultats donnés par la fonctionnalisation 50/50, dont les paramètres restent comparables aux autres mais avec un comportement moins adapté au circuit $R_s(CPE R_{ci})$, nous avons décidé d'explorer l'effet de la concentration en reproduisant ces expériences d'EIS sur l'électrode d'or millimétrique au-dessus et au-dessous de la C_{mc} (présentées en Annexe : Mesures EIS en mode non faradique sur les fonctionnalisations Brij58 et PEO₉ à différentes concentrations). Ces expériences montrent que ce comportement singulier se retrouve pour les différentes concentrations explorées parfois aussi pour la fraction à 25% et nous ont permis de conclure sur la faible influence de la concentration sur les propriétés électrochimiques des fonctionnalisations. Les mesures AFM montrent une légère augmentation de la rugosité à partir d'une concentration cent fois supérieure à la C_{mc} , peut-être liée à la rétention d'eau par le PEO à humidité ambiante.

f. Conclusion sur les mesure EIS en mode non-Faradique

Avec le sur-greffage des molécules PEO et PEO-harpon, la capacité d'interface a diminué par rapport à la pré-fonctionnalisation certainement de par l'augmentation de l'épaisseur de la couche et l'abaissement de sa constante diélectrique. Conjointement, la fréquence caractéristique f_{cl} a augmenté (0,14 -> 0,35 Hz) et commence à rentrer dans notre fenêtre de mesure fréquentielle (0,1 à 10⁵ Hz), ce qui correspond à une augmentation des courants ioniques qui traverse le diélectrique. De fait, nous pouvons dire que le circuit électrique $R_s(R_{ci}CPE)$ est bien adapté à la modélisation des données. Les différences entre surfaces au pourcentage de Brij différent sont peu marquées sur l'électrode millimétrique d'or, ce qui en partie justifiera notre intérêt pour des électrodes moins rugueuses au chapitre IV.

Nous avons comparé systématiquement les caractéristiques électrochimiques (EIS) obtenues pour notre molécule ancre-harpon (Au-Ar-SO₂-PEO₂₀-(CH₂)₁₅CH₃) et molécule de dilution (Au-Ar-SO-PEO-CH₃) à celles issues des travaux de Mathias Lösche et al. puisqu'il s'agit du système le plus proche du notre, sur or aussi mais par contre fonctionnalisé par des thiols. Leurs ancres pour les membranes sont présentées au chapitre I : ancre de type PEO-lipide WC14 (Au-S-PEO₆-(-O-C₁₄H₂₉)₂) (McGillivray, Valincius et al. 2007), FC16 (Au-S-PEO₉-(-O-C₁₆H₃₃)₂) (Heinrich, Ng et al. 2009) ou HC18 (Au-S-PEO₆-(-O-C₁₈H₃₃)₂) (Budvytyte, Valincius et al. 2013). Ils complètent celles-ci avec la molécule β ME (Au-S-CH₃CH₂-OH). Leurs données EIS non-faradiques, sont ajustées au moyen d'un circuit identique au nôtre mais noté $R_s(R_{defect}CPE_{SAM})$.

Pour ces trois fonctionnalisations organiques (WC14, FC16 et HC18), les données EIS forment un demi-cercle quasi parfait dans le diagramme de Nyquist en capacitance (avec retour à l'axe x, à droite aux basses fréquences, Figure 32). En effet, leur CPE est

très proche d'une capacité pure avec α très proche de 1 ($\alpha > 0,98$) alors que pour nos surfaces α varie autour de 0,9. Ceci témoigne d'une distribution de capacités dans notre cas et d'une meilleure homogénéité latérale de leur système. Leurs systèmes présentent des capacités de 20 à 2 fois plus faibles que les nôtres (par exemple $C_{WC14\ 100\%} \sim 1\ \mu F cm^{-2}$ pour des mélanges de $x = 70$ à 100% de WC14 et $C_{WC14\ 30\%} \sim 9\ \mu F cm^{-2}$ pour $x = 10$ à 60%) (voir Figure 31). L'effondrement de leur capacité pour $x > 60\%$ de WC14 ou FC16 est interprété comme un signe que la densité des chaînes alkyles devient suffisamment grande pour que celles-ci forment une couche compacte et plus épaisse (soit en tenant compte de la réduction de constante diélectrique associée ainsi que de l'augmentation d'épaisseur, une baisse drastique de capacité). Ceci est lié à la nature de l'ancre PEO-lipide qu'ils utilisent et qui est bien plus hydrophobe que la nôtre.

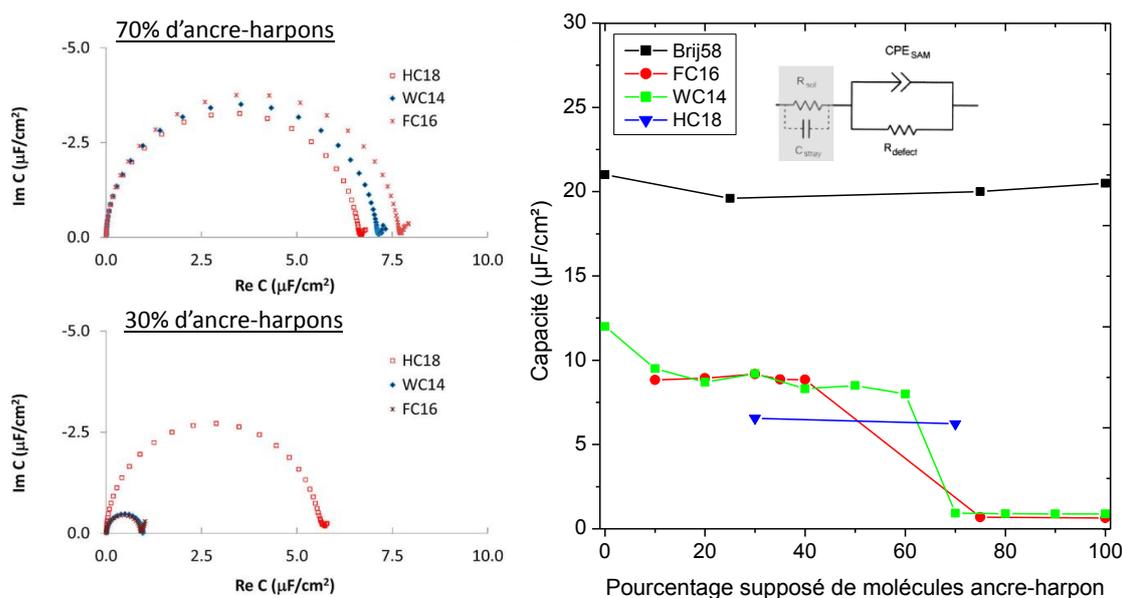


Figure 32 : Diagramme de Nyquist de la capacitance des SAMs HC18, WC14, FC16 à 70% et 30% complétées par de la β ME (à gauche) et comparaison de ces valeurs aux capacités de notre système Brij58 / PEO (à droite) (McGillivray, Valincius et al. 2007)

Dans notre cas, toutes les surfaces (fractions de Brij58 $x=1$ à 0), sont du point de vue de leurs caractéristiques EIS, très proches de systèmes ayant moins de 30% de molécules d'ancrage. Nos fonctionnalisations ont certainement des ancres plus éparées et hydratées et donnant une forte capacité d'interface puisque cette couche a une constante diélectrique plus forte et bloque moins la diffusion des ions vers l'électrode (Figure 33).

CH. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-harpon pour les membranes.

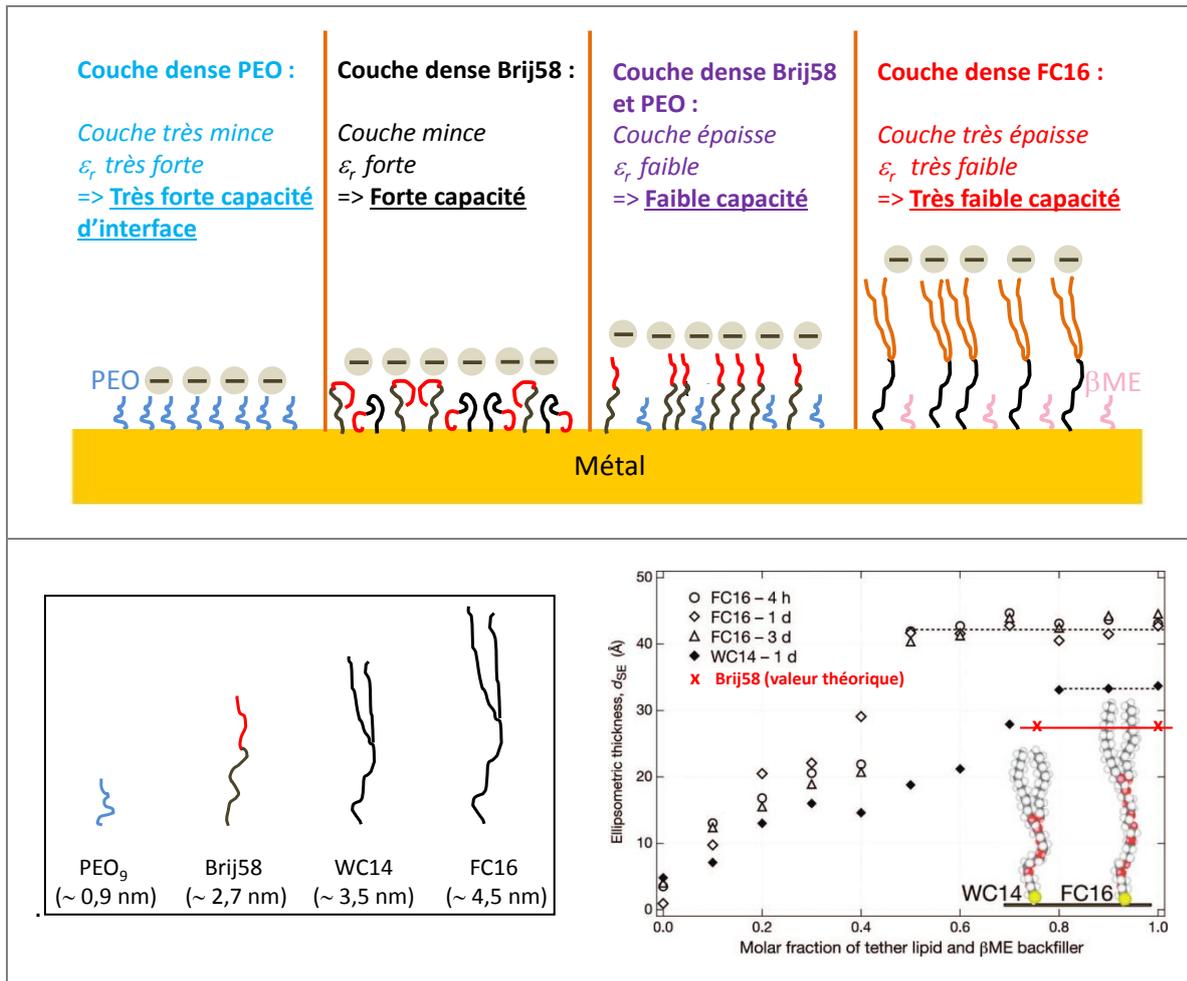


Figure 33 : Schéma illustrant les valeurs de capacité en fonction de la densité de fonctionnalisation (en haut), représentation schématique et taille des ancre-harpons Brij58, WC14, FC16 (en bas à gauche et évolution de l'épaisseur de la SAM en fonction de la fraction d'ancrage et du temps par ellipsométrie (Heinrich, Ng et al. 2009)

Cette analyse basée sur la comparaison des valeurs des pseudo-capacités est corroborée par la comparaison des résistances en parallèle de la CPE, appelées R_{defect} pour eux (et R_{ci} par nous mais étant strictement la même quantité). Les valeurs hautes de plusieurs $M\Omega\text{cm}^2$ qu'ils obtiennent pour leurs SAMs denses au delà de $x=0,6$ en WC14, diminuent drastiquement lorsque la molécule β ME est introduite dans le système et chutent à $500\text{ k}\Omega\text{ cm}^2$ pour $x=0,3$ (SAM plus éparse). Nos résistances au courant de fuite de la pseudo-capacité (R_{ci}) diminuent plus légèrement avec l'introduction des molécules hydrophiles PEO et vont de 80 à $14\text{ k}\Omega\text{ cm}^2$ (100 à 1000 fois plus faible). Nos valeurs témoignent d'un plus grand nombre de chemins ioniques shuntant la capacité, soit la présence de zones qui ne constituent pas les armatures de la capacité et offrent aux ions la possibilité de suivre les oscillations du champ électrique de façon résistive mais sans accumulation localisée. Comme pour la

capacité, ceci est certainement dû à une moins forte densité d'ancre Brij58, mais sans nul doute, principalement dû à la nature beaucoup plus hydrophile de notre fonctionnalisation. Nos plus faibles résistivités R_{ci} sont donc responsables de la diffusion aux basses fréquences constatée sur la droite des représentations Nyquist en capacitance, sans retour à l'axe x comme attendu pour un circuit R (RC) (Figure 19).

En revanche, pour les ancres HC18 (avec double insaturations), le phénomène inverse est observé par les mêmes auteurs, la capacité diminue avec la fraction d'ancre, mais faiblement (Figure 34). D'autre part, leurs travaux montrent que les valeurs de résistance et de capacitance des SAMs faites à partir de HC18 deviennent indépendantes de la quantité d'ancres en dessous de 40%. Par comparaison, la capacité de nos surfaces est globalement stable avec la fraction de Brij58 introduite en solution. Ainsi, de par la faible variation de capacité et de résistivité de nos surface Brij58/PEO, quelque soit la fraction, notre système d'étude se situe dans une structure de faibles densités d'ancre-harpons par rapport à ces travaux. D'autre part, les valeurs de nos capacités sont bien supérieures à celles obtenues dans les travaux cités, 10 fois supérieure à celle obtenue avec les molécules HC18 et jusqu'à 20 fois supérieure à celle obtenue avec WC14, ce qui s'explique de par la nature beaucoup plus hydrophile de notre système ($10 < \theta < 30$) par rapport aux leurs (PEO-lipide complétés par β ME, $\theta \sim 80^\circ$).

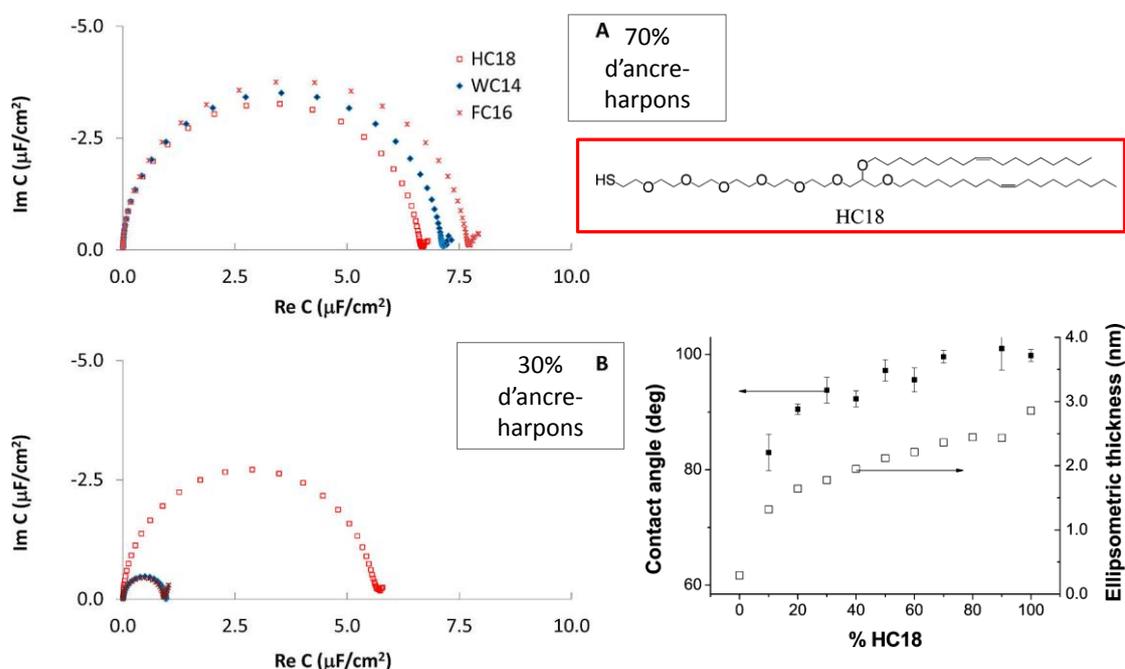


Figure 34 : Diagrammes de Nyquist de la capacitance des SAM HC18/WC14/FC16 70% et 30% (à gauche) et évolution de l'épaisseur de la SAM et de son angle de contact avec l'eau en fonction de la fraction d'ancrage (en bas à droite) (Budvytyte, Valincius et al. 2013)

Une densité de greffage faible constatée par EIS ne doit pas être présentée comme une augmentation de défauts de surface et la possibilité d'avoir des courants de fuite à la pseudo-capacité n'est pas forcément un problème pour une fonctionnalisation dont l'objectif est de constituer un système ancre-harpon. En effet, la présence de zones hydratées moins imperméables aux ions, n'est pas forcément contre-productive et la formation d'une membrane sur couche très dense de molécules d'ancre-harpon, n'est certainement pas la situation la plus favorable pour stabiliser une membrane biomimétique ou biologique près de l'électrode, sans la dénaturer ni l'immobiliser.

g. Suivi de la fonctionnalisation sur couches d'or par microbalance à cristal de quartz (QCM)

Nous avons suivi la cinétique de greffage des tensio-actifs solubilisés dans l'eau, sur la fonction Ar-SO₂Cl en utilisant la microbalance à cristal de quartz (QCM) recouverte d'un film d'or.

La QCM[§] utilise les propriétés piézoélectriques du quartz afin de mesurer des faibles variations de masse et de viscosité proches de la surface du cristal. Ces mesures sont réalisées grâce aux dépôts de deux électrodes conductrices de part et d'autre du quartz. Les quartz que nous utilisons résonnent autour de 9MHz et sont recouverts d'une couche d'or dont la finition est dite miroir (leur rugosité mesurée par AFM est d'environ 0,9 nm). Ceux-ci ont été nettoyés (HCl 1mol/L) et fonctionnalisés en solvant aqueux selon les protocoles décrits plus haut. D'autre part, le dispositif QCM utilisé a été développé pour travailler en conjugaison avec un potentiostat (microbalance électrochimique à cristal de quartz, EQCM).

Une fois pré-fonctionnalisés Au-Ar-SO₂Cl, les quartz sont montés dans une cellule en téflon, d'un volume de 600µL que l'on complète en solvants. Pour la fonctionnalisation par sur-greffage d'un -OH terminal sur Ar-SO₂Cl, nous remplissons la cellule d'eau milli-Q et les molécules Brij58 ($C_{\text{Brij58}} = 0,009$ mg/mL dans l'eau) ou PEO₉-CH₃ ($C_{\text{PEO}} = 0,028$ mg/mL dans l'eau) sont injectées à l'aide de micro-pipettes. Nous avons exploré quatre volumes différents de solutions Brij58, dont les cinétiques correspondantes sont présentées Figure 35. Ces expériences sont reproductibles (réalisées trois fois).

[§] Description de la technique dans l'annexe QCM. Dispositif : QCM 922-00 *Princeton Applied Research*

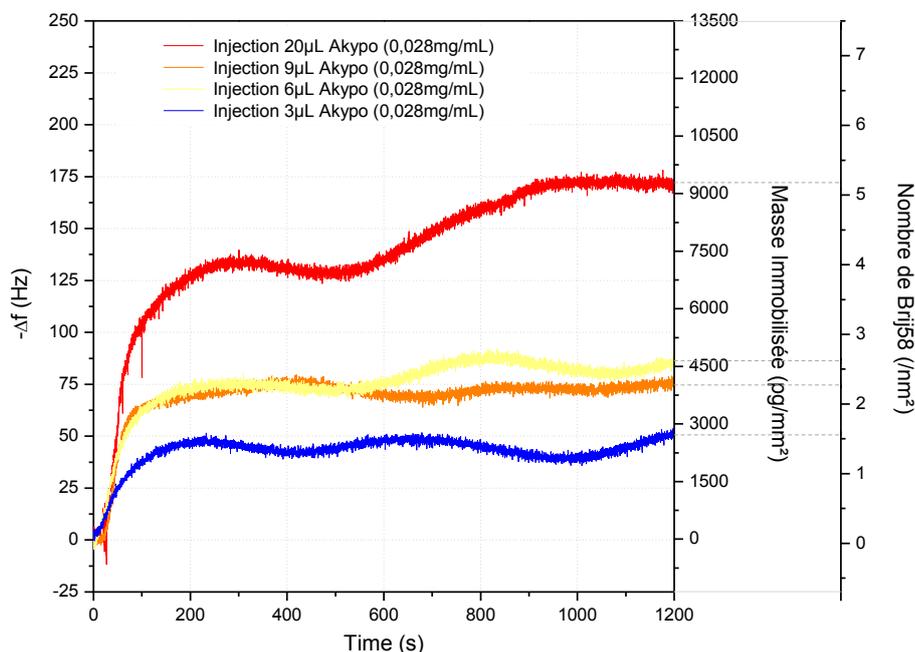


Figure 35 : Cinétiques QCM d'adsorption des molécules Brij58 dans l'eau milli-Q sur Ar-SO₂Cl

Injections (à t=0) de 20 μL de solution Brij58 (à 0,028 mg/mL) courbe rouge, 9 μL courbe orange, 6 μL courbe jaune et 3 μL courbe bleue.

L'augmentation de la masse (Δm) sur la surface du cristal crée une diminution de la fréquence (Δf). Le logiciel QCM enregistre la cinétique en variation de fréquence du quartz. Pour de faibles viscosités et une répartition uniforme des masses sur la surface (gamme de linéarité de l'équation de Sauerbrey < 3-4 μg, nous sommes dans ce cas), cette grandeur peut être reliée à une variation de masse par l'équation de Sauerbrey (Équation 7) (Hardy, Nayak et al. 2012).

Équation 7

$$\Delta m = -\frac{C}{n} \Delta f$$

La constante C est égale à 1,107 ng/Hz (selon les données du constructeur pour les quartz d'or qualité miroir) et n, correspondant à l'harmonique de travail (ici n=1). Cette masse est ensuite rapportée à une surface (ng/cm²) en tenant compte de l'aire géométrique des électrodes déposées sur le quartz (dans notre cas : $\pi \cdot (0,25 \text{ cm})^2 = 0,196 \text{ cm}^2$ d'or). Une variation de 1 Hz correspond à une prise de masse de 56,39 pg/mm². Cette masse adsorbée est ensuite exprimée en nombre de molécules par nm² (TA/nm²) ou en surface par tête de molécule (Å²/TA). Ces valeurs sont estimées sur la base de la masse d'une molécule de Brij58 ($M_{\text{Brij58}} = 186,6 \cdot 10^{-14} \text{ ng}$) et peuvent être comparées à la surface qu'occupe sa tête au sein d'une micelle ($s_{\text{Brij58}} = 80 \text{ Å}^2$ ce qui est équivalent à 1,25 TA/nm²) (Fall 2011).

*Ch. II. Fonctionnalisation d'électrodes par molécules ancre-
harpon pour les membranes.*

Tableau 7 : Résultats des cinétiques d'adsorption QCM des molécules de Brij 58 dans l'eau milli-Q sur Au-Ar-SO₂Cl (surface par tête $s_{\text{Brij58}} = 80 \text{ \AA}^2$ soit $1,25 \text{ nm}^{-2}$)

Surfaces QCM	Au-Ar-SO ₂ -Brij58			
Volume injecté (μL)	3	6	9	20
-Δf (Hz)	44 ± 6	82 ± 5	77 ± 7	165 ± 5
Masse immobilisée (pg/mm ²)	2464 ± 359	4540 ± 282	4291 ± 415	9136 ± 282
Nombre de molécules (/nm ²)	1,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	4,9 ± 0,2
Surface disponible par molécule (Å ²)	75,8	41	43,5	20,4
Nombre de monocouches supposées	1	2	2	4

Les masses totales immobilisées sur la surface sont calculée par différence entre les deux plateaux mesurés avant et après injection des molécules et leurs équivalents en nombre de molécules Brij58 sont donnés dans le Tableau 7.

En supposant, qu'après injection, les molécules se répartissent en brosse, uniformément sur la surface d'or (Figure 36), nous constatons qu'une injection de 3μL suffirait déjà à recouvrir totalement la surface de Brij58 avec une disponibilité surfacique ($1,32 \text{ nm}^{-2}$) proche de l'inverse de leur surface par tête micellaire ($1,25 \text{ nm}^{-2}$). Pour des injections de 20μL (6 fois plus concentrées), la surface occupée par chaque Brij58 est divisée par 4, atteignant une valeur de $20,4 \text{ \AA}^2/\text{TA}$. Des valeurs aussi faibles sont celles attendues pour des SAMs (Self-Assembled Monolayer) greffées par un thiolate sur l'or (Au 111). Pour la 16-MHDA, constituée de 16 carbones (comme le Brij58 sans chaîne PEO), mais terminée par un -COOH, Harder et al. ont trouvé des densités de $21,4 \text{ \AA}^2/\text{thiolate}$ (Harder, Grunze et al. 1998) dans le cas d'un greffage idéal sur maille hexagonale 2D, avec des distances entre sulfures de $4,97 \text{ \AA}$ (Dubois, Zegarski et al. 1993). La monocouche de brij58 serait dans ce cas beaucoup plus dense. La longueur du brin hydrophobe (1,8nm) importante par rapport au Brij58 entier (2,7nm estimée sur la base du modèle en brosse (Advincula, Brittain et al. 2004)), lui confère une certaine rigidité et lui permet de cristalliser via les interactions alkyl-alkyl. Les molécules de la monocouche se trouveraient donc au contact par leurs chaînes alkyls (Figure 36b).

Ce modèle de répartition des tensio-actifs en monocouche expose cependant les chaînes alkyl à l'eau. Il est plus probable qu'une seconde couche de Brij58 s'assemble tête-bêche au dessus de la couche greffée pour protéger les alkyls de l'eau en formant une bicouche (Figure 36c). Dans ce cas on multiplierait par deux la surface disponible par molécule (entre $151,6\text{\AA}^2$ et $40,8\text{\AA}^2$). Au vu des valeurs obtenues, encore faibles par rapport à la surface par tête micellaire $s_{\text{Brij58}} = 80\text{\AA}^2$, nous pouvons même supposer qu'une double bicouche se forme (surface disponible par Brij58 entre $303,2\text{\AA}^2$ et $81,6\text{\AA}^2$) (Figure 36d). Nous avons généralisé une étape de rinçage ultérieure qui aura pour objectif de ne conserver que la première monocouche greffée. Les quartz, ayant été quelques heures au contact des molécules du sur-greffage, sont ensuite rincés à l'eau, au dichlorométhane, à l'acétone, puis séchés avant d'injecter les solutions de membranes assemblées en vésicules uni-lamellaires (résultats du chapitre III). Ceci permet de retirer les molécules de Brij et $\text{PEO}_n\text{-CH}_3$ adsorbées mais non liées de façon covalente à la surface. Malheureusement, les masses avant et après rinçage ne peuvent être comparées car le montage et démontage de la cellule au moment du rinçage ne permet pas de conserver la ligne de base en QCM (variations de plusieurs dizaines de Hz).

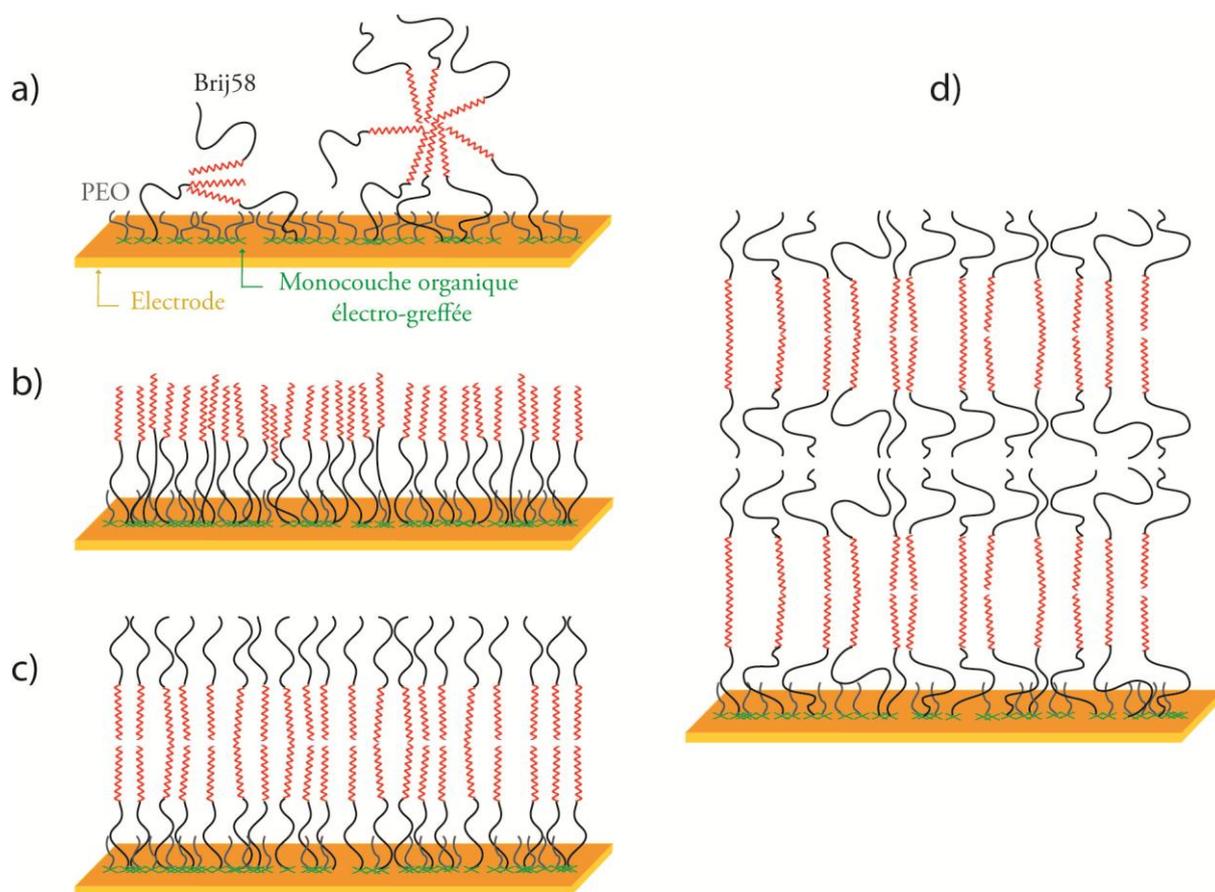


Figure 36 : Modèle de répartition des molécules amphiphiles Brij58 sur électrode d'or en micelle a), en brosse avec 20\AA b), 40\AA c), 80\AA d) par surface moléculaire

Une expérience de réflectivité (neutrons ou X) ou d'ellipsométrie menée en solution, telle que l'a été l'expérience de QCM, permettrait de confronter les hypothèses avancées ci-dessus à une détermination du profil d'épaisseur en couches de Brij superposées. Les électrodes d'or ne se prêtent absolument pas à ces techniques pour des raisons discutées au chapitre IV. Nous verrons qu'après lavages, d'éventuelles multicouches ne se retrouvent pas et qu'on obtient bien la monocouche greffée de Brij ou Brij/PEO pour les mélanges.

Nous avons également étudié la fonctionnalisation -PEO₉-CH₃ sur-greffé sur Ar-SO₂Cl. La Figure 37 présente les cinétiques obtenues par QCM après injection de 40μL d'une solution aqueuse de PEO₉-CH₃ et d'une solution contenant du Brij58 en plus (Au-Ar-SO₂-Brij 58 (30%) et Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃ (70%)).

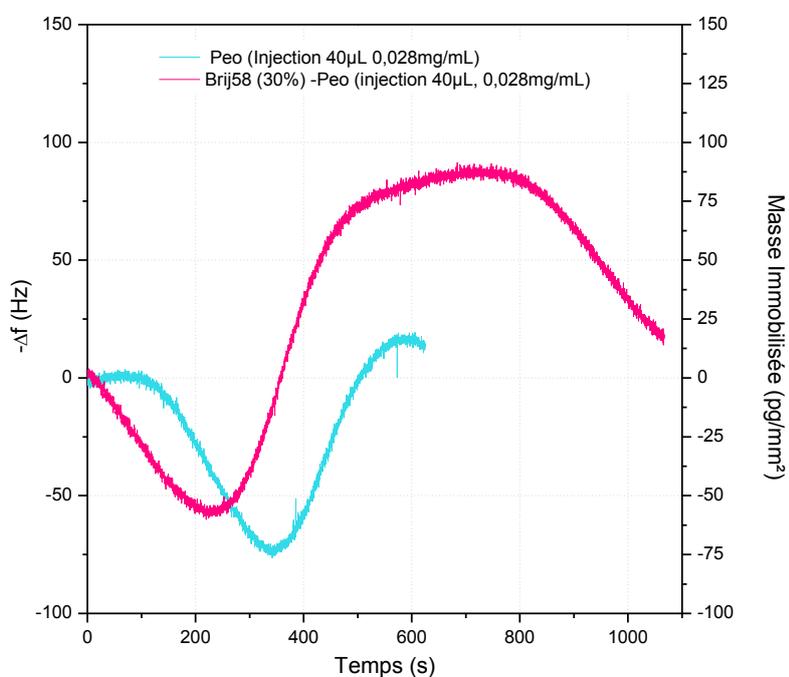


Figure 37: Cinétiques QCM d'adsorption des molécules PEO₉-CH₃ dans l'eau milli-Q sur Ar-SO₂Cl

Injections (à t=0) de 40μL de solution PEO₉-CH₃ seule (à 0,028mg/mL) courbe bleue et combinée à Brij58 (30%) courbe rose.

Pour plusieurs essais, nous n'avons pas réussi à obtenir de cinétique stable et exploitable de l'adsorption de ces molécules sur la surface d'or des quartz. Ceci pouvant venir de la très faible taille (0,9nm estimée sur la base du modèle en brosse (Advincula, Brittain et al. 2004)) et masse de la molécule PEO₉-CH₃. En supposant un sur-greffage complet des Ar-SO₂Cl, estimés via $d_{Ar-SO_3H} = 3 \times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$, soit $\sim 6 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. On s'attend alors à une couche compacte de PEO et une prise de masse atteignant 210ng sur l'électrode ($S=0.2\text{cm}^2$), soit $\sim 10500 \text{ ng/cm}^2$. La densité des PEO est certainement surestimée puisque : i) tous les Ar-SO₃H ne sont peut être pas

transformés en Ar-SO₂Cl ; ii) la densité de greffage des Ar-SO₃H est surestimée car elle ne tient pas compte d'éventuelles multicouches (polymérisations à l'électro-greffage) ; iii) l'encombrement stérique du PEO l'empêche de se greffer sur tous les Ar-SO₂Cl. Malgré cela, on pouvait s'attendre à une prise de masse supérieure à la limite de détection (~10 pg/mm²). Le fait que le signal ne se stabilise pas ici, doit s'interpréter comme un fort changement de la viscosité avec l'arrivée du PEO₉-CH₃ sur le quartz.

2. Conclusions sur la stratégie de fonctionnalisation choisie

Les mesures EIS en mode non faradique permettent d'accéder à la proportion des ions impliqués dans un comportement capacitif ou dans des courants de fuite purement résistifs (via C et R_{ci}), nous suivons donc la dynamique des charges à l'interface modifiée. Les mesures EIS en mode faradique permettent d'accéder à la cinétique de diffusion d'une sonde redox et à son interaction à la surface. Ces mesures conjointes se sont montrées très sensibles au changement d'état de surface lors de la pré-fonctionnalisation et ont permis de montrer l'efficacité de la chimie de surface mise en jeu en mettant en évidence toutes les étapes de pré-fonctionnalisation. Des changements d'interactions drastiques entre la sonde redox et l'interface ont été suivis, des valeurs de constantes diélectriques et des taux de couverture des couches organiques Ar-SO₃H et Ar-SO₂Cl ont pu être approchés bien qu'il soit difficile de prédire la constante diélectrique d'une molécule polaire et polarisable sur électrode.

Avec le sur-greffage des molécules PEO et PEO-harpon (Brij58), l'épaisseur de la couche augmente et devient moins compacte que la pré-fonctionnalisation, la capacité d'interface diminue et plus de courants ioniques traversent la fonctionnalisation. Les surfaces ayant des pourcentages de Brij58 différents se différencient peu par leur propriétés capacitives et résistives sur l'électrode millimétrique d'or trop rugueuse. Grâce au mode faradique et aux mesures d'angle de contact, nous avons par contre pu relier la cinétique de diffusion de la sonde redox vers l'électrode avec la nature hydrophobe ou hydrophile de la surface. Ainsi, cette cinétique est plus rapide avec la diminution de la fraction de molécules Brij58 supposée sur la surface, et avec l'augmentation de la nature hydrophile de la surface (organisation de l'eau au contact) entre une surface sans PEO : Au-Ar-Brij58 et avec : Au-Ar-Brij58/PEO. Ceci montre que les solutions de différentes fractions Brij58/PEO utilisées pour le sur-greffage génèrent bien des surfaces de fractions différentes en Brij58, ce qui était recherché.

Nous pouvons noter que les fréquences caractéristiques f_{cl} , de 0,14 Hz pour la pré-fonctionnalisation et de 0,35 Hz pour la fonctionnalisation complète, entrent dans notre gamme fréquentielle (0,1 à 100000 Hz) de mesure (bien que 0,14 soit à la limite basse), ce qui montre que le circuit électrique R_s(R_{ci}CPE) que nous utilisons est bien adapté à la modélisation des données. L'exploration des basses fréquences n'était pas

réalisé par les premières études citées comme références bibliographiques et elle apporte ici un réel élément de discussion.

Comparé à des systèmes d'ancrage PEO-lipide, notre fonctionnalisation PEO et Brij58 semble présenter une densité de molécules ancre-harpon inférieur à ~ 30 %. Les ancres plus éparses et hydratées donnent ainsi une plus forte capacité d'interface ~ 20 $\mu\text{F cm}^{-2}$ et un plus grand nombre de chemins ioniques offrant aux ions la possibilité de traverser la couche d'interface sans s'accumuler sur des armatures capacitives. Les mesures QCM, quant à elles, ont permis de supposer qu'une couche dense de Brij58 pouvait être immobilisée (selon un greffage type maille hexagonale). N'oublions pas que les comportements décrits par l'EIS (forte capacité et faible résistivité) peuvent également être dû à la nature beaucoup plus hydrophile de notre fonctionnalisation. La faible densité de greffage et la présence de courants de fuite décrits par l'EIS ne posent pas forcément problème pour une fonctionnalisation destinée à constituer un système ancre-harpon puisqu'on ne souhaite pas figer la membrane ou pire ouvrir son feuillet bas sur un tapis hydrophobe. Il est tout de même probable que la densité d'ancre soit un peu plus élevée que celle positionnée par rapport à la littérature cherchant de très faibles taux d'ancres.

Le chapitre suivant met en évidence l'efficacité de la fonctionnalisation pour l'harponnage de membranes sur or par l'utilisation des techniques QCM (microbalance à cristal de quartz) et SPR (résonance plasmonique de surface) sur les mêmes fonctionnalisations.

Annexes Ch.II

A. Nettoyage des électrodes

1. L'électrode d'or millimétrique

Après chaque utilisation de l'électrode millimétrique (contact avec différentes solutions, fonctionnalisation et mise sous champ) celle-ci est nettoyée à l'aide d'un kit de polissage (acheté chez Biologic). Dans un premier temps, la surface d'or de la microélectrode est polie par mouvement circulaire sur une goutte de solution d'alumine 0,05 μ m pour polir déposée sur un tapis d'alumine pour polissage. Dans un second temps, la même opération est répétée avec une solution diamant sur un tapis pour polissage diamant. La microélectrode est ensuite rincée abondamment à l'eau milli-Q.



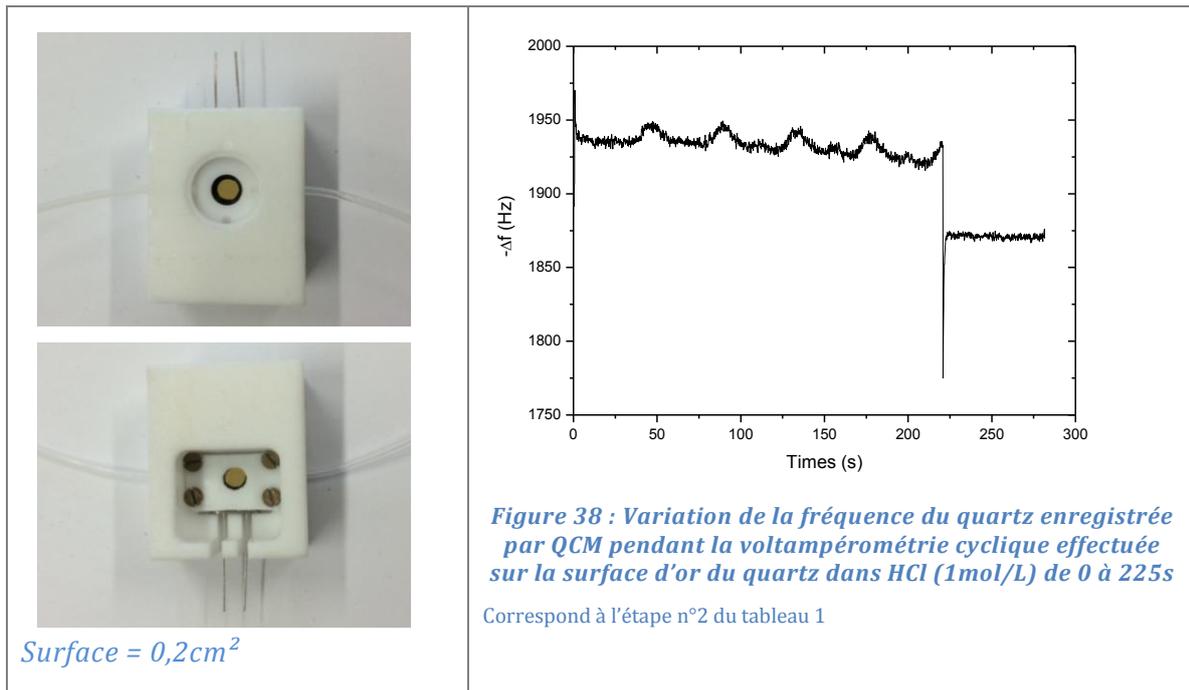
Electrode millimétrique d'or ($S=0,07\text{cm}^2$)

2. Les quartz d'or qualité miroir

Nous avons remarqué que la fréquence des quartz d'or qualité miroir neufs, sortant de leur emballage, avaient du mal à se stabiliser autour d'une ligne de base et que les spectres EIS étaient très différents d'un quartz à l'autre. Il est possible que les traitements lors du processus de fabrication, laissent des traces sur les surfaces d'or. Nous avons donc choisi de les nettoyer à l'acide selon le protocole décrit dans le Tableau 8 à l'étape n°2. Les quartz sont montés dans une cellule électrochimique que l'on remplit d'une solution HCl à 1mol/L. Nous effectuons cinq balayages en tension par voltampérométrie cyclique, de 0,5V à -0,6V. Ces cycles se visualisent sur la variation de fréquence des quartz enregistrée par QCM pendant l'opération (Figure 38).

Tableau 8 : Protocole de nettoyage sous champ des quartz d'or et de vérification par EIS et QCM

Etape	Temps	Solvant	Volume	Procédé
1	2min	NaCl (150mM)	600 μ L	EIS sur quartz nu
2	5min	HCl (1M)	600 μ L	CV : 5 cycles 0,5 \leftrightarrow -0,6 V
3	2min	NaCl (150mM)	600 μ L	EIS sur quartz nu



Les mesures EIS faites sur chaque quartz avant (Figure 39) et après nettoyage (Figure 40) montrent que les spectres d'impédance ne sont pas superposables tant que les quartz n'ont pas été nettoyés. La structure de leur surface d'or n'est donc pas la même. Celle-ci devient plus proche de la structure d'une surface plane à la capacité pure (Tableau 9). Si nous souhaitons caractériser la structure des surfaces une fois fonctionnalisées et avec membrane, nous devons partir de surfaces proches d'un point de vue électrochimique. Il est donc impératif de nettoyer des quartz neufs destinés à faire des études EIS.

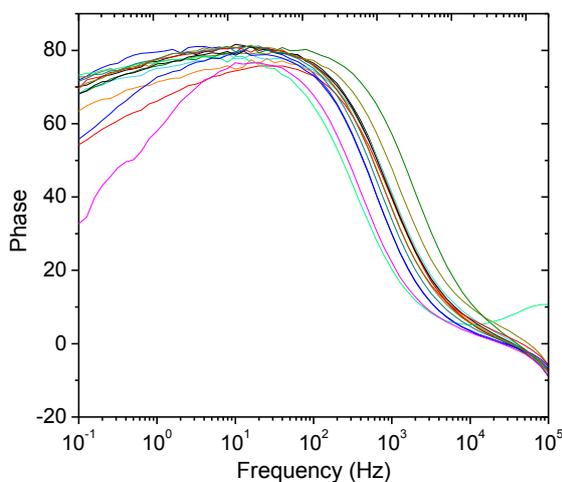


Figure 39 : Diagramme de Bode de la phase de l'impédance des quartz bruts neufs non nettoyés

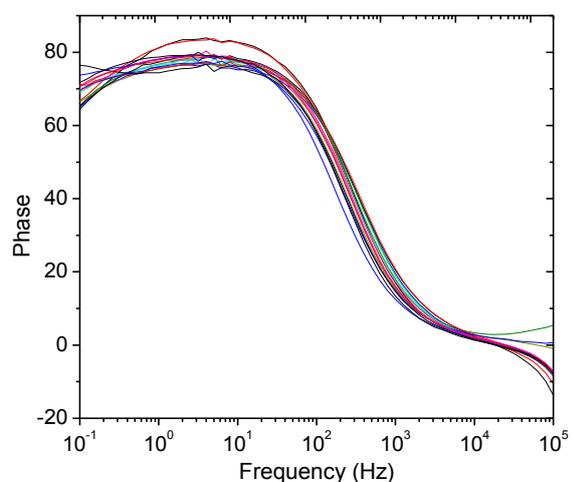


Figure 40 : Diagramme de Bode de la phase de l'impédance des quartz bruts nettoyés

Tableau 9 : Valeurs moyennes des paramètres d'ajustement (résistance, capacité et le facteur α) par un circuit RQ sur quartz bruts et nettoyés

Fit en impédance de la capacité RQ série	Résistance (Ohm)	Capacité (μF)	α
Quartz brut	$184,4 \pm 13,9$	$3,10 \pm 0,76$	$0,87 \pm 0,04$
Quartz nettoyé	$177,5 \pm 17,9$	$5,53 \pm 1,4$	$0,91 \pm 0,04$

Les images AFM montrent une faible rugosité avant et après nettoyage de la surface d'or des quartz (Figure 41 et Figure 42).

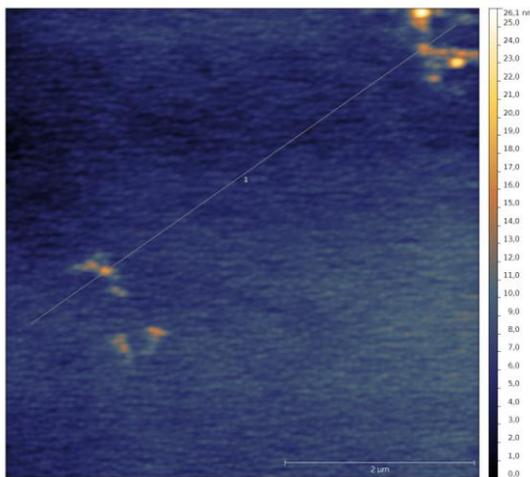


Figure 41 : Image de topographie AFM ($5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) sur quartz d'or neuf (RMS = 1,33 nm)

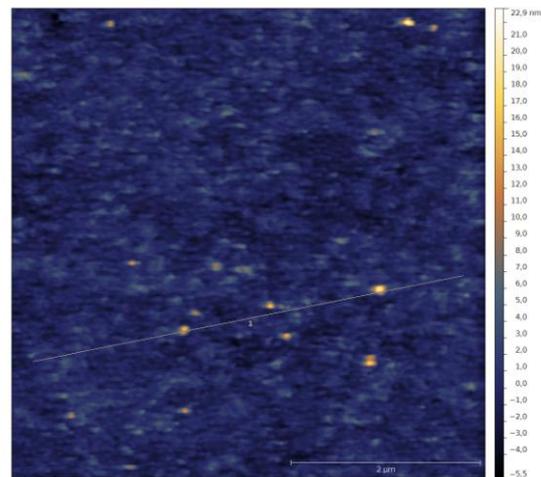


Figure 42 : Image de topographie AFM ($5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) sur quartz d'or nettoyé (RMS = 1,41 nm)

B. Fonctionnalisation des électrodes

Une fois les électrodes préparées et nettoyés, la fonctionnalisation par électro-greffage de la fonction $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ puis sur-greffage des molécules PEO et PEO-ancree s'effectue selon le protocole présenté dans le Tableau 10. Les fonctionnalisations par différentes fractions volumique de mélange PEO / Brij58 (10/90, 50/50, etc) sont obtenues en préparant des solutions PEO et Brij58 de même concentration dont on prélève les volumes désirés que l'on mélange ensuite (Tableau 11, 12, 13, 14, 15).

	M (g/mol)	Cmc (mol/L)	Cmc (mg/mL)	d (g/ml)
Brij 58	1123,5	0,00008	0,08988	0,978
PEO9-CH3	350			1,004
eau	18			1

Tableau 10 : Protocole de fonctionnalisation des électrodes par voie aqueuse ou organique

Etape	Solvant	Volume			Procédé		
		Micro- électrode/ Lames SPR	Quartz d'or	Lames de Cr	Micro- électrode/ Lames SPR	Quartz d'or	Lames de Cr
1	NaNO ₂ (5mM) + NH ₂ -Ar-SO ₃ H (5mM), HCl (1M) bien dissout	Bécher de 10mL	600μL	Bécher de 20mL	CV : 1 cycle 0,2 ⇔ -0,2V à 10mV/s (~2min)	"	CV : 1 cycle 0,1 ⇔ -0,5V à 1mV/s (~30min)
2	Eau milli-Q, acétone	qqs mL	"	"	rincée à la pissette puis séchée	"	"
3	PCl ₅ / CH ₂ Cl ₂ (5% v/v) bien dissout	Bécher de 10mL	"	"	trempeée pendant 3min	"	"
4	CH ₂ Cl ₂ , acétone	qqs mL	"	"	rincée puis séchée	"	"
5	PEO et/ou PEO-harpon dans eau milli-Q ou acétonitrile	Bécher de 10mL	40μL	Bécher de 20mL	trempeée 30min	Injecti on, 1h	trempeée 20h
6	CH ₂ Cl ₂ , acétone	qqs mL	"	"	rincée à CH ₂ Cl ₂ , soniquée à l'acétone, séchée	rincée puis séchée	rincée à CH ₂ Cl ₂ , soniquée à l'acétone, séchée

Tableau 11 : Valeurs des concentrations et des masses de Brij58 et de PE09-CH3 pour des mélanges de différentes fractions volumique réalisés à 1/20 de fois la concentration micellaire critique de Brij58 (0,05xCmc)

Fraction Brij58	Rapport des volumes		Concentration dans volume total		Rapports des quantités de matière $n_{\text{Brij58}}/n_{\text{PEO}}$	Volume total (mL)	Masses (mg)	
	$V_{\text{Brij58}}/V_{\text{PEO}}$	$V_{\text{PEO}}/V_{\text{Brij58}}$	C_{Brij58} (mol/L)	C_{PEO} (mol/L)			m_{Brij58}	m_{PEO}
			0,05 x Cmc	0,5 x Cmc				
100%	1	0	0,000004	0		10	0,044	0
75%	0,75	0,25	0,000003	0,00001	0,3	10	0,033	0,035
50%	0,5	0,5	0,000002	0,00002	0,1	10	0,022	0,07
25%	0,25	0,75	0,000001	0,00003	0,033	10	0,011	0,105
100% peo	0	1	0	0,00004	0	10	0	0,14

Tableau 12 : Valeurs des concentrations et des masses de Brij58 et de PE09-CH3 pour des mélanges de différentes fractions volumique réalisés à la concentration micellaire critique de Brij58 (Cmc)

Fraction Brij58	Rapport des volumes		Concentration dans volume total 1 x la Cmc		Rapports des quantités de matière $n_{\text{Brij58}}/n_{\text{PEO}}$	Volume total (mL)	Masses (mg)	
	$V_{\text{Brij58}}/V_{\text{PEO}}$	$V_{\text{PEO}}/V_{\text{Brij58}}$	C_{Brij58} (mol/L)	C_{PEO} (mol/L)			m_{Brij58}	m_{PEO}
100%	1	0	0,00008	0		10	0,898	0
75%	0,75	0,25	0,00006	0,00002	3	10	0,674	0,07
50%	0,5	0,5	0,00004	0,00004	1	10	0,449	0,14
25%	0,25	0,75	0,00002	0,00006	0,33	10	0,224	0,21
100% peo	0	1	0	0,00008	0	10	0	0,28

Tableau 13 : Valeurs des concentrations et des masses de Brij58 et de PE09-CH3 pour des mélanges de différentes fractions volumique réalisés à dix fois la concentration micellaire critique de Brij58 (10xCmc)

Fraction Brij58	Rapport des volumes		Concentration dans volume total		Rapports des quantités de matière $n_{\text{Brij58}}/n_{\text{PEO}}$	Volume total (mL)	Masses (mg)	
	$V_{\text{Brij58}}/V_{\text{PEO}}$	$V_{\text{PEO}}/V_{\text{Brij58}}$	C_{Brij58} (mol/L)	C_{PEO} (mol/L)			m_{Brij58}	m_{PEO}
			1 x Cmc	10 x Cmc				
100%	1	0	0,00008	0		10	0,8988	0
75%	0,75	0,25	0,00006	0,0002	0,3	10	0,6741	0,7
50%	0,5	0,5	0,00004	0,0004	0,1	10	0,4494	1,4
25%	0,25	0,75	0,00002	0,0006	0,033	10	0,2247	2,1
100% peo	0	1	0	0,0008	0	10	0	2,8

Tableau 14 : Valeurs des concentrations et des masses de Brij58 et de PEO9-CH3 pour des mélanges de différentes fractions volumique réalisés à cent fois la concentration micellaire critique de Brij58 (100xCmc)

Fraction Brij58	Rapport des volumes		Concentration dans volume total 100 x la Cmc		Rapports des quantités de matière $n_{\text{Brij58}}/n_{\text{PEO}}$	Volume total (mL)	Masses (mg)	
	$V_{\text{Brij58}}/V_{\text{PEO}}$	$V_{\text{PEO}}/V_{\text{Brij58}}$	C_{Brij58} (mol/L)	C_{PEO} (mol/L)			m_{Brij58}	m_{PEO}
100%	1	0	0,008	0		10	89,88	0
75%	0,75	0,25	0,006	0,002	3	10	6,741	7
50%	0,5	0,5	0,004	0,004	1	10	4,494	14
25%	0,25	0,75	0,002	0,006	0,33	10	2,247	21
1%	0,01	0,99	0,00008	0,00792	0,01	10	0,8988	27,72
100% peo	0	1	0	0,008	0	10	0	28

Tableau 15 : Valeurs des concentrations et des masses de Brij58 et de PEO9-CH3 pour des mélanges de différentes fractions volumique réalisés à mille fois la concentration micellaire critique de Brij58 (1000xCmc)

Fraction Brij58	Rapport des volumes		Concentration dans volume total 1000 x la Cmc		Rapports des quantités de matière $n_{\text{Brij58}}/n_{\text{PEO}}$	Volume total (mL)	Masses (mg)	
	$V_{\text{Brij58}}/V_{\text{PEO}}$	$V_{\text{PEO}}/V_{\text{Brij58}}$	C_{Brij58} (mol/L)	C_{PEO} (mol/L)			m_{Brij58}	m_{PEO}
100%	1	0	0,08	0		10	0,8988	0
50%	0,5	0,5	0,04	0,04	1	10	0,4494	0,14
10%	0,1	0,9	0,008	0,072	0,11	10	0,08988	0,252
1%	0,01	0,99	0,0008	0,0792	0,01	10	0,008988	0,2772
100% peo	0	1	0	0,08	0	10	0	0,28

C. EIS en mode non faradique des fonctionnalisations Brij58 et PEO₉ à différentes concentrations

Ces expériences EIS (à la concentration molaire critique du Brij58 ($C = 0,09$ mM et $C_{\text{mc}} = 0,08$ mM), au-dessus et au-dessous de la Cmc ($0,5^*$; 1^* ; 10^* ; 100^* ; 1000^*C_{mc})) ont été réalisées deux fois pour vérifier la reproductibilité.

La Figure 43 présente les spectres EIS obtenus en dessous de la concentration molaire critique à un mélange non équivalent, soit $[Brij58] = 0,05 \cdot C_{mc} = 0,0045 \text{ mmol/L}$ et $[PEO_9-CH_3] = 0,5 \cdot C_{mc} = 0,045 \text{ mmol/L}$.

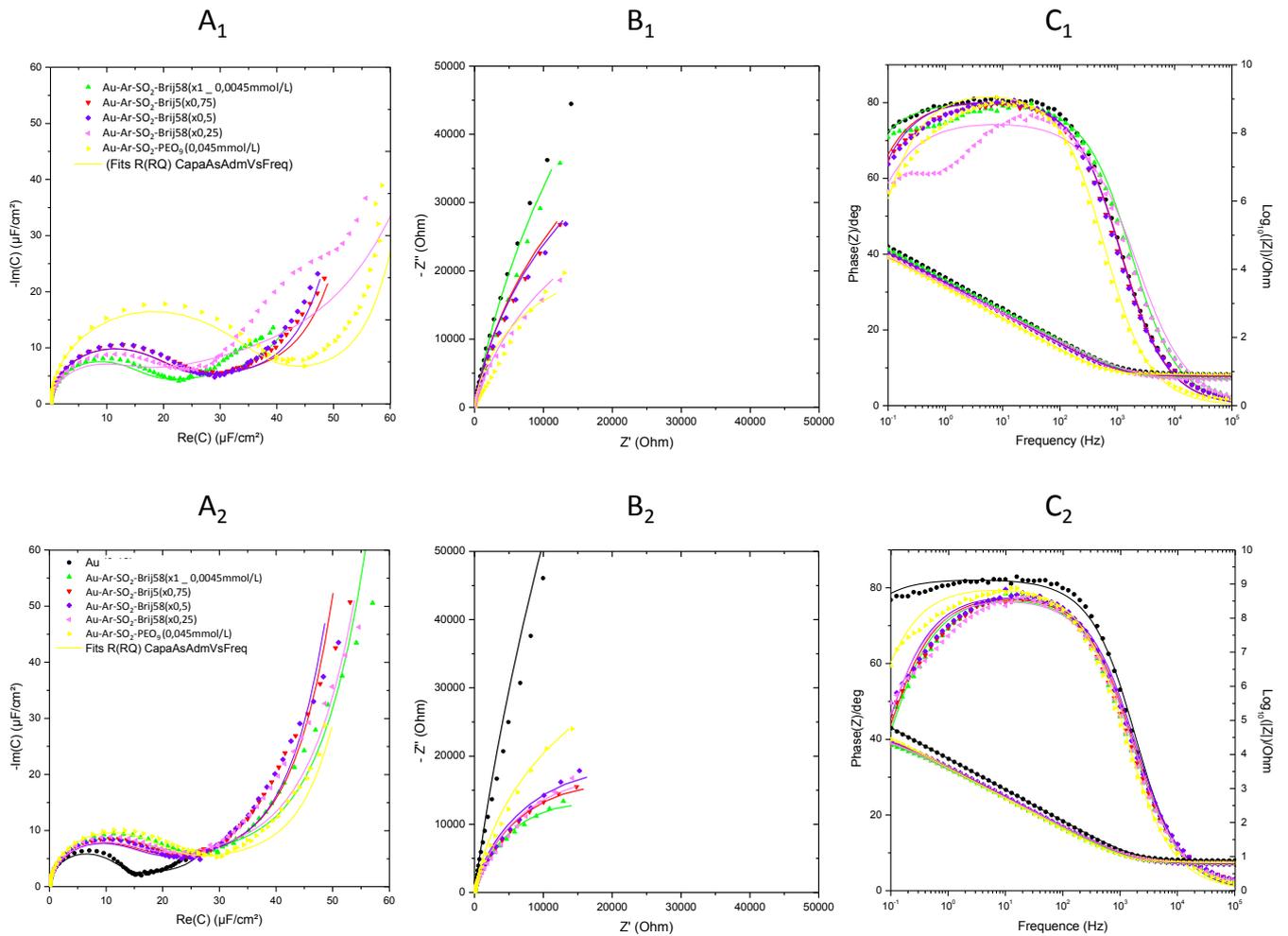


Figure 43 : Résultats EIS en mode non Faradique (NaCl 0,15mol/L) sur surfaces fonctionnalisées Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0$ et $[Brij58] = 0,0045 \text{ mmol/L}$, $[PEO_9-CH_3] = 0,045 \text{ mmol/L}$ (2 fois plus diluée que celle utilisée Ch II)

A) diagramme de Nyquist en capacitance, B) diagramme de Nyquist en impédance, C) diagramme de Bode et $|Z|=f(f)$. 1) et 2) pour la reproduction des expériences deux fois.

La Figure 44 présente les spectres EIS obtenus au-dessus de la concentration molaire critique à un mélange non équivalent, soit $[Brij58] = 1 \cdot C_{mc} = 0,08 \text{ mmol/L}$ et $[PEO_9-CH_3] = 10 \cdot C_{mc} = 0,8 \text{ mmol/L}$.

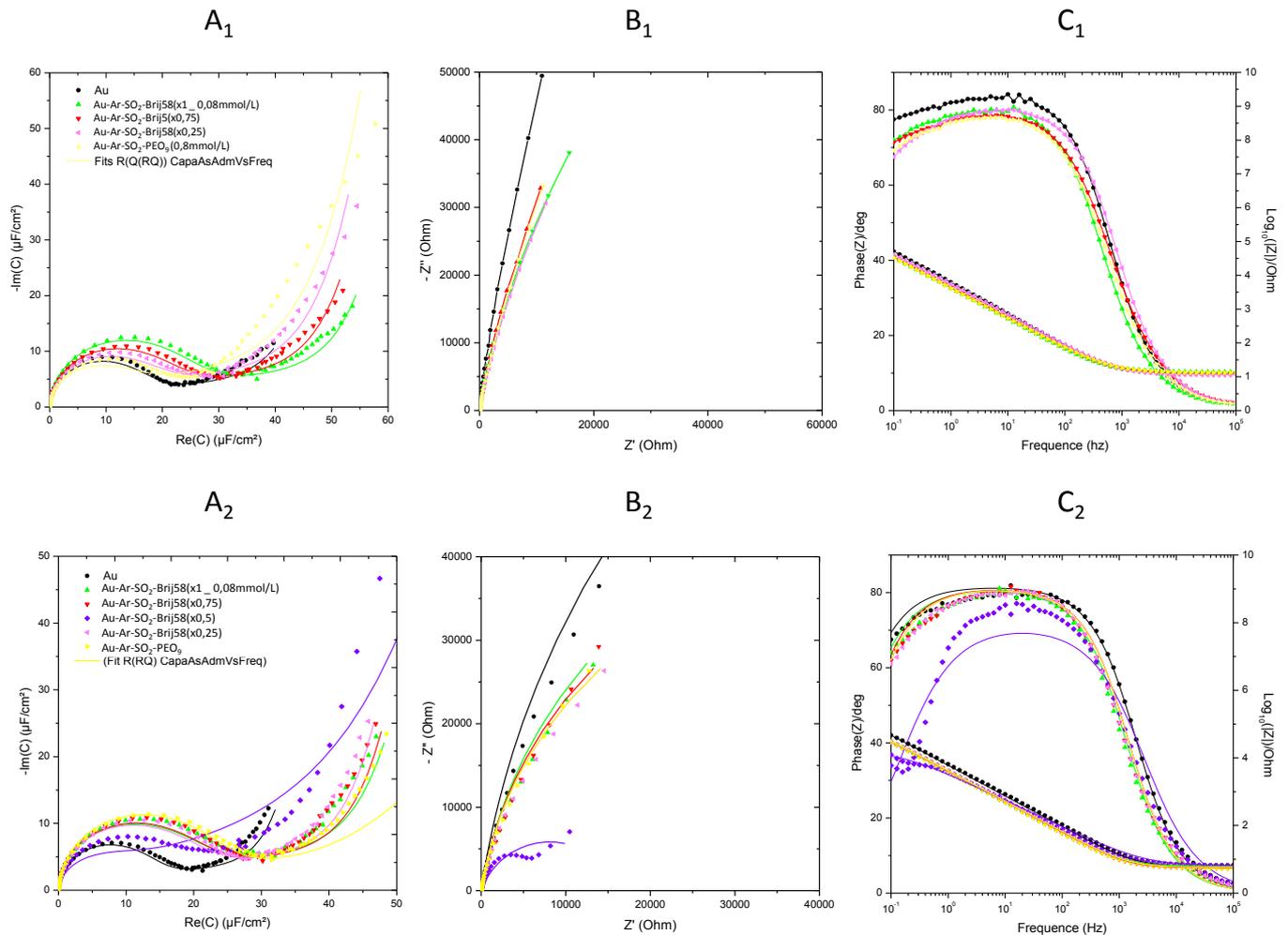


Figure 44 : Résultats EIS en mode non Faradique (NaCl 0,15mol/L) sur surfaces fonctionnalisées Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0$ et $[Brij58] = 0,08 \text{ mmol/L}$, $[PEO_9-CH_3] = 0,8 \text{ mmol/L}$ (10 fois plus concentrée que celle utilisée Ch II)

A) diagramme de Nyquist en capacitance, B) diagramme de Nyquist en impédance, C) diagramme de Bode et $|Z|=f(f)$. 1) et 2) pour la reproduction des expériences deux fois.

La Figure 45 présente les résultats EIS obtenus 100 fois au-dessus de la concentration molaire critique, soit $[\text{Brij58}] = [\text{PEO}_9\text{-CH}_3] = 8\text{mmol/L}$.

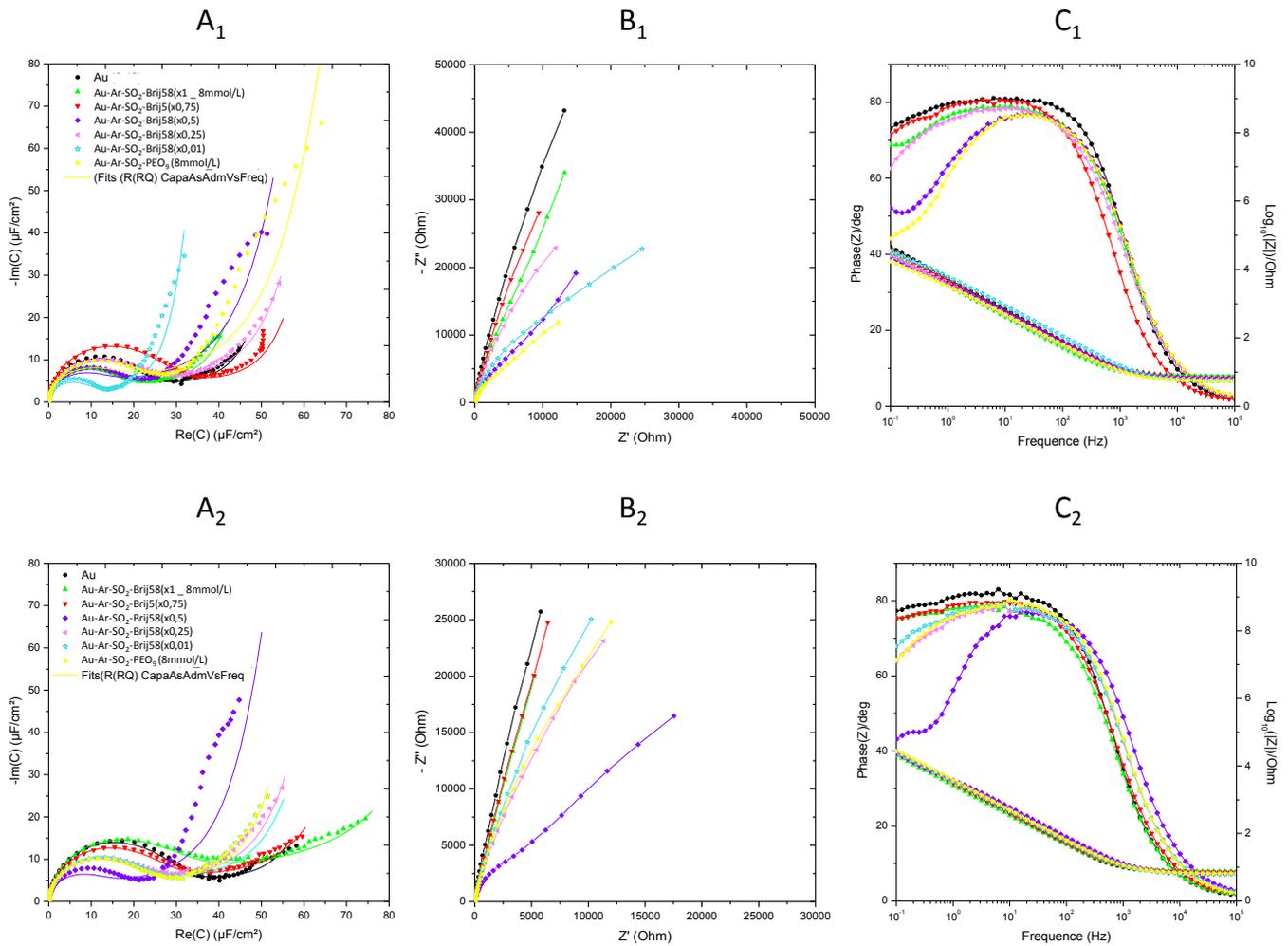


Figure 45 : Résultats EIS en mode non Faradique ($\text{NaCl } 0,15\text{mol/L}$) sur surfaces fonctionnalisées $\text{Au-Ar-SO}_2\text{-Brij58}(x_i)\text{-PEO}_9\text{-CH}_3(1-x_i)$ avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,01 ; 0$ et $[\text{Brij58}] = [\text{PEO}_9\text{-CH}_3] = 8\text{mmol/L}$ (100 fois plus concentrée que celle utilisée Ch II)

La Figure 46 présente les résultats EIS obtenus 1000 fois au-dessus de la concentration molaire critique, soit $[\text{Brij58}] = [\text{PEO}_9\text{-CH}_3] = 8\text{mmol/L}$.

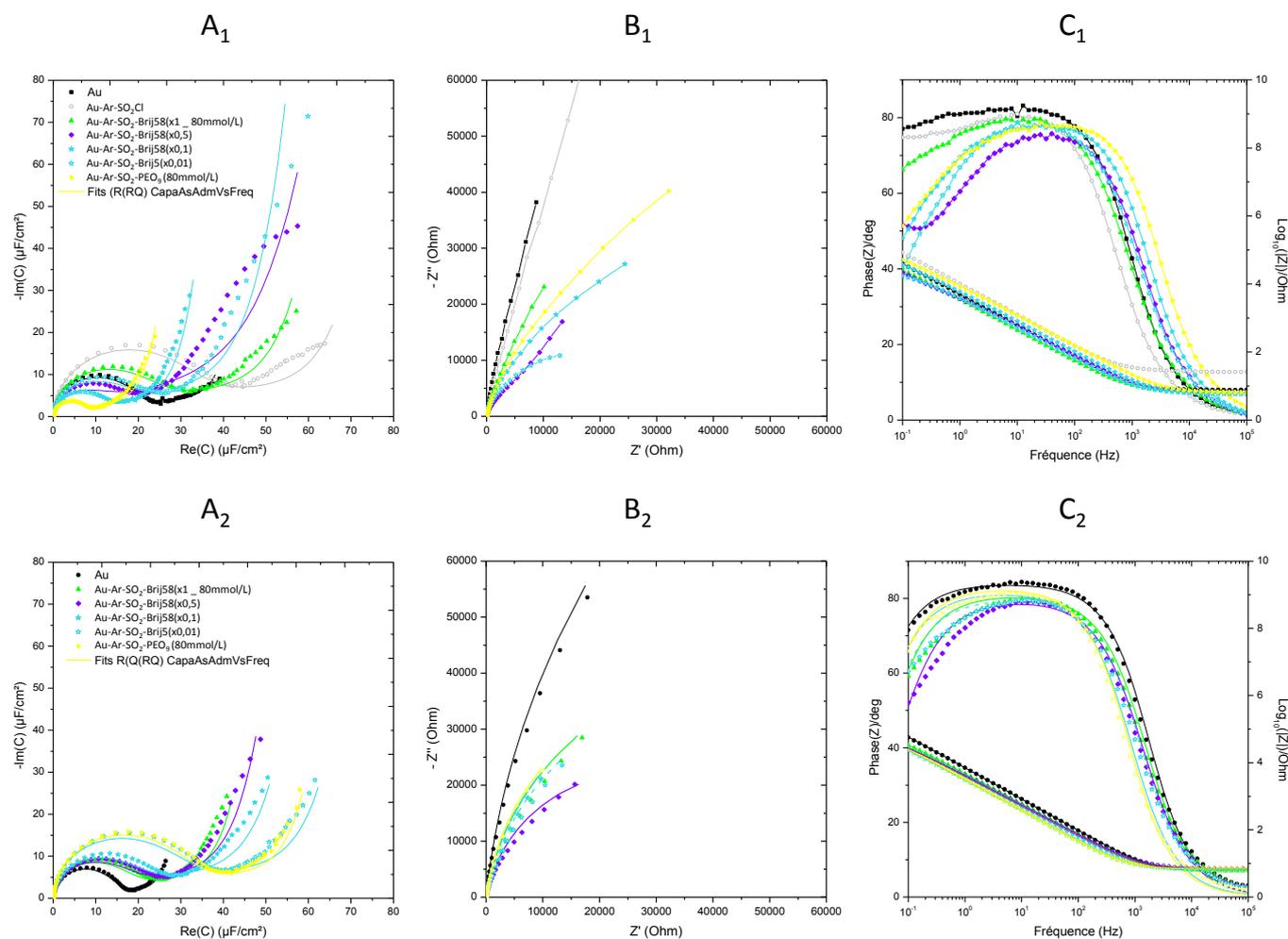


Figure 46 : Résultats EIS en mode non Faradique (NaCl 0,15 mol/L) sur surfaces fonctionnalisées Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,5 ; 0,1 ; 0,01 ; 0$ et $[\text{Brij58}] = [\text{PEO}_9\text{-CH}_3] = 80\text{mmol/L}$ (100 fois plus concentrée que celle utilisée Ch II)

A) diagramme de Nyquist en capacitance, B) diagramme de Nyquist en impédance, C) diagramme de Bode et $|Z|=f(f)$. 1) et 2) pour la reproduction des expériences deux fois.

Dans ce bilan des spectres EIS nous remarquons que le comportement singulier de la fonctionnalisation Ar-SO₂-Brij58(x0,5) se retrouve plusieurs fois (très visuel en représentation Bode de la phase de Z). Cet effet n'est donc pas lié à la concentration micellaire du Brij58, il est donc possible de travailler proche de la Cmc. D'autre part nous observons une plus grande dispersion des spectres avec l'augmentation de la concentration du Brij58 (100x et 1000xCmc) qui commencent à présenter deux systèmes : un premier demi-cercle aux hautes fréquences puis un second début d'arc de cercle aux basses fréquences (Figure 47). Ces systèmes sont très difficilement modélisable avec les circuits équivalents classiques utilisés pour les SAMs dans la

littérature et présentés chapitre II. Des agrégats ou micelles interagissent certainement avec l'électrode fonctionnalisée.

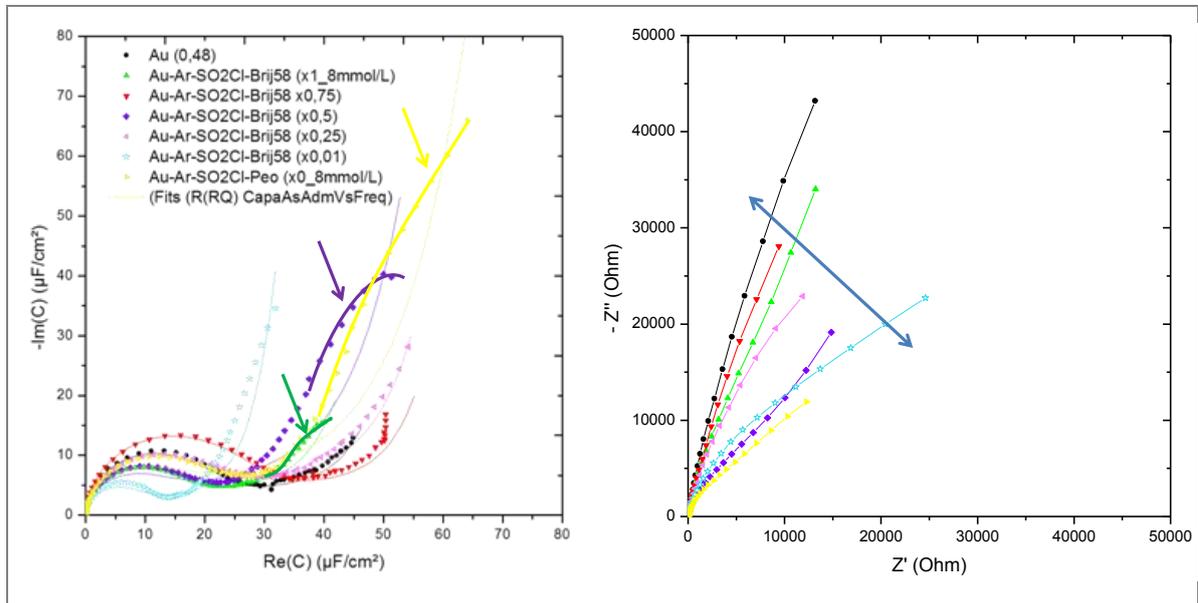


Figure 47 : Dispersité des spectres EIS et présence de deux systèmes d'arc de cercle illustrées sur les surfaces fonctionnalisées Au-Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,01 ; 0$ et $[Brij58] = [PEO_9-CH_3] = 8\text{mmol/L}$

Diagramme de Nyquist en capacitance à droite et en impédance à gauche

Nous avons néanmoins comparé les paramètres d'ajustement des spectres EIS ajustés par le modèle $R_s(R_{Ci}Q_{ac})$ de la capacité sur des surface d'or, des surfaces fonctionnalisées Brij58 et des surfaces fonctionnalisées PEO₉-CH₃. Ils sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Ajustement des spectres EIS pour les surfaces d'or, Au-Ar-SO₂-Brij58 et Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃

Modèle RuQRn	Au				Ak100%				Peo100%			
	R/Wcm ²	Q1/Fcm ⁻²	Phi1	R2/Wcm ²	R/Wcm ²	Q1/Fcm ⁻²	Phi1	R2/Wcm ²	R/Wcm ²	Q1/Fcm ⁻²	Phi1	R2/Wcm ²
A0u05B0u5 19052004					6,37	3,92E-05	8,95E-01	1,70E+05	8,15	6,09E-05	9,24E-01	4,10E+04
A0u05B0u5 10062014	7,64	2,48E-05	9,18E-01	4,52E+05	6,16	5,39E-05	8,67E-01	3,17E+04	6,66	4,77E-05	8,96E-01	7,13E+04
A1B1 02042014	8,56	3,84E-05	9,38E-01	1,90E+05	6,37	4,58E-05	9,06E-01	8,61E+04	5,50	4,76E-05	9,10E-01	8,45E+04
A1B1 07022014	6,19	3,07E-05	9,12E-01	1,69E+05	8,69	5,38E-05	8,87E-01	1,97E+05	8,76	5,73E-05	9,08E-01	1,25E+05
A1B10 05062014	7,21	3,84E-05	9,02E-01	3,62E+05	6,23	5,26E-05	9,07E-01	1,31E+05	5,12	5,30E-05	8,57E-01	3,59E+04
A100B100 18062014	7,37	4,47E-05	9,09E-01	2,04E+05	7,40	4,03E-05	8,90E-01	1,36E+05	5,59	6,10E-05	8,47E-01	2,48E+04
A100B100 19092014	7,29	5,50E-05	9,17E-01	2,27E+05	7,62	7,33E-05	8,85E-01	2,12E+05	6,74	4,99E-05	8,92E-01	8,59E+04
A1000B1000 07072014	6,73	2,52E-05	9,36E-01	2,41E+05	6,34	3,98E-05	9,06E-01	7,52E+04	6,98	5,66E-05	9,24E-01	8,19E+04
A1000B1000 17092014	7,68	3,70E-05	9,20E-01	3,09E+05	6,73	5,42E-05	8,95E-01	8,41E+04	6,50	2,32E-05	8,69E-01	9,61E+04

Comparaison Verticale des Données

Min	6,19	2,48E-05	9,02E-01	1,69E+05	6,16	3,92E-05	8,67E-01	3,17E+04	5,12	2,32E-05	8,47E-01	2,48E+04
Max	8,56	5,50E-05	9,38E-01	4,52E+05	8,69	7,33E-05	9,11E-01	2,12E+05	8,76	6,10E-05	9,24E-01	1,48E+05
Etendue	2,37	3,02E-05	3,59E-02	2,83E+05	2,52	3,41E-05	4,34E-02	1,81E+05	3,64	3,79E-05	7,67E-02	1,24E+05
Ecart-Type	0,70	9,82E-06	1,24E-02	9,71E+04	0,86	1,04E-05	1,33E-02	5,85E+04	1,20	1,11E-05	2,66E-02	3,90E+04
Moyenne	7,97	3,59E-05	9,20E-01	2,80E+05	7,60	4,96E-05	8,95E-01	1,29E+05	7,35	5,02E-05	8,92E-01	7,95E+04
Coefficient de variation (%)	8,75	27,37	1,34	34,66	11,26	20,96	1,49	45,45	16,40	22,04	2,98	48,98

Comparaison Horizontale des Données

R/Wcm ²			Q1/Fcm ⁻²			Phi1			R2/Wcm ²		
Moyenne	Ecart-Type	Coefficient de variation (%)	Moyenne	Ecart-Type	Coefficient de variation (%)	Moyenne	Ecart-Type	Coefficient de variation (%)	Moyenne	Ecart-Type	Coefficient de variation (%)
7,26	1,26E+00	17,33	5,01E-05	1,54E-05	30,65	9,10E-01	2,01E-02	2,21	1,05E+05	9,09E+04	86,30
6,82	7,50E-01	11,00	4,22E-05	1,53E-05	36,33	8,94E-01	2,55E-02	2,86	1,85E+05	2,32E+05	125,40
6,81	1,58E+00	23,17	4,39E-05	4,87E-06	11,08	9,18E-01	1,76E-02	1,91	1,20E+05	6,06E+04	50,39
7,97	1,05E+00	13,15	5,65E-05	1,73E-05	30,63	9,10E-01	1,96E-02	2,15	1,38E+05	5,46E+04	39,50
6,19	1,04E+00	16,88	4,80E-05	8,29E-06	17,27	8,89E-01	2,75E-02	3,09	1,76E+05	1,68E+05	95,27
6,79	1,03E+00	15,22	4,87E-05	1,09E-05	22,42	8,82E-01	3,17E-02	3,59	1,22E+05	9,07E+04	74,54
7,22	4,44E-01	6,16	5,94E-05	1,23E-05	20,74	8,98E-01	1,69E-02	1,88	1,75E+05	7,75E+04	44,30
6,68	3,23E-01	4,84	4,05E-05	1,57E-05	38,83	9,22E-01	1,47E-02	1,60	1,33E+05	9,37E+04	70,67
7,10	5,73E-01	8,07	4,45E-05	1,80E-05	40,49	8,99E-01	2,30E-02	2,56	1,53E+05	1,05E+05	68,66

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la résistance de solution R_s est indépendante de la surface, ce qui se voit au travers de ses valeurs, quelque soit l'expérience menée.

- La comparaison des paramètres sur la surface d'or polie de l'électrode millimétrique nous donne une information sur la dispersité des valeurs non liée à la modification de surface. Ainsi nous trouvons un coefficient de variation d'environ 27% sur la capacité Q_{dc} , 35% sur la résistance liée au transfert ionique R_{ci} et 1,3% sur le facteur α_{dc} ;

- Concernant les surfaces fonctionnalisées, les paramètres qui varient le plus sont la résistance R_{ci} puis la capacitance Q_{dc} . Au sein d'un même type de surface (groupe de

plusieurs concentrations), cette variation reste de l'ordre de la variation sur or brut pour la capacitance (~22%) mais est un peu plus élevée pour la résistance de défauts (~47%). Il faut considérer que chaque expérience passe par un polissage manuel de l'électrode millimétrique, ce qui apporte une dispersion ;

- La comparaison horizontale des données montre que les paramètres R_{Ci} et Q_{dc} varient encore plus d'une surface à l'autre (entre Au, Au-Ar-SO₂-Brij58 et Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃), ~75% pour R_{Ci} et ~30% pour Q_{dc} .

Ceci nous montre que les variations observées au sein d'un même type de surface ne correspondent pas à des variations aussi grandes qu'entre des surfaces de nature différentes. La concentration des solutions utilisées pour tremper l'électrode et la fonctionnalisation intervient donc peu sur la structure finale de la fonctionnalisation.

Nous présentons ensuite les surfaces observées par AFM pour différentes concentrations de fonctionnalisation et constater leurs effets. Les mesures AFM ne pouvant se faire sur l'électrode d'or, elles ont été réalisées sur les électrodes de chrome élaborées au laboratoire (chapitre IV). Les mesures AFM (Figure 49) nous ont montré que pour des surfaces fonctionnalisées à partir de solution Brij58 et PEO₉-CH₃ concentrés sous la Cmc et jusqu'à dix fois la Cmc, la topographie de surface reste proche de celle du chrome avec une rugosité du même ordre ou qui augmente légèrement (Figure 48). Cependant pour les surfaces fonctionnalisées par des solutions très supérieures à la Cmc, les rugosités étaient un peu plus élevées et la topographie montre un grain de surface plus gros que le chrome. Comme évoqué précédemment, ceci peu s'expliquer par des agrégats de Brij58 mais certainement plus par la présence du PEO qui peut se gonfler d'eau.

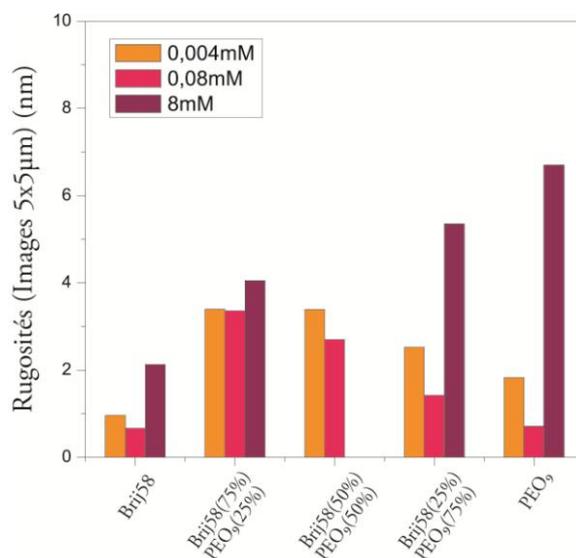


Figure 48 : Histogramme des rugosités de surfaces de chrome fonctionnalisées Ar-SO₂-Brij58 (xi) - PEO₉-CH₃ (1-xi) avec i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0 pour [Brij58]=0,004mmol/L (~1/20xCmc) [Brij58]=0,08mmol/L (~Cmc) et [Brij58]=8mmol/L (100xCmc)

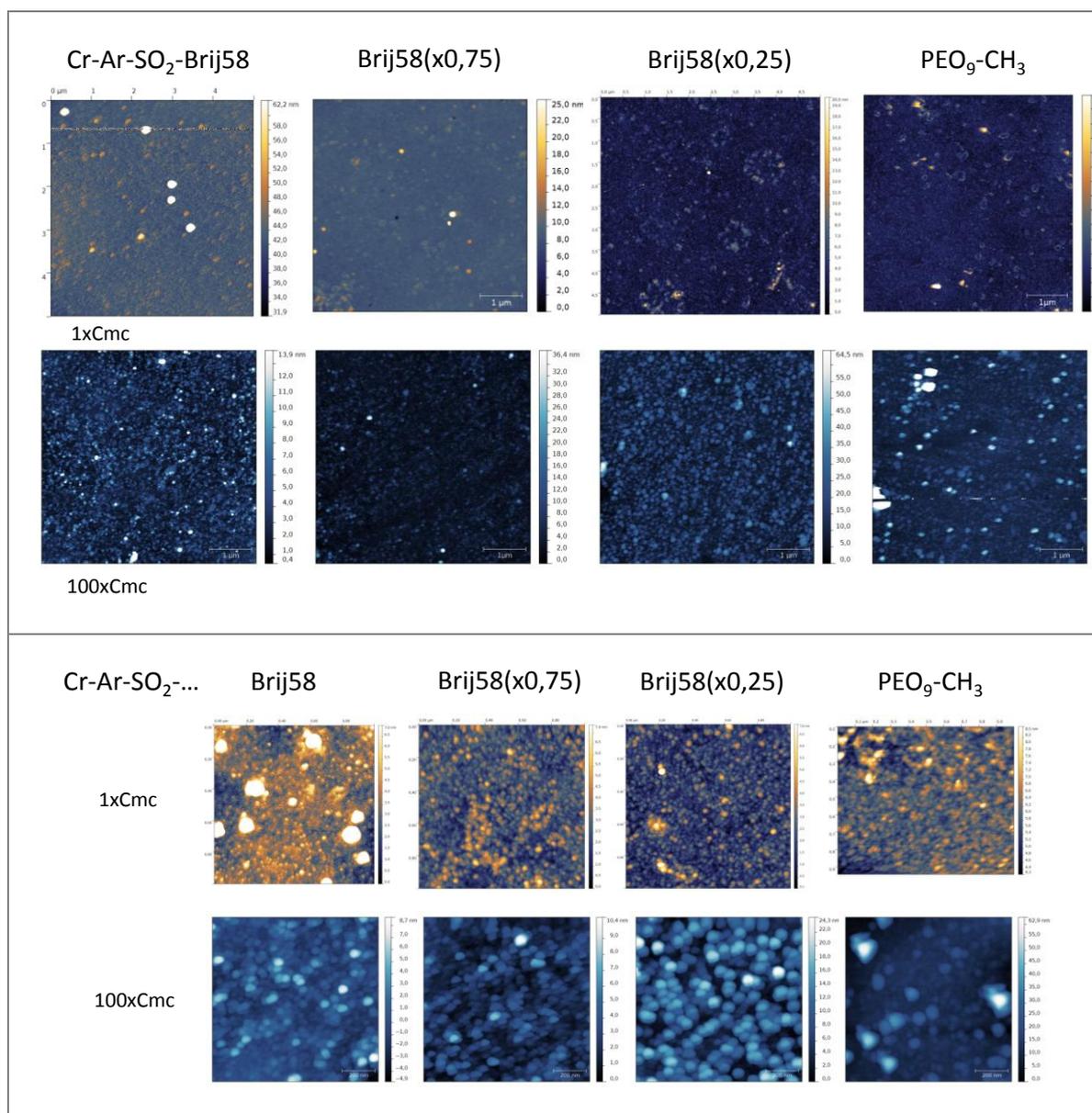


Figure 49 : Images AFM 5x5µm (en haut) et 1x1µm (en bas) des surfaces de chrome fonctionnalisées Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,25 ; 0$ pour $[Brij58] = [PEO_9-CH_3] = 0,08\text{mmol/L} (\sim Cmc)$ et $[Brij58] = [PEO_9-CH_3] = 8\text{mmol/L} (100xCmc)$

Bibliographie Ch.II

- Adenier, A., C. Combellas, et al. (2006). "Formation of Polyphenylene Films on Metal Electrodes by Electrochemical Reduction of Benzenediazonium Salts." Chemistry of Materials **18**(8): 2021-2029.
- Advincula, R. C., W. J. Brittain, et al. (2004). Polymer brushes, Wiley Online Library.
- Allongue, P., M. Delamar, et al. (1997). "Covalent Modification of Carbon Surfaces by Aryl Radicals Generated from the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts." Journal of the American Chemical Society **119**(1): 201-207.
- Bahr, J. L., J. Yang, et al. (2001). "Functionalization of Carbon Nanotubes by Electrochemical Reduction of Aryl Diazonium Salts: A Bucky Paper Electrode." Journal of the American Chemical Society **123**(27): 6536-6542.
- Baranton, S. and D. Bélanger (2005). "Electrochemical Derivatization of Carbon Surface by Reduction of in Situ Generated Diazonium Cations." The Journal of Physical Chemistry B **109**(51): 24401-24410.
- Bard, A. J. and L. R. Faulkner (2001). "Basic potential step methods." Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications: 156-225.
- Belanger, D. and J. Pinson (2011). "Electrografting: a powerful method for surface modification." Chemical Society Reviews **40**(7): 3995-4048.
- Bisquert, J. and A. Compte (2001). "Theory of the electrochemical impedance of anomalous diffusion." Journal of Electroanalytical Chemistry **499**(1): 112-120.
- Budvytyte, R., G. Valincius, et al. (2013). "Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules." Langmuir **29**(27): 8645-8656.
- Chapman, R. G., E. Ostuni, et al. (2000). "Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins." Journal of the American Chemical Society **122**(34): 8303-8304.
- Chen, J., J. Zhang, et al. (2008). "Electrochemical Biosensor for Detection of BCR/ABL Fusion Gene Using Locked Nucleic Acids on 4-Aminobenzenesulfonic Acid-Modified Glassy Carbon Electrode." Analytical Chemistry **80**(21): 8028-8034.
- Cole, K. S. and R. H. Cole (1941). "Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics." The Journal of Chemical Physics **9**(4): 341-351.
- D'Amour, M. and D. Bélanger (2003). "Stability of Substituted Phenyl Groups Electrochemically Grafted at Carbon Electrode Surface." The Journal of Physical Chemistry B **107**(20): 4811-4817.
- Daniel, C., K. E. Sohn, et al. (2007). "Structural characterization of an elevated lipid bilayer obtained by stepwise functionalization of a self-assembled alkenyl silane film." Biointerphases **2**(3): 109-118.
- Dubois, L. H., B. R. Zegarski, et al. (1993). "Molecular Ordering of Organosulfur Compounds on Au(111) and Au(100) - Adsorption from Solution and in Ultrahigh-Vacuum." Journal of Chemical Physics **98**(1): 678-688.

- Elofson, R. (1958). "The polarographic reduction of diazotized aromatic amines." Canadian Journal of Chemistry **36**(8): 1207-1210.
- Esnault, C., B. Chénais, et al. (2013). "Electrochemically Modified Carbon and Chromium Surfaces for AFM Imaging of Double-Strand DNA Interaction with Transposase Protein." ChemPhysChem **14**(2): 338-345.
- Fall, S. (2011). Fabrication et analyse de nanomatériaux à bases d'oxydes par des techniques de diffusion de rayonnement, Le Mans.
- Gavish, N. and K. Promislow (2012). "Dependence of the dielectric constant of electrolyte solutions on ionic concentration." arXiv preprint arXiv:1208.5169.
- Green, N. M. (1990). "Avidin and streptavidin." Methods in enzymology **184**: 51.
- Haccoun, J., C. Vautrin-UI, et al. (2008). "Electrochemical grafting of organic coating onto gold surfaces: Influence of the electrochemical conditions on the grafting of nitrobenzene diazonium salt." Progress in Organic Coatings **63**(1): 18-24.
- Harder, P., M. Grunze, et al. (1998). "Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption." The Journal of Physical Chemistry B **102**(2): 426-436.
- Hardy, G. J., R. Nayak, et al. (2012). "Biomimetic supported lipid bilayers with high cholesterol content formed by alpha-helical peptide-induced vesicle fusion." Journal of Materials Chemistry **22**(37): 19506-19513.
- Heinrich, F., T. Ng, et al. (2009). "A New Lipid Anchor for Sparsely Tethered Bilayer Lipid Membranes†." Langmuir **25**(7): 4219-4229.
- Hertrich, S., F. Stetter, et al. (2014). "Highly Hydrated Deformable Polyethylene Glycol-Tethered Lipid Bilayers." Langmuir **30**(31): 9442-9447.
- Hirschorn, B., M. E. Orazem, et al. (2010). "Constant-Phase-Element Behavior Caused by Resistivity Distributions in Films." Corrosion (General) - 217th Ecs Meeting **28**(24): 77-94.
- Hu, F., D. H. Karweik, et al. (1985). "Activation and deactivation of glassy carbon electrodes." Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry **188**(1): 59-72.
- Hu, Y.-W., T. Yang, et al. (2010). "Highly Sensitive Indicator-Free Impedance Sensing of DNA Hybridization Based on Poly(m-aminobenzenesulfonic acid)/TiO₂ Nanosheet Membranes with Pulse Potentiostatic Method Preparation." Chemistry – A European Journal **16**(6): 1992-1999.
- Janek, R. P., W. R. Fawcett, et al. (1998). "Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on Au (111): sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes." Langmuir **14**(11): 3011-3018.
- Kerner, Z. and T. Pajkossy (1998). "Impedance of rough capacitive electrodes: the role of surface disorder." Journal of Electroanalytical Chemistry **448**(1): 139-142.
- Kim, C.-H., S.-I. Pyun, et al. (2003). "An investigation of the capacitance dispersion on the fractal carbon electrode with edge and basal orientations." Electrochimica Acta **48**(23): 3455-3463.
- Lasia, A. (2014). Electrochemical impedance spectroscopy and its applications, Springer.

- Leroux, Y. R., H. Fei, et al. (2010). "Efficient Covalent Modification of a Carbon Surface: Use of a Silyl Protecting Group To Form an Active Monolayer." Journal of the American Chemical Society **132**(40): 14039-14041.
- Liu and J. J. Gooding (2006). "An Interface Comprising Molecular Wires and Poly(ethylene glycol) Spacer Units Self-Assembled on Carbon Electrodes for Studies of Protein Electrochemistry." Langmuir **22**(17): 7421-7430.
- Macdonald, J. R. (1953). "Theory of ac Space-Charge Polarization Effects in Photoconductors, Semiconductors, and Electrolytes." Physical Review **92**(1): 4-17.
- Macdonald, J. R. (1971). "Electrical Response of Materials Containing Space Charge with Discharge at the Electrodes." The Journal of Chemical Physics **54**(5): 2026-2050.
- McGillivray, D. J., G. Valincius, et al. (2007). "Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes." Biointerphases **2**(1): 21-33.
- Newman, J. (1966). "Resistance for Flow of Current to a Disk." Journal of the Electrochemical Society **113**(5): 501-502.
- Newman, J. (1970). "Frequency Dispersion in Capacity Measurements at a Disk Electrode." Journal of the Electrochemical Society **117**(2): 198-203.
- Ng, K., D. W. Pack, et al. (1995). "Engineering Protein-Lipid Interactions: Targeting of Histidine-Tagged Proteins to Metal-Chelating Lipid Monolayers." Langmuir **11**(10): 4048-4055.
- Nisancioglu, K. and J. Newman (1974). "The Short-Time Response of a Disk Electrode." Journal of the Electrochemical Society **121**(4): 523-527.
- Pajkossy, T., T. Wandlowski, et al. (1996). "Impedance aspects of anion adsorption on gold single crystal electrodes." Journal of Electroanalytical Chemistry **414**(2): 209-220.
- Parsons, R. (1959). "The relation between the capacity of the electrode double layer and the adsorption of surface-active material." Transactions of the Faraday Society **55**(0): 999-1006.
- Pilard, J. F., G. Marchand, et al. (1998). "Chemical synthesis at solid interfaces. On the use of conducting polythiophenes equipped of adequate linkers allowing a facile and highly selective cathodic S · N bond scission with a fully regenerating resin process." Tetrahedron **54**(32): 9401-9414.
- Pinson, J. and F. Podvorica (2005). "Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts." Chemical Society Reviews **34**(5): 429-439.
- Roussille, L., G. Brotons, et al. (2011). "Surface characterization and efficiency of a matrix-free and flat carboxylated gold sensor chip for surface plasmon resonance (SPR)." Analytical and Bioanalytical Chemistry **401**(5): 1601-1617.
- Sapoval, B. (1995). "Linear and non-linear behavior of fractal and irregular electrodes." Solid State Ionics **75**: 269-273.
- Toupin, M. and D. Bélanger (2007). "Thermal Stability Study of Aryl Modified Carbon Black by in Situ Generated Diazonium Salt." The Journal of Physical Chemistry C **111**(14): 5394-5401.

- Umadevi, S., V. Ganesh, et al. (2014). "Liquid crystal (LC) monolayer on Indium Tin Oxide (ITO): structural and electrochemical characterization." RSC Advances **4**(32): 16409-16417.
- Valincius, G., T. Meškauskas, et al. (2011). "Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes." Langmuir **28**(1): 977-990.
- Vanderah, D. J., R. S. Gates, et al. (2003). "Isostructural Self-Assembled Monolayers. 1. Octadecyl 1-Thiaoligo(ethylene oxides)." Langmuir **19**(7): 2612-2620.
- Wang, H. and L. Pilon (2012). "Intrinsic limitations of impedance measurements in determining electric double layer capacitances." Electrochimica Acta **63**: 55-63.

TABLE DES MATIERES CH.III

CH. III. FORMATION DE MEMBRANES MODELES ANCREES SUR ELECTRODE..... 123

A. SUIVI PAR SPR SUR BIOPUCE D'OR FONCTIONNALISEE	123
1. DEROULEMENT DES EXPERIENCES SPR ET RESULTATS.....	124
2. CONCLUSION SUR LES CINETIQUES SPR	131
B. SUIVI PAR QCM SUR QUARTZ D'OR FONCTIONNALISE.....	132
1. DEROULEMENT DES EXPERIENCES QCM ET RESULTATS	133
2. CONCLUSION SUR LES CINETIQUES QCM.....	137
C. EFFICACITE DES FONCTIONNALISATIONS POUR L'IMMOBILISATION DES MEMBRANES.	137
1. LES DIFFERENTES CINETIQUES D'ADSORPTION EN QCM.....	137
a. Discussion	137
b. Conclusion	139
2. COUPLAGE DES TECHNIQUES QCM ET SPR.....	140
a. Discussion	140
b. Conclusions sur l'immobilisation de membrane sur la fonctionnalisation.....	142

ANNEXES CH.III 144

A. PREPARATION DES SUVs NON FLUORESCENTES	144
1. SANS MARQUEUR FLUORESCENT.....	144
2. AVEC MARQUEUR NDB	145
B. TECHNIQUE D'ANALYSE « RESONANCE PLASMON DE SURFACE »	146
C. TECHNIQUE D'ANALYSE « MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ »	147
D. TECHNIQUE DE MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE.....	148
E. VERIFICATION DE LA PRESENCE DE MEMBRANE SECHEE PAR AFM ET ANGLE DE CONTACT SUR LES SURFACES SPR	150

BIBLIOGRAPHIE CH.III..... 154

Ch. III. Formation de membranes modèles ancrées sur électrode

A. Suivi par SPR sur biopuce d'or fonctionnalisée

Les cinétiques d'adsorption des vésicules de DOPC sur nos fonctionnalisations ont été suivies par Résonance Plasmon de Surface (SPR)¹. Cette technique d'analyse sans marquage est sensible à de faibles variations d'indice de réfraction à l'interface substrat/solution. Elle permet de suivre la formation d'une membrane unique ainsi que l'ancrage des vésicules avec les différentes surfaces préparées sur de l'or. Les surfaces SPR (HORIBA™) que nous avons utilisées sont des lames de verres d'indice $\sim 1,515$ recouvertes d'une couche de chrome de 2nm utilisée pour ancrer un film mince d'or de 48nm d'épaisseur environ (Suraniti, Tumolo et al. 2007). La rugosité de ces couches commerciales mesurée par AFM atteint 1,2 nm.

Ces surfaces ont été fonctionnalisées selon les mêmes protocoles que ceux décrits dans le chapitre II. La Figure 1 montre le voltampérogramme de l'électro-réduction des sels de diazonium sur la couche d'or SPR pour obtenir la surface Au-Ar-SO₃H. La réduction est la même que sur micro-électrode d'or, le courant est simplement plus important puisque la surface est plus grande. Les surfaces sont ensuite immergées 5min dans PCl₅/CH₂Cl₂ (1/5 en v/v) pour pré-fonctionnaliser la surface et obtenir Au-Ar-SO₂Cl.

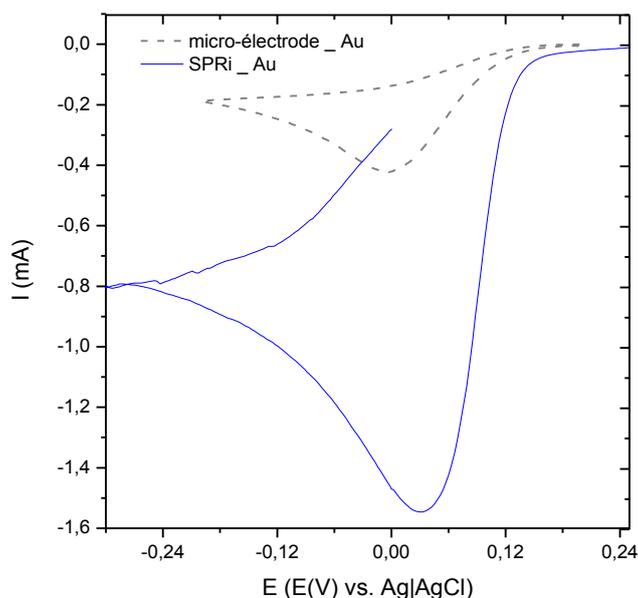
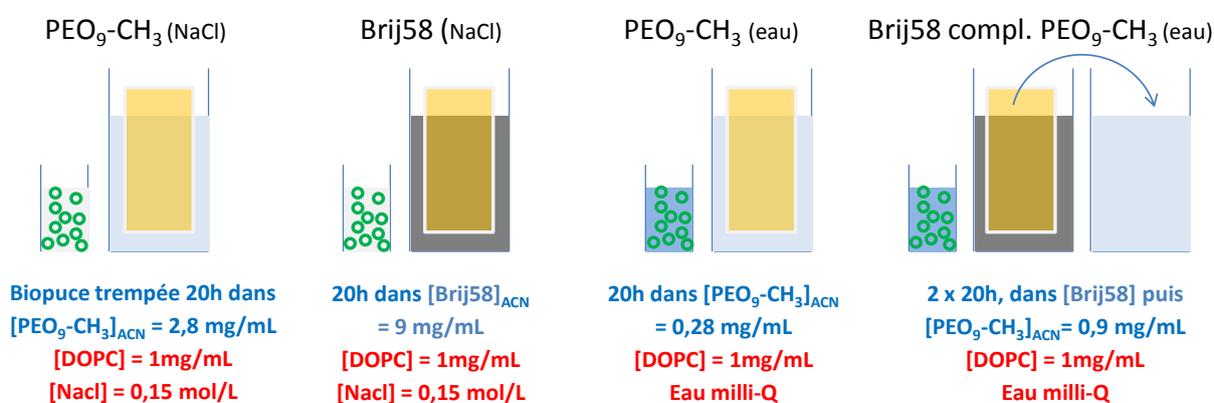


Figure 1 : Voltammétrie cyclique sur couche mince d'or SPR (trait plein vitesse de balayage 1mV/s) comparée à la mesure réalisée sur micro-électrode d'or (trait hachuré)

¹ Description de la technique dans l'annexe SPR. Dispositif utilisé : SPRi HORIBA Scientific. Surfaces utilisées : SPRi-Slide.

Six surfaces pré-fonctionnalisées Au-Ar-SO₂Cl ont été utilisées dans différentes conditions, l'objectif étant de comparer des cinétiques d'adsorption sur des surfaces fonctionnalisées PEO₉-CH₃ (soit Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃), PEO₂₃ (soit Au-Ar-SO₂-PEO₂₃-OH) et Brij58 (soit Au-Ar-SO₂-PEO₂₀-(CH₂)₁₅CH₃). Comme discuté au chapitre II, la fonctionnalisation par un PEO de petite taille (dès 3 monomères) est connue pour passiver efficacement une surface dans l'eau pure et la protéger de l'adhésion spontanée des protéines (Chapman, Ostuni et al. 2001) et membranes (Sackmann 1996). Dans un premier temps nous avons donc sélectionné un PEO_n de petite taille le PEO₉-CH₃ qui modifiera peu la rugosité puis nous avons essayé un PEO_n plus long, le PEO₂₃-OH.

Surface SPR trempées dans :



Pour la mesure SPR, l'adsorption des vésicules sur ces surfaces est faite en utilisant dans un cas NaCl 0,15 mol/L comme solvant de course et dans l'autre cas de l'eau milli-Q sans sels. Les vésicules de DOPC injectées ont été préparées dans ces mêmes solvants selon les protocoles décrits au chapitre I. Les surfaces ont ensuite été rincées à l'acétonitrile et à l'acétone puis séchées.

1. Déroulement des expériences SPR et résultats

Pour chaque mesure SPR, nous avons défini, manuellement via le logiciel de mesure, huit zones distinctes sur la surface de détection (cercles de 800µm de diamètre), servant de répliquas pour l'adsorption des vésicules (Figure 2). Afin de normaliser les huit zones pour la cinétique d'adsorption, une étape de calibration est nécessaire sur la surface utilisée et avant la mesure d'adsorption. Il s'agit de générer un saut d'indice optique dans le temps, soit par injection d'une solution tampon plus concentrée que le tampon de course (Figure 3), soit par injection de sucrose (3mg/mL) lorsque la solution de course est de l'eau milli-Q (Figure 4). Deux curseurs permettent de délimiter cette injection et le logiciel calcule les coefficients de calibration qui ramènent la réflectivité des huit zones au même niveau pour la solution de calibration. Nous constatons un bon retour à la ligne de base du

signal SPR, après injection des solutions de calibration et retour au solvant de course dans les deux cas et pour les huit zones.

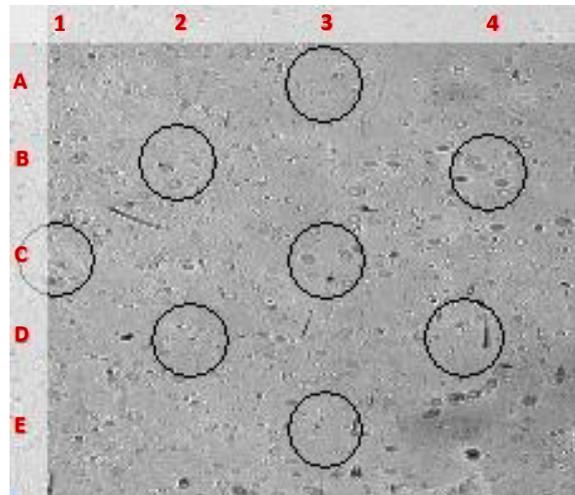


Figure 2 : Représentation des huit zones d'intérêt définies sur la surface SPR (numérotation correspondante)

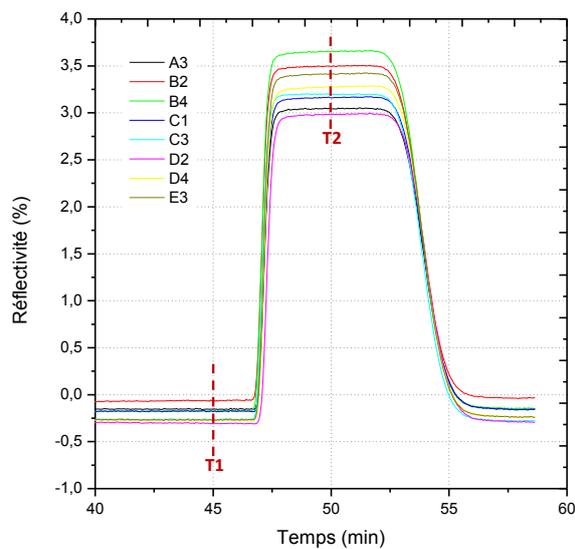


Figure 3 : Courbe de calibration (8 zones) dans NaCl

Injection d'une solution NaCl 0,187 mol/L (de 25% plus concentrée que la solution de course NaCl 0,15 mol/L)

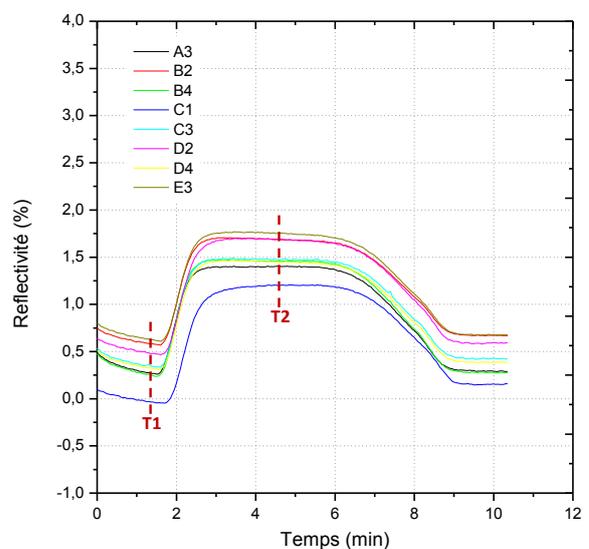


Figure 4 : Courbe de calibration (8 zones) dans l'eau

Injection d'une solution de sucrose (3mg/mL) pour l'utilisation d'eau milli-Q comme solvant de course

Après calibration et stabilisation de la ligne de base, l'expérience peut commencer avec l'injection des vésicules. Dans le cas des surfaces étudiées dans NaCl, les vésicules sont injectées à un flux de 5 μ L/min (Figure 5). L'injection dure 40min (temps dit d'association dans la solution de vésicules) et la mesure du plateau est poursuivie pendant au moins

40min pendant le rinçage (temps dit de dissociation sous flux de solution tampon). Il est préconisé de laisser un temps de dissociation trois fois plus long que le temps d'association pour assurer un bon renouvellement de la solution dans la cellule. Dans le cas des surfaces étudiées dans l'eau les vésicules sont injectées à un flux de 15µL/min (Figure 6). L'injection dure 13min au lieu de 40min.

Le logiciel SPRi trace les cinétiques en pourcentage de variation de la réflectivité, ΔR , puis convertit la variation globale (différence entre les deux plateaux mesurés, avant injection des vésicules et après injection plus 40min de rinçage) en masse localisée près de la couche d'or. L'Équation 1 est utilisée pour convertir la variation de réflectivité ΔR en taux de recouvrement surfacique Γ à la longueur d'onde de 810nm (Suraniti, Tumolo et al. 2007).

Équation 1

$$\Gamma = \frac{L_{ZC}}{S_{P,R} \cdot \partial n / \partial C} \cdot \Delta R$$
$$\text{où } L_{ZC} = \frac{c}{2\omega} \left\{ \text{Im} \left(\sqrt{\left(\frac{\varepsilon_d^2}{\varepsilon_m + \varepsilon_d} \right)} \right) \right\}^{-1}$$

- ε_m et ε_d sont les permittivités des milieux métalliques et diélectriques ;
- $\omega = \frac{2\pi}{\lambda}$ la profondeur de pénétration du plasmon dans le milieu couvrant diélectrique (milieu dit biologique) ;
- $\partial n / \partial C$ l'incrément d'indice des molécules cibles à détecter, c'est-à-dire l'augmentation d'indice de réfraction en fonction de la concentration de ces molécules
- $S_{P,R}$ la sensibilité en réflectivité à une variation d'indice de réfraction pour la SPR utilisée couplée par prisme.

Cette équation est valable dans l'hypothèse où l'épaisseur de la couche organique déposée est très petite devant la profondeur de pénétration de l'onde évanescente générée par le plasmon dans le milieu diélectrique, soit pour une couche de quelques dizaines de nanomètres. Dans ce cas, la relation entre la masse localisée à l'interface et la variation de réflectivité est pratiquement linéaire. Ainsi, une variation d'angle de l'extinction spéculaire due aux plasmons de 0,0001° correspond à une prise de masse d'environ 1pg/mm² pour des molécules biologiques et nous pouvons tracer directement la cinétique de masse immobilisée en fonction du temps. Ceci s'applique à la formation d'une bicouche phospholipidique unique mais pas forcément au cas de l'agrégation de vésicules qui ne fusionneraient pas et qui peuvent former une couche bien plus épaisse.

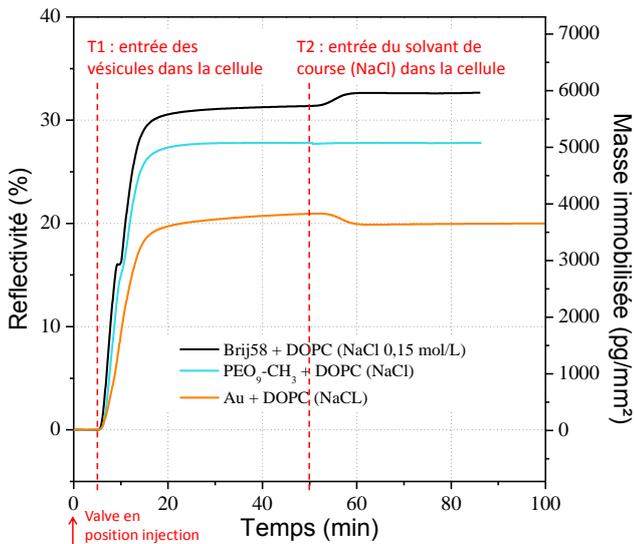
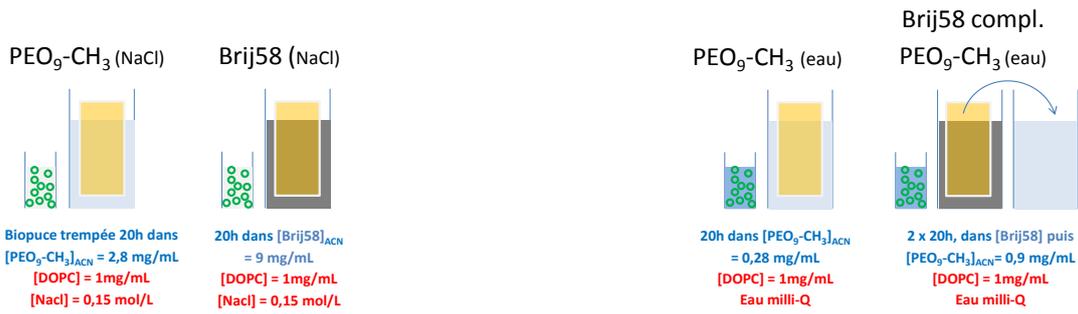


Figure 5 : Cinétique SPR d'adsorption des vésicules DOPC dans NaCl 0,15 mol/L à la première injection

Injection à t=5min de DOPC (1mg/mL) à 5µL/min. Cinétiques bleue sur surface Au-Ar-SO₂-PEO₉ et noire sur Au-Ar-SO₂-Brij

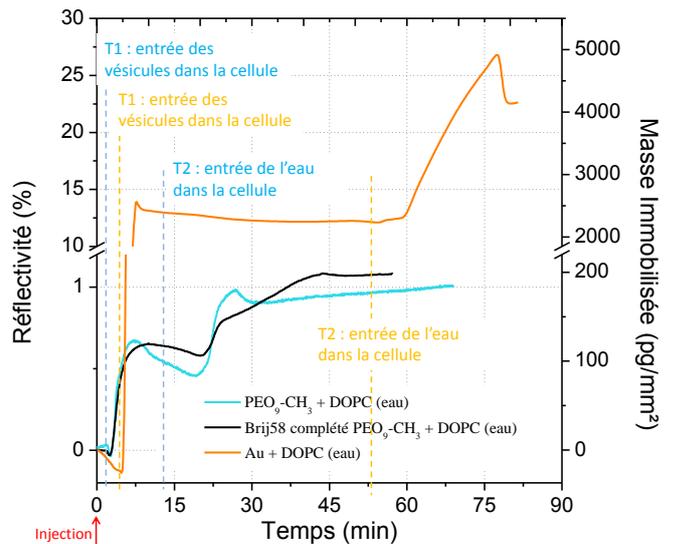


Figure 6 : Cinétique SPR d'adsorption des vésicules DOPC dans l'eau à la première injection

Injection à t=2.5min de DOPC (1mg/mL à 15µL/min). Cinétiques bleue sur surface Au-Ar-SO₂-PEO₉ et noire sur Au-Ar-SO₂-Brij et -PEO₉-CH₃

Ensuite, le nombre de bicouches déposées est estimé sur la base de la masse molaire d'une molécule de DOPC ($M_{\text{DOPC}} = 786,15 \text{ g/mol}$) et de sa surface par tête déterminée par rayons-X ($S_{\text{DOPC}} = 0,725 \text{ nm}^2$) (Nagle and Tristram-Nagle 2000). Pour une bicouche unique et complète on obtient une masse totale de $m_{1\text{Bi-DOPC}} = 3601,2 \text{ pg/mm}^2$. Les masses totales immobilisées sur la surface et leur équivalent en nombre de bicouches sont données dans le Tableau 1.

Les cinétiques sur la Figure 5 montrent une adsorption des vésicules de DOPC dans NaCl, sur les deux types de surface PEO₉-CH₃ et Brij58, correspondant à plus d'une bicouche complète en équivalent de masse (1,42 et 1,67 respectivement). Ces surfaces immobilisent davantage de membrane que la surface témoin d'or brut (1,02 bicouche complète en équivalent de masse). Dans le cas de l'eau, les cinétiques montrent une adsorption, au final, très faible de vésicules de DOPC sur les deux types de surface, PEO₉-CH₃ seule et Brij58 complété PEO₉-CH₃. Ces quantités correspondent à 0,05 bicouches en

masse. A concentration comparable de vésicules, SUVs préparées dans NaCl ou dans l'eau (vérifié par l'analyse de diffusion de la lumière), ces deux fonctionnalisations ont un comportement semblable mais nous constatons un comportement très différent en présence ou absence de NaCl.

Tableau 1 : Résultats des cinétiques d'adsorption SPR des vésicules de DOPC dans l'eau et dans NaCl sur PEO₉-CH₃ ou Brij 58 (un pg/mm² équivaut à 10 ng/cm²)

Surfaces SPR	Injection DOPC 1mg/mL		
	Réflectivité SPRi (%)	Masse immobilisée (pg/mm ²)	Nombre de bicouches équivalentes.
Au (NaCl)	19,985 ± 0,45	3677,35 ± 83,8	1,02 ± 0,02
Au (eau)	24,65 ± 0,9	4536,1 ± 533,8	1,26 ± 0,15
Au-Ar-SO ₂ -PEO ₉ -CH ₃ (NaCl)	27,80 ± 1,6	5115,2 ± 293,2	1,42 ± 0,08
Au-Ar-SO ₂ -Brij 58 (NaCl)	32,63 ± 0,89	6000,5 ± 163,1	1,67 ± 0,04
Au-Ar-SO ₂ - PEO ₉ -CH ₃ (eau)	1,04 ± 0,11	190,9 ± 19,9	0,053 ± 0,006
Au-Ar-SO ₂ -Brij 58 et - PEO ₉ -CH ₃ (eau)	1,08 ± 0,08	198 ± 15,3	0,055 ± 0,004

Dans l'eau pure, très peu de matière se dépose sur les surfaces fonctionnalisées (5% de couverture en équivalent bicouche). La littérature rapporte que le DOPC, l'EggPC et les phosphatidylcholines en général, s'adsorbent sur l'or nu (Keller and Kasemo 1998; Richter, Berat et al. 2006) mais peu d'études ont été réalisées sans sels. La mesure SPR que nous avons réalisée sur l'or nu dans l'eau pure montre que les vésicules s'adsorbent en même quantité que dans NaCl (1,02 et 1,26 bicouches équivalentes, après trois injections consécutives et identiques). En ayant un comportement très différent entre surfaces fonctionnalisées et or brut dans l'eau, ces mesures SPR montrent l'influence de la fonctionnalisation et excluent la présence de nombreuses zones d'or nu accessibles sur les surfaces fonctionnalisées. La présence d'un grand nombre de zones Au-Ar-SO₂Cl non fonctionnalisées par PEO₉-CH₃ devraient aussi adsorber de la membrane (de part leur caractère hydrophobe $\theta_{SO_2Cl} \sim 30^\circ$), cette possibilité est donc aussi écartée. Nous pouvons imaginer que le tapis de PEO₉-CH₃ souhaité est bien formé et empêche l'adsorption de membrane dans l'eau pure, mais qu'en revanche, la fonction Brij58 seule n'a pas immobilisé suffisamment de vésicules et n'a pas joué son rôle d'harpon dans l'eau pure. Les injections suivantes (seule la première est présentée ci-dessus) n'ont pas conduit à plus d'adsorption.

Seules les cinétiques en présence de sel, montrent une adsorption efficace dès la première injection et pour les deux fonctionnalisations (Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃ et Au-Ar-SO₂-Brij58). Le plateau qui est atteint reste bien stable, y compris à de forts flux de la solution tampon que nous avons progressivement portés à vitesse maximale (à partir de t=70min, jusqu'à 776 μL/min). Le PEO₉-CH₃ n'a donc pas apporté le coussin hydrophile souhaité, pour empêcher l'adsorption des vésicules.

La présence d'une terminaison PEO₉-CH₃ n'étant pas suffisante, nous avons donc décidé de tester une fonction plus hydrophile pour le coussin en utilisant une molécule PEO plus longue et terminée par un groupement hydroxyde hydrophile au lieu du CH₃ hydrophobe (PEO₂₃-OH, 1000g/mol, qualité Bio-Ultra). Le choix de 23 blocs PEO permet d'avoir une chaîne hydrophile de taille comparable à celle du Brij58 avec 20 blocs PEO avant sa chaîne hydrophobe. La cinétique d'adsorption est présentée Figure 7 et comparée à celles sur surfaces fonctionnalisées avec PEO-CH₉, Brij58 et Brij58 complété avec du PEO₂₃, mesurées dans les mêmes conditions.

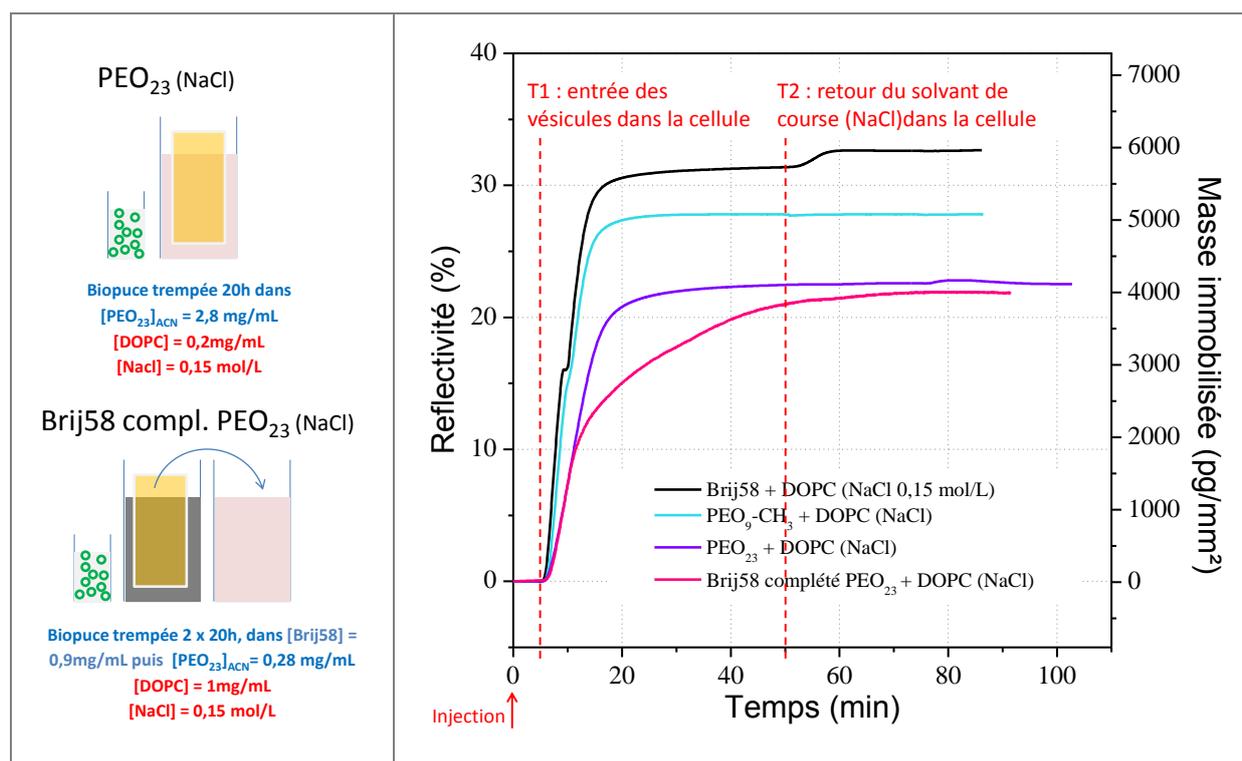


Figure 7 : Cinétique SPR d'adsorption des vésicules DOPC dans NaCl 0,15 mol/L sur surface fonctionnalisée Au-Ar-SO₂-PEO₂₃ et Au-Ar-SO₂-Brij58 et -PEO₂₃ à la première injection (à droite). Schéma de leur protocole de préparation (à gauche)

Injection à t=5min de DOPC (0,2mg/mL) à 5μL/min. Cinétiques violette sur surface Au-Ar-SO₂-PEO₂₃, bleue sur Au-Ar-SO₂-PEO₉ et noire sur Au-Ar-SO₂-Brij

Pour cette molécule plus hydrophile (PEO₂₃), nous observons encore une adsorption de membrane en présence de sel, dès la première injection (4103,1pg/mm²), correspondant à

1,14 bicouches équivalentes (Figure 7). Cette surface immobilise cependant moins de masse que le PEO₉.CH₃ plus court et moins hydrophile. D'autre part, elle donne la même masse finale immobilisée que la surface fonctionnalisée Brij58 puis complétée avec du PEO₂₃ ce qui laisse penser que cette molécule est plus efficace pour permettre la formation d'une bicouche lipidique et éviter l'accumulation de vésicules sur la fonctionnalisation et/ou des zones de bicouche incomplète certainement comme dans le cas du Brij seul.

Tableau 2 : Résultats des cinétiques d'adsorption SPR des vésicules de DOPC dans NaCl sur PEO₂₃ (un pg/mm² équivaut à 10 ng/cm²)

Surfaces SPR	Injection DOPC 0,2mg/mL		
	Réflectivité SPRi (%)	Masse immobilisée (pg/mm ²)	Nombre de bicouches
Au-Ar-SO ₂ -PEO ₂₃ (NaCl)	22,299 ± 1,696	4103,1 ± 312	1,14 ± 0,08
Au-Ar-SO ₂ -Brij58 et PEO ₂₃ (NaCl)	22,78 ± 3,49	4107,7 ± 479	1,14 ± 0,13

Après une seconde injection (vitesse doublée, 10µL/min) la masse immobilisée n'augmente pas et le plateau persiste, ce qui conforte le fait que la surface est saturée dès la première injection (Figure 8). Nous avons ensuite changé le solvant de course pour de l'eau milli-Q pendant quelques minutes, pour tester l'ancrage des membranes et induire la fusion par stress osmotique d'éventuelles vésicules stabilisées. Nous observons bien le saut d'indice lié à ce changement de solvant, puis un retour au plateau précédent une fois le solvant de course (NaCl 0,15 mol/L) réintroduit. Nous avons alors effectué une troisième injection de vésicules DOPC (15µL/min) et observé la persistance du plateau. Dans l'hypothèse d'une surface homogène où la masse immobilisée provient de vésicules adsorbées et non fusionnées (~3% de couverture en vésicules serait suffisant), un apport supplémentaire de masse à la deuxième injection de vésicules serait attendu, ce qui n'est pas le cas ici. De plus, nous constatons que l'injection d'eau pure n'induit ni détachement ni fusion, ce qui conforte l'hypothèse de la formation d'une membrane supportée et assez stable.

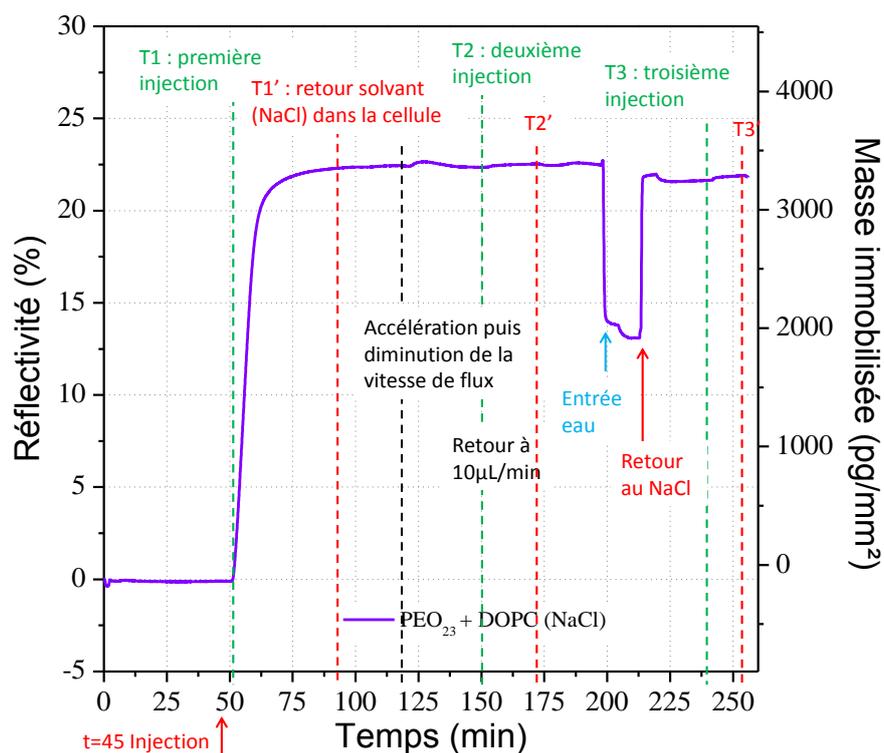


Figure 8 : Courbe SPR des trois injections de vésicules DOPC dans NaCl 0,15 mol/L sur surface fonctionnalisée Au-Ar-SO₂-PEO₂₃

2. Conclusion sur les cinétiques SPR

Ainsi, l'ensemble de ces résultats SPR montrant une masse immobilisée équivalente légèrement supérieure ou égale à celle d'une bicouche lipidique nous incite à penser qu'en présence de sel, une membrane se forme sur toutes les surfaces fonctionnalisées, y compris sur l'or nu. Le fait que le PEO adsorbe de la membrane dans le cas des deux molécules de PEO₉-CH₃ et PEO₂₃.OH montre que ceci n'est pas dû à la terminaison -CH₃ du PEO₉, mais plutôt à la longueur de chaîne encore probablement trop petite en présence de sel. Un aspect à explorer peut-être aussi celui de l'effet de « salting-out » du PEO (Bailey and Callard 1959; Briscoe, Luckham et al. 1996; Tasaki 1999; Heeb, Lee et al. 2009) ou par formation de complexes PEO / cations (Masuda and Nakanishi 2002; Shahid and Tsoukanova 2011). Ce dernier se recroqueville en présence de fortes concentrations de sels (1M pour NaCl d'après Heeb et al.) sous l'effet d'une perte d'hydratation et n'atteint pas une longueur de chaîne suffisante pour empêcher les vésicules de s'approcher de la surface (Figure 9).

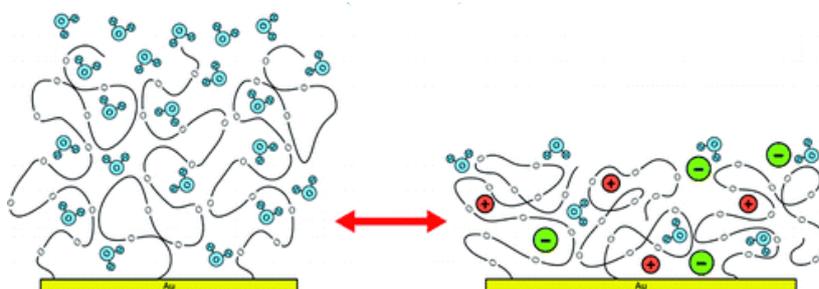


Figure 9 : Effet de la salinité sur les chaînes de PEO assemblées sur un substrat solide (Heeb, Lee et al. 2009)

Nous pouvons commenter les états de surface possibles après immobilisation de matière qui est souvent légèrement supérieure à une bicouche complète. Cet excédent de masse peut provenir de différents états de surface :

- des vésicules intactes sont immobilisées au contact du $\text{PEO}_9\text{-CH}_3$ mais n'ont pas fusionné, nous verrons plus loin que 2,5% de vésicules sur la surface sont suffisant pour obtenir cette masse (Ch.III-B-1). Ce résultat sera confirmé par QCM à des concentrations 100 fois plus faibles ;
- une seconde bicouche incomplète et/ou des vésicules sont stabilisées par la présence du sel sur une première bicouche complète ;
- des phospholipides isolés ou partiellement associés pénètrent dans la couche de fonctionnalisation sur l'or et sous la bicouche complète. La situation extrême dans ce cas serait d'avoir une monocouche dont les chaînes sont dirigées coté or et les têtes font face à la bicouche complète hydratée.

La surface peut aussi être une juxtaposition latérale de ces situations.

Les expériences SPR ont été complétées par l'utilisation de la microbalance à cristal de quartz (QCM, sans accès au mode dissipatif malheureusement) sans écoulements (par remplissage avec la solution de vésicules, puis lavage après un temps de contact donné avec des solutions plus diluées en vésicules). Les cinétiques d'adsorption des vésicules sans écoulement par QCM sont présentées dans la partie suivante.

B. Suivi par QCM sur quartz d'or fonctionnalisé

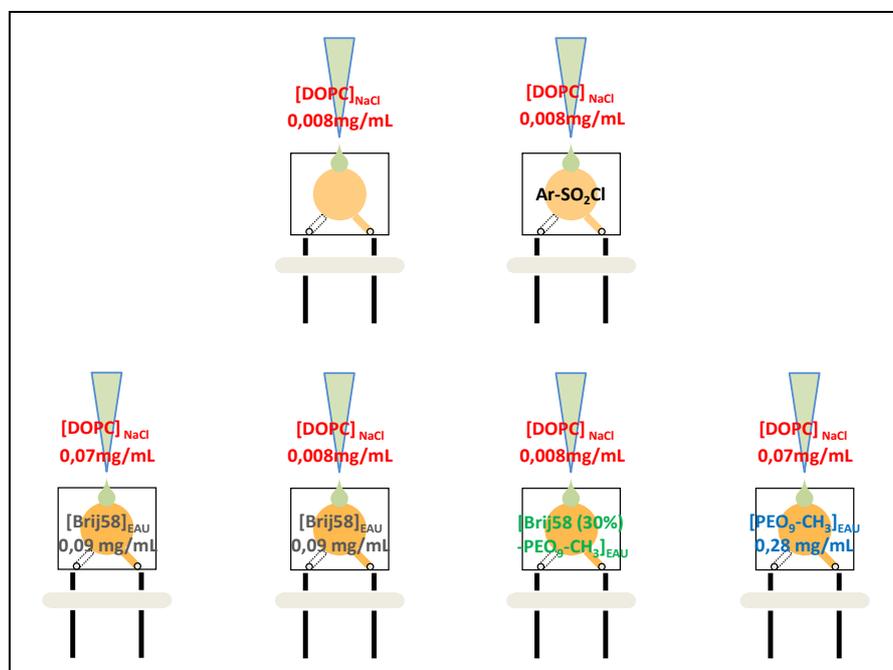
L'utilisation de la micro-balance à quartz (QCM²), permet aussi de suivre sans marquage moléculaire des variations de la masse à l'interface substrat/solution. Des faibles variations de sa fréquence de résonance la rendant sensible à l'association, la

² Détails sur la technique QCM et la conversion des grandeurs, voir *Annexe QCM* et *Ch.II-B-1-a*

fusion et la dissociation des vésicules sur la couche d'or recouvrant le quartz. Son utilisation, couplée à l'impédance électro-chimique (EIS), nous a permis de suivre la cinétique d'adsorption des vésicules de DOPC très diluées par contact sans écoulement avec différents états de surface :

- Au
- Au-Ar-SO₂Cl
- Au-Ar-SO₂-Brij 58
- Au-Ar-SO₂-Brij 58 (30%) et Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃ (70%)
- Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃

Les quartz ont été nettoyés (HCl 1 mol/L) et fonctionnalisés en solvant aqueux selon les protocoles décrits dans le chapitre II.



1. Déroulement des expériences QCM et résultats

Tous les quartz pré-fonctionnalisés Au-Ar-SO₂Cl sont montés dans la cellule d'un volume de 600µL alimenté par un tube inerte de 1/20^{ème} de pouce. Une fois la cellule remplie de NaCl (0,15 mol/L), les molécules Brij58 ($C_{\text{Brij58}} = 0,09 \text{ mg/mL}$ dans l'eau) ou PEO₉-CH₃ ($C_{\text{PEO}} = 0,28 \text{ mg/mL}$ dans l'eau) ont été injectées dans le volume (il s'agit des cinétiques présentées au *Ch.II-C-1-g* Fig35). Les quartz ont ensuite été rincés à l'eau, à l'acétone puis séchés. Les injections de NaCl et des solutions de vésicules de DOPC sont effectuées à la seringue très lentement ($\sim 700\mu\text{L}/\text{min}$ pour 1,3mL). Le signal QCM perturbé pendant l'injection n'est pas enregistré (montage moins stable et moins sensible qu'une QCM-D avec micro-fluidique). Nous montrons donc uniquement les plateaux atteints avant

et après rinçage (soit après la coupure en pointillé sur les figures représentant les phases d'injection pour le rinçage).

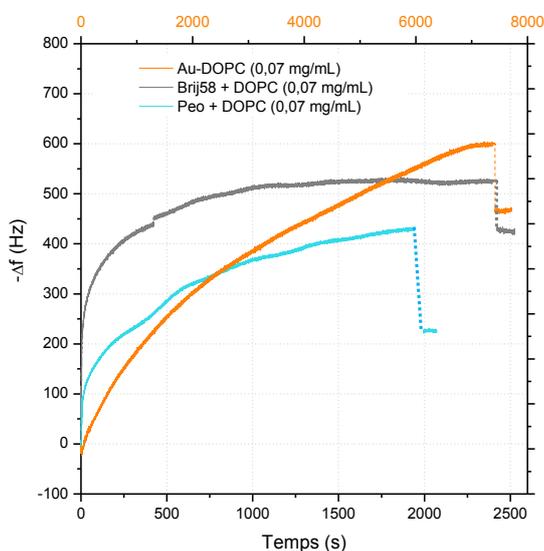


Figure 10 : Cinétiques QCM d'adsorption des SUVs DOPC à 0,07mg/mL dans NaCl (0,15M)

Injection à t=0 de DOPC (0,07mg/mL) à 700μL/min. Cinétiques orange sur surface Au, bleue sur surface Au-Ar-SO2-PEO9-CH3 et grise sur Au-Ar-SO2-Brij58 et verte sur Au-Ar-SO2Cl

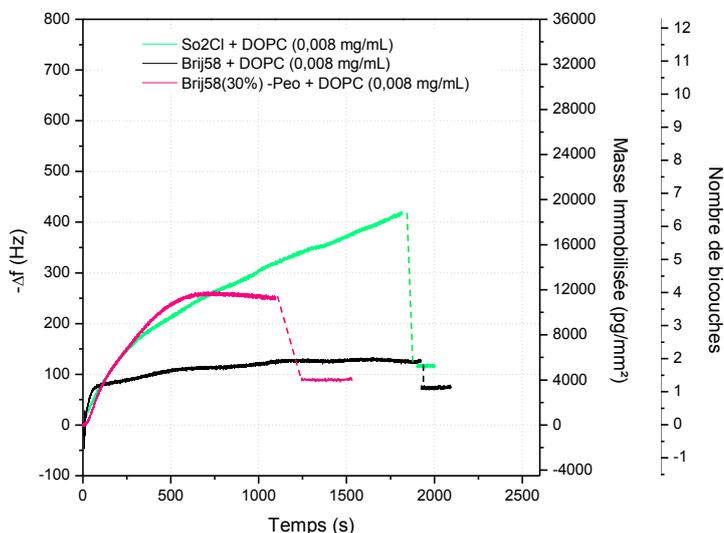


Figure 11 : Cinétiques QCM d'adsorption des SUVs DOPC à 0,008mg/mL dans NaCl (0,15M)

Injection à t=0 de DOPC (0,008mg/mL) à 700μL/min. Cinétiques verte sur Au-Ar-SO2Cl, rose sur surface mixte Au-Ar-SO2-Brij58 et PEO9-CH3, noire sur Au-Ar-SO2-Brij58

La masse adsorbée est alors calculée avec l'équation de Sauerbrey comme expliqué au Ch.II-C-1-g Eq. 7. Une variation de 1Hz correspond à une prise de masse de 56,39 pg/mm², il faut donc une variation de 63,9Hz pour une bicouche équivalente en masse ($m_{1Bi-DOPC} = 3601,2 \text{ pg/mm}^2$). De la même façon qu'en SPR, la masse immobilisée est calculée par différence entre les deux plateaux mesurés avant injection des vésicules et après rinçage, puis elle est exprimée en équivalent de bicouches complètes. Ces données sont présentées dans le Tableau 3.

Toutes les cinétiques (Figure 10 et Figure 11) montrent une prise de masse nette à la première injection, ce qui nous indique que la concentration en vésicules interagissant avec la surface est suffisante, même après filtration de celles-ci partant de solutions très diluées (à 0,008mg/mL). La plupart des cinétiques sont enregistrées jusqu'à atteindre un plateau, mais elles ne l'atteignent pas toutes à la même vitesse. On peut remarquer une grande dispersion au niveau de la hauteur des plateaux.

Ch. III. Formation de membranes modèles ancrées sur électrode

Tableau 3 : Résultats des cinétiques d'adsorption QCM des vésicules de DOPC dans NaCl sur Au ou SO₂Cl ou PEO₉-CH₃ ou Brij 58

Surfaces QCM	Concentration injectée (mg/mL)	-Δf (Hz)	Masse immobilisée (pg/mm ²)	Nombre de bicouches équivalentes.		Taux de couverture de la surface en vésicules (%)	
				Av. rinçage	Ap. rinçage	Av. rinçage	Ap. rinçage
Au	0,07	487,4 ± 1,7	26987,8 ± 94,1	7,49 ± 0,03	5,9 ± 0,03	13,6	10,8
Au-Ar-SO ₂ Cl	0,008	116,9 ± 2,5	6472,9 ± 138,4	6,39 ± 0,04	1,8 ± 0,04	11,6	3,3
Au-Ar-SO ₂ -PEO ₉ -CH ₃	0,07	225,2 ± 2,5	12469,5 ± 138,4	6,62 ± 0,05	3,46 ± 0,05	12	6,3
Au-Ar-SO ₂ -Brij 58	0,07	426 ± 2,5	23588 ± 138,4	8 ± 0,05	6,5 ± 0,05	14,5	11,9
Au-Ar-SO ₂ -Brij 58	0,008	73,5 ± 2,5	4069,8 ± 138,4	1,93 ± 0,05	1,13 ± 0,05	3,5	2
Au-Ar-SO ₂ -Brij 58 (30%)-PEO ₉ -CH ₃ (70%)	0,008	95 ± 13	5260,2 ± 719,8	3,84 ± 0,2	1,46 ± 0,2	7	2,6

Dans un premier temps, nous nous intéressons aux surfaces sans PEO (surfaces d'or nu et électro-fonctionnalisées avec Ar-SO₂Cl). L'adsorption « témoin », de vésicules de DOPC (0,07mg/mL) sur quartz d'or nettoyé (HCl 1mol/L) mais non fonctionnalisé est présentée sur la Figure 10. Cette cinétique est celle dont la valeur de saturation en masse est la plus faible (1650pg/mm² respectivement). L'or nu lavé est donc une surface qui présente beaucoup d'affinité avec les vésicules et qui immobilise beaucoup de matière avec un équivalent de ~6 bicouches complètes en masse. Cette valeur peut s'interpréter comme la stabilisation de plusieurs bicouches ou encore par l'adsorption de vésicules qui resteraient intactes comme l'ont montré (Keller and Kasemo 1998; Richter, Berat et al. 2006) sur de l'or oxydé (angle de contact <5°). Dans ce cas un tapis plus ou moins dense de vésicules se stabilise mais elles ne fusionnent pas. Considérant cette possibilité, plutôt que de rapporter la masse immobilisée en équivalent de bicouches complètes (~6), nous pouvons la rapporter à un taux de couverture en vésicules de masse connue. Une vésicule pleine de solvant NaCl de 75 nm de rayon pèse 3,52 10⁻³ pg dont 0,27 10⁻³ pg de membrane (le reste étant du solvant) et occupe une surface projetée de 1,77 10⁻⁸ mm². Ainsi la masse

immobilisée sur or peut aussi correspondre à une stabilisation de quelques vésicules recouvrant environ 10,8 % de la surface.

La pré-fonctionnalisation Ar-SO₂Cl adsorbe également des vésicules avec une vitesse de prise de masse comparable (Figure 11). On observe par contre une très forte prise de masse avant rinçage pouvant certainement encore augmenter avec une solution de vésicules pourtant plus diluée. Cette prise de masse est nettement plus importante que sur l'or nu, cependant, plus des trois-quarts de cette masse sont perdus après rinçage (passant de 6,4 équivalent bicouches à 1,8). La quantité restante après rinçage peut s'interpréter soit comme une bicouche complète avec quelques patches d'une seconde bicouche stabilisée, ou quelques vésicules immobilisées n'ayant pas fusionné et qui recouvriraient environ 16,6 % de la surface de mesure. D'autre part, la molécule d'eau est un mauvais nucléophile mais elle peut tout de même prendre la place du chlore lors d'une réaction nucléophile très lente, ainsi la fonction Au-Ar-SO₂Cl au contact de l'eau peut se transformer en Au-Ar-SO₃H et rendre la surface plus hydrophile (~20° d'angle de contact). Ceci pourrait expliquer, en plus du fait que cette fonction est très mince (forces de Van Der Waals efficaces substrat-membrane), qu'une grande quantité de membrane participe à la prise de masse mais parte au rinçage.

Dans un second temps, nous pouvons nous intéresser aux surfaces avec PEO. A concentration égale en vésicules (0,07mg/mL), la Figure 11 montre que la masse immobilisée est plus importante sur la surface Au-Ar-SO₂-Brij 58 que sur la surface Au-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃ (6,5 bicouches équivalentes pour Brij 58 contre 3,5 pour PEO₉-CH₃) ; l'arrivée au plateau plus rapide et la quantité perdue au rinçage plus faible (1/5 ; 1/2), respectivement. Dans les deux cas nous atteignons des masses importantes que nous pouvons interpréter comme l'adsorption de vésicules intactes. Nous confirmons que la fonctionnalisation PEO₉ terminé par -CH₃ immobilise beaucoup trop de membrane pour être utilisée comme agent hydratant anti-adhésion des membranes.

La Figure 10 montre qu'à une concentration dix fois plus faible (0,008 mg/ml), les masses immobilisée sur, Brij 58 complété PEO₉-CH₃, et Brij 58 seul, sont proches (1,1 et 1,4 bicouches complètes équivalentes ou ~2% de surface couverte par des vésicules intactes). La fonctionnalisation Brij 58 seule conserve une forte vitesse de prise de masse initiale, un plateau net et atteint rapidement, ainsi qu'une faible perte de masse au rinçage (1/3). Quand la fonctionnalisation intègre des fonctions PEO₉-CH₃ au Brij 58 (surface Au-Ar-SO₂-Brij 58 (30%)-PEO₉-CH₃ (70%)), le plateau atteint des valeurs plus importantes à la prise de masse mais la quantité perdue au rinçage est beaucoup plus importante (2/3) donnant une valeur immobilisée comparable à la surface Brij 58 seul (1,4 bicouches).

Nous constatons, en comparant ces deux figures, que l'immobilisation est toujours plus importante pour les injections de DOPC plus concentrées (au minimum 3,5 bicouches équivalentes formées pour C_{DOPC}=0,07mg/mL contre au maximum 1,8 pour

$C_{DOPC}=0,008\text{mg/mL}$). Il est possible que davantage de vésicules soient immobilisées sur la bicouche formée.

2. Conclusion sur les cinétiques QCM

Les résultats précédents nous mènent à penser que la méthode d'introduction de SUVs par injection a immobilisé plus de vésicules non fusionnées que par écoulement (SPR). D'autre par, ce sont les injections les plus concentrées qui ont stabilisé des vésicules en plus grande quantité sur les différentes surfaces. Ceci introduit la question de l'induction de la fusion des vésicules quand on utilise un contact ou un écoulement avec la solution de vésicules discuté dans la suite. Ces résultats indiquent aussi trois comportements cinétiques bien distincts, entre les surfaces d'or, les surfaces les plus minces Ar-SO₂Cl, PEO₉-CH₃ (pentes à l'origine faibles ; perte de masse au rinçage de 3/4 à 1/2) et les surfaces contenant du Brij 58 (pente à l'origine forte ; perte de masse au rinçage plus faibles et de 1/3 au maximum). La surface présentant le Brij 58 complété au PEO₉-CH₃ présente un comportement intermédiaire (pentes à l'origine faibles ; perte de masse au rinçage de 2/3).

C. Efficacité des fonctionnalisations pour l'immobilisation des membranes.

Les résultats de cinétique d'adsorption de membrane obtenus par les techniques QCM et SPR sont comparés entre elles à la lumière de la littérature, afin de conclure sur l'efficacité de notre fonctionnalisation de surface pour l'immobilisation d'une membrane par harponnage. Nous nous concentrons sur les adsorptions dans NaCl sur les surfaces fonctionnalisées PEO seul, Brij58 seul et en faible fraction. Les concentrations des solutions de SUVs au contact des surfaces sont de 0,07 et 0,008 mg/mL pour la QCM et de 0,2mg/mL et 1mg/mL pour la SPR.

1. Les différentes cinétiques d'adsorption en QCM

a. Discussion

Différents comportements ont été reportés dans la littérature pour différents couples lipide/surface, différentes tailles et concentrations de vésicules en présence de sel. L'utilisation du mode dissipation de la QCM-D permet aux auteurs, d'identifier les éventuelles ouvertures et fusions des vésicules.

Les quatre voies de formation de SLB proposées par la littérature sont résumées par le schéma issu des travaux de Richter et al. (Figure 12).

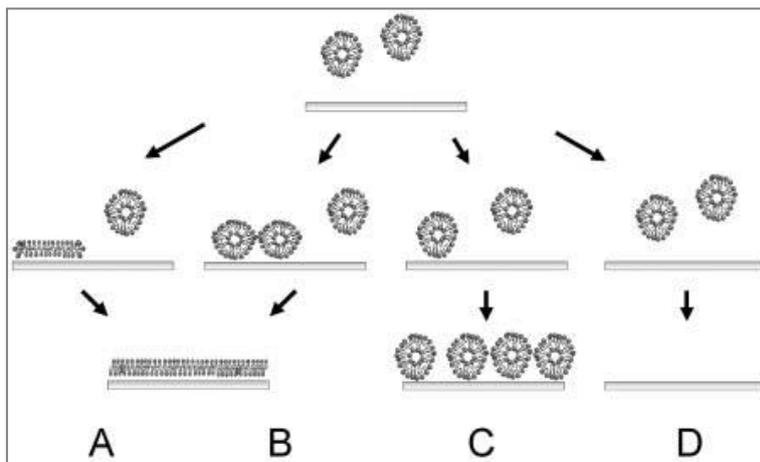


Figure 12 : Schéma présentant les différentes voies d'adsorption de vésicules et de formation d'une SLB (Richter, Mukhopadhyay et al. 2003)

(A) Formation d'une SLB stimulée par un faible taux de couverture en vésicules, (B) Formation d'une SLB stimulée par un taux de couverture en vésicules élevé, (C) Formation d'une couche de vésicule supportée (SVL), (D) Adsorption inhibée.

Ainsi A. Keller and B. Kasemo montrent qu'en présence de sel (0,1mol/L), des vésicules non fusionnées et stabilisées peuvent donner des masses atteignant trois fois celle d'une bicouche complète uniforme (Keller and Kasemo 1998; Richter, Berat et al. 2006). Les trois cas de figure qu'ils envisagent sont présentés sur la Figure 13 et discutés ci-dessous.

- Des cinétiques d'adsorption de très petites vésicules d'EggPC (rayon hydrodynamique de 12,5 nm à 0,1mg/mL dans 10 mM Tris, pH 8.0, et 100 mM NaCl) sur or oxydé s'effectuent en une seule étape avec l'atteinte d'un plateau à -90Hz. Ce genre de cinétique est interprété comme l'adsorption et la stabilisation de vésicules qui restent intactes et sans fusion sur la surface ;
- D'autres cinétiques d'adsorption de vésicules d'EggPC, POPC (Hardy, Nayak et al. 2012) ou DOPC (Richter, Mukhopadhyay et al. 2003) sur SiO₂ se décrivent en deux étapes, avec l'atteinte d'un plateau à -27Hz (~ 1 bicouche) en passant par un maximum en Δf . Ce phénomène est expliqué par l'adsorption de vésicules intactes jusqu'à une concentration critique au-delà de laquelle les vésicules fusionnent générant une perte de masse liée à la libération du solvant lors de leur ouverture. Ainsi, par rupture et relargage du solvant une bicouche complète se forme, cependant, des interrogations sur le processus de formation demeurent, par exemple à savoir si un excédent de lipide se retire lors la rupture/fusion (Reimhult, Zach et al. 2006). Après formation de la bicouche lipidique, l'excès de vésicules peut être éliminé par lavages successifs (Hardy, Nayak et al. 2012). ;

- L'adsorption de vésicules d'EggPC sur surface d'or fonctionnalisée hydrophobe (greffage d'un alkane thiol en C_n) qui stabilise une monocouche de lipide pour une variation de fréquence à -13Hz, atteinte en une seule étape par fusion directe.

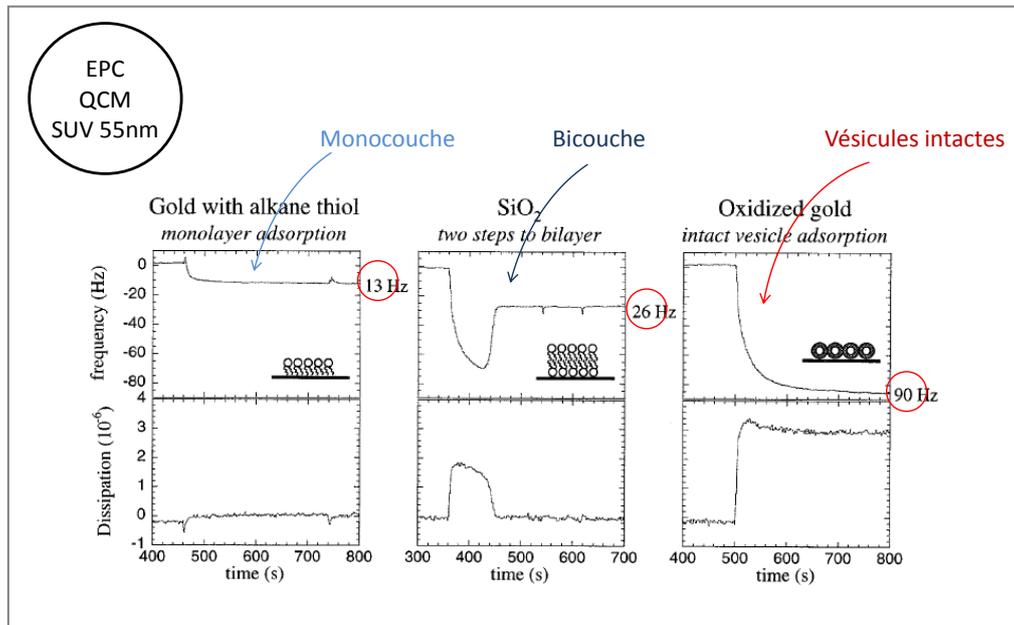


Figure 13 : Exemple d'adsorption de vésicules par QCM-D sur différentes surfaces (Keller and Kasemo 1998)

Richter et al aborde un autre cas de figure :

- Les cinétiques d'adsorption de vésicules sur SiO₂ en présence de NaCl peuvent atteindre un plateau autour de -27Hz (~ 1 bicouche) directement sans passer par un maximum en Δf . Ce phénomène est expliqué par l'adsorption et la rupture spontanée de vésicules, celles-ci n'ayant pas besoin d'un fort taux d'interaction avec les autres vésicules pour s'ouvrir et former une SLB (Richter, Mukhopadhyay et al. 2003).

b. Conclusion

Dans le cas de nos cinétiques d'adsorption, quelle que soit la surface, or, Ar-SO₂Cl, PEO₉-CH₃ ou Brij 58, nous n'observons pas de perte de masse permettant d'identifier une fusion de vésicules sur des échelles de temps comparables ou plus longues. Nous nous retrouvons soit dans le cas d'une adsorption de vésicules intactes qui ne fusionnent pas, soit dans le cas de la formation d'une bicouche où la cinétique de fusion des vésicules serait trop rapide, ne permettant pas d'être dissociée visiblement de celle de l'adsorption. Nous allons voir que nous privilégions la deuxième hypothèse.

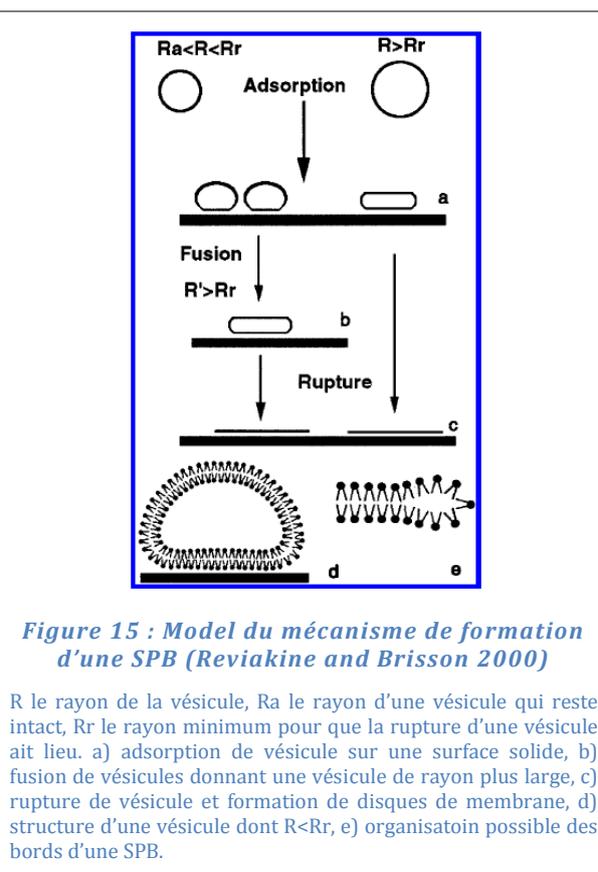
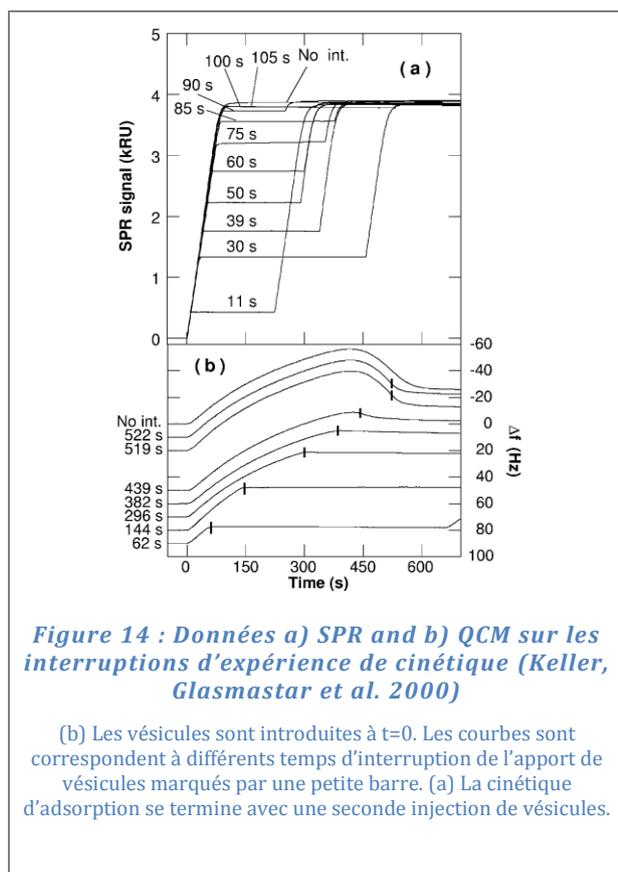
2. Couplage des techniques QCM et SPR

a. Discussion

La suite des travaux de ces mêmes auteurs et d'autres en apportant des techniques complémentaires à la QCM-D, telle que la SPR et l'AFM liquide, a permis d'affiner les interprétations du processus depuis l'adsorption des vésicules à la formation des bicouches lipidiques complètes. Cette littérature est importante pour la comparaison des cinétiques d'adsorption de notre propre système ainsi que pour affiner leurs interprétations, à savoir si notre surface d'harponnage en solution immobilise des vésicules et/ou des domaines de membranes.

Au sujet du taux de couverture critique pour la rupture des vésicules, Glasmaster et al. ont montré, par techniques SPR et QCM-D, qu'il fallait un réservoir de matière suffisant ou un flux continu de SUVs d'EggPC pour qu'elles fusionnent et qu'une bicouche lipidique d'EggPC se forme bien sur SiO₂ (Keller, Glasmaster et al. 2000). Lorsque le rinçage est effectué avant que la bicouche soit formée, donc avant qu'un taux de couverture soit atteint, les vésicules adsorbées restent intactes (sauf exception sur or oxydé où elles ne fusionnent pas forcément même au delà de ce taux) (Figure 14). Johnson et al. ont en plus donné des valeurs quantitatives, en montrant que les vésicules d'EggPC, dans une solution contenant du NaCl à 100mM, s'adsorbaient et restaient intactes sur verre jusqu'à l'utilisation d'une concentration de 0,006 mg/mL en solution. Au-delà de cette concentration, ils observent une bicouche sans vésicules co-existantes (Schönherr, Johnson et al. 2004). Bien que la taille de leur cellule ou de leur surface ne soit pas mentionnée, nous pouvons penser que nos conditions expérimentales sont favorables à la fusion de vésicules et la formation d'une bicouche (surface en contact avec un réservoir de 600µL (QCM) ou sous flux continu (SPR) de solution de vésicules à 0,008 mg/mL - 0,07 mg/mL - 0,2mg/mL - 1mg/mL). Il est à noter que le mélange de lipides EggPC ou le DOPC seul sont connus pour donner des membranes assez fluides avec une dynamique de diffusion importante en solution.

Concernant la taille des vésicules, la littérature montre qu'il existe un rayon minimum requis pour la rupture des vésicules isolées en fonction de leur nature. Par exemple, Reviakine et Brisson ont observé, par AFM, l'adsorption de vésicules de SUVs et LUVs de 12 à 120nm de rayon, faites à partir de plusieurs lipides (DOPC, EggPC, ...) et pour plusieurs concentrations entre 0,001 et 3mg/mL. Leur modèle propose un rayon minimum de 75nm pour voir toutes les vésicules s'ouvrir et former des domaines de SLB (Reviakine and Brisson 2000). Les données de diffusion de lumière, montrent que le rayon de nos vésicules se distribue de façon gaussienne autour de 100nm. Nos vésicules sont donc aussi suffisamment volumineuses pour fusionner d'elles mêmes une fois adsorbées sur la surface.



La charge des lipides influence aussi la façon dont se fait l'adsorption et/ou la formation de la bicouche supportée (Richter, Mukhopadhyay et al. 2003). Richter et al. montrent, par QCM-D et AFM, que les lipides faiblement chargés positivement (ex : mélange DOPC/DOTAP), les lipides zwitterioniques donnant une membrane globalement neutre (ex : DOPC) ou négativement chargée (ex : mélange DOPC/DOPS) ont besoin d'un stress extérieur pour s'ouvrir comme celui de la présence de vésicules avoisinantes, revenant à un taux de couverture critique (conditions expérimentales sur verre : 0,1mg/mL en solution contenant du NaCl à 150mM). La taille de nos vésicules de DOPC ainsi que le contact continu des SUVs adsorbées à la surface avec celles en solution, nous placent dans des conditions adéquates pour former une membrane sur nos surfaces.

La technique de SPR couplée à la QCM-D, décrite par Reimhult et al., montre la complémentarité de ces techniques. En effet, l'onde évanescente SPR sonde l'interface liquide sur une profondeur d'un ordre de grandeur plus grand environ ($\sim 100\text{nm}$) que celui d'une bicouche lipidique ($\sim 4\text{nm}$). La technique SPR mesure la masse adsorbée via la modification du profil de l'indice optique pratiquement indépendamment de sa morphologie dans le voisinage immédiat de la surface et est peu affectée par la quantité d'eau piégée quand celle-ci affecte peu l'indice optique local. Au contraire, la QCM oscille dans un mode de cisaillement dont la fréquence diminue lorsqu'une masse se couple

mécaniquement avec sa surface. Cette masse inclue la masse de lipide adsorbée, le solvant piégé à l'intérieur des vésicules ancrées et entre elles (Keller, Glasmaster et al. 2000; Reimhult, Larsson et al. 2004). Ainsi l'erreur sur la masse adsorbée calculée en SPR, pourra être importante si l'on ne tient pas compte, dans le modèle optique, de la différence d'épaisseur et d'indice optique entre des vésicules et une bicouche. En effet, la masse adsorbée en milieu aqueux est communément approximée par une relation linéaire avec la variation d'indice.

$$m_{\Delta n} = d \frac{dc}{dn} \Delta n \quad \text{où} \quad \Delta n = \kappa \frac{\Delta\theta}{1 - e^{-2d/l_{decay}}}$$

Avec d l'épaisseur du (bio)film, dc/dn l'inverse de l'incrément de l'indice de réfraction, Δn la variation d'indice de réfraction, $\Delta\theta$ la variation de l'angle plasmonique, κ le facteur de sensibilité du système reliant le changement dans au changement de l'indice de réfraction dans le champ évanescent et, l_{decay} la longueur de décade du champ évanescent.

Ceci n'est plus vrai lorsque les molécules du film adsorbé sont mélangées au solvant, ce qui est fortement le cas lors de l'adsorption de vésicules. Ainsi, dans le cas de vésicules, la transformation linéaire utilisée entre la variation de la réflectivité et la masse adsorbée, génère une erreur sous-estimant de 60% la masse réelle présente (Reimhult, Larsson et al. 2004). Ainsi les moyens communément utilisés en SPR pour estimer la masse prise dans le cas d'une bicouche lipidique résultent en une sous-estimation de 25% par rapport à la masse réelle et de 60% quand des vésicules sont présentes sur la surface.

b. Conclusions sur l'immobilisation de membrane sur la fonctionnalisation

Au final, si nous comparons les masses immobilisées, obtenues par QCM et par SPR et que celles-ci sont peu différentes, c'est l'indication qu'il se forme principalement des bicouches à l'interface (Figure 16). Quand la différence est grande (masse immobilisée en QCM > masse SPR) c'est que des vésicules sont aussi adsorbées sur la surface ou bicouche.

Le Tableau 4 donne une vue globale des masses immobilisées calculées par chacune des deux techniques SPR et QCM sur notre système. Nos expériences en QCM peuvent se classer en deux groupes, celles dont la masse immobilisée est importante (>12000 pg/mm², soit ~3 fois supérieure à la masse d'une bicouche) et celles dont la masse immobilisée est très légèrement supérieure à la masse d'une bicouche (autour de 5000 pg/mm²). Les masses immobilisées par SPR se placent toutes entre 4000 et 7000 pg/mm². Nous choisissons de comparer et d'interpréter ces valeurs en prenant la moyenne des masses immobilisées par groupe et en regardant le pourcentage d'erreur possible sur la masse moyenne en SPR en considérant que la masse réelle est justement calculée en QCM.

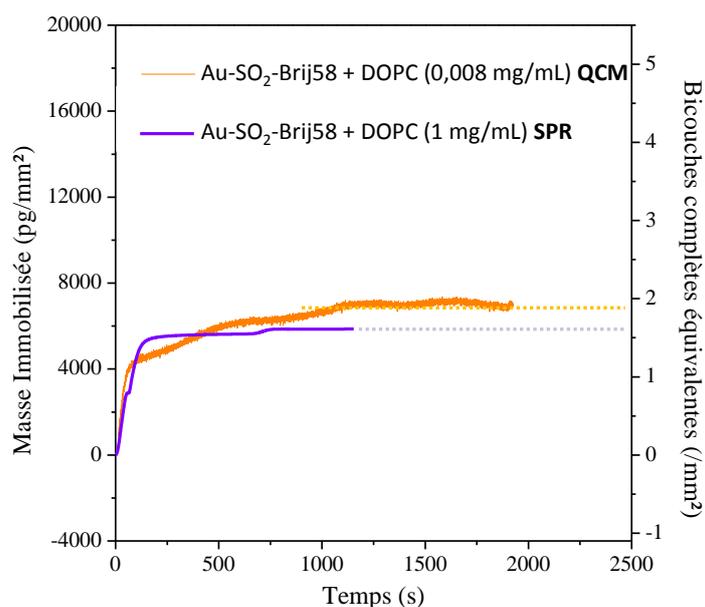


Figure 16 : Superposition des cinétiques d'adsorption QCM et SPR de vésicules de DOPC sur surface fonctionnalisée Ar-SO₂-Brij58

Tableau 4 : Tableau comparatif des masses apparentes de DOPC immobilisées par les techniques de QCM et SPR

	Techniques		
	QCM (1 ^{er} groupe)	QCM (2 ^{ème} groupe)	SPR
Masse immobilisée en moyenne (pg/mm ²)	18029 (de 12470 à 23588)	5267 (de 4069 à 6473)	3578 (de 3677 à 6000)
Fraction erreur SPR p/r à QCM (%)	70	32	–

Ainsi, nous trouvons que la technique SPR donne des valeurs de masse immobilisée avec une erreur de 32% par rapport aux expériences QCM qui ont immobilisée une masse proche d'une bicouche et de 70% pour celles qui ont immobilisée une masse trois fois supérieure à celle d'une bicouche. Ces observations sont semblables à celles discutées par les auteurs cités précédemment (Reimhult, Larsson et al. 2004). Nous en concluons que les expériences d'adsorption de vésicules de DOPC sur surfaces fonctionnalisées ont donné lieu à la formation d'une membrane lipidique supportée. Les deux expériences ayant immobilisée aussi beaucoup de vésicules (surfaces Brij58 et PEO₉-CH₃ pour des injections concentrées à 0,07mg/mL par QCM) sont certainement liées à la reproductibilité des expériences puisque la préparation à la fois des SUVs et des surfaces peut influencer de façon critique le processus de déposition des vésicules. La qualité des bicouches lipidiques supportées et leur processus de formation varie considérablement avec les conditions expérimentales (Richter, Mukhopadhyay et al. 2003).

Annexes Ch.III

A. Préparation des SUVs non fluorescentes

1. Sans marqueur fluorescent

Les petites vésicules unilamellaires ($r=75\mu\text{m}$) ont été préparées selon le protocole décrit dans le Tableau 5. Les lipides DOPC achetés en poudre chez Avanti Polar Lipid sont dissous dans du chloroforme et stockés au congélateur. Au moment de la préparation des SUVs, le solvant contenant les lipides est prélevé, placé dans un flacon et mis à évaporer sous hotte une heure. Le lipide sec restant est ensuite tiré sous vide pendant plusieurs heures afin de retirer le maximum de molécules organiques provenant du chloroforme. Le lipide est ensuite hydraté toute une nuit dans du NaCl à 0,150mol/L ou dans de l'eau filtrés suivant l'usage. Le lipide en solution est ensuite soniqué à 60°C pendant 20 min puis 10 min selon la présence d'agrégats ou non. Les solutions de SUVs préparées dans NaCl à 0,150mol/L sont plus turbides que celles préparées dans de l'eau milli-Q à même concentration (Figure 17). Les solutions sont alors filtrées à 0,2 μm (filtres PALL LIFE SCIENCES GHP Acrodisc GF 13mm syringe filter), conditions propices pour les mesures de diffusion de la lumière statique et dynamique (DLS et SLS). Les solutions destinées pour les expériences de formation de la membrane sont toujours filtrées de façon à obtenir les mêmes SUVs que celles qui ont été caractérisées en diffusion de la lumière (DLS et SLS, souvent en mode dynamique et multi-angle pour la diffusion de volume) et à éviter l'adsorption d'agrégats. La concentration des solutions après filtration est recalculée grâce aux mesures de diffusion de la lumière.

Tableau 5 : Protocole de préparation des SUVs

Etape	Temps	Solvant	Volume	Procédé
1	1h	Chloroforme		Laisser le chloroforme s'évaporer à l'air libre (sous hotte)
2	4h			Tirer sous vide le lipide pour retirer les molécules de chloroforme restantes
3	(15h)	NaCl filtré	2mL	Hydratation du lipide
5	30min	NaCl	2mL	Le lipide hydraté est soniqué à 60°C (solution turbide)
6	10min		<2mL	La solution de SUVs est filtrée à 0,2 μm

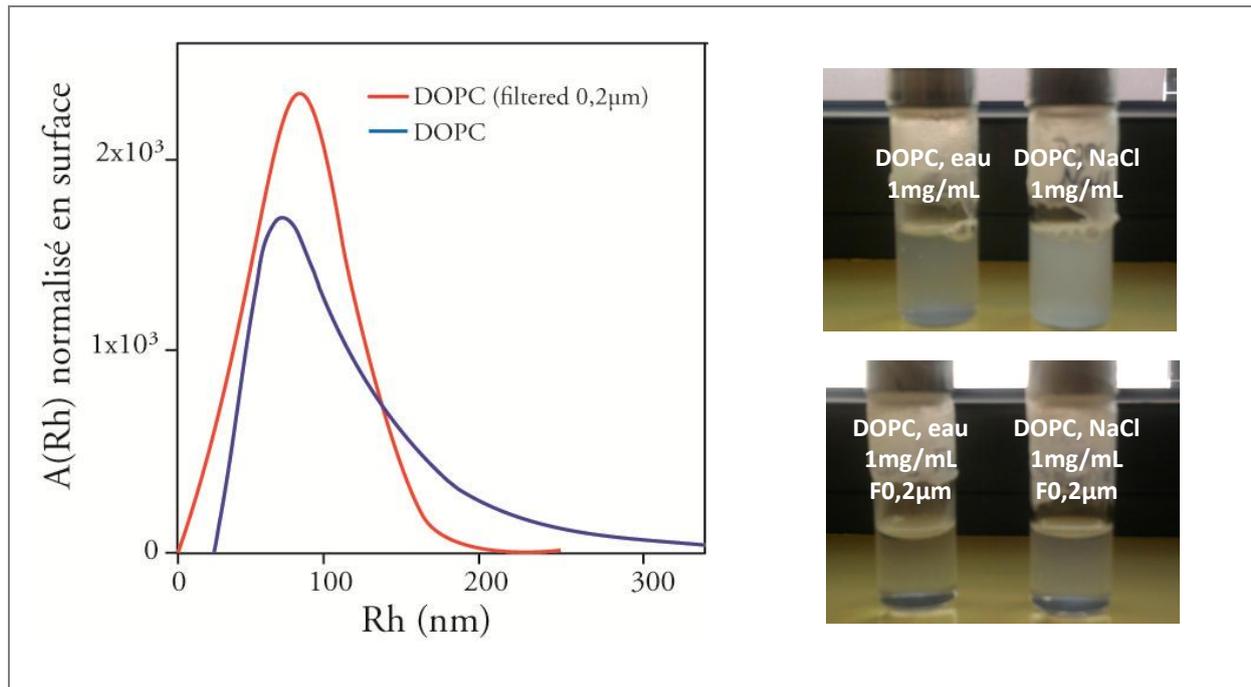


Figure 17 : Distribution en taille des SUVs de DOPC avant et après filtration déterminée par diffusion de la lumière (à gauche). Photos des solutions de SUVs préparées dans de l'eau et dans NaCl (150mM) à 1mg/mL avant et après filtration à 0,2μm (à droite)

Les études de DLS montrent que les SUVs formées ont un rayon d'environ 75nm et que ces vésicules restent stables en tailles sur plusieurs mois lorsqu'elles sont soniquées et filtrées.

2. Avec marqueur NDB

Les SUVs fluorescentes sont préparées de façon à avoir une concentration avant filtration de 1mg/mL, selon le même protocole que celui décrit précédemment, en y intégrant un petit pourcentage de lipide fluorescent (1,5%, 3% et 6% ont été testés) (Figure 19). Le NBD une phosphatidylcholine dont les chaînes lipophiles sont marquées par une molécule fluorescente.

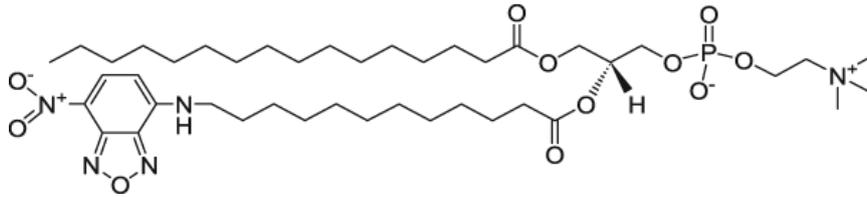


Figure 18 : Formule chimique du marqueur NBD

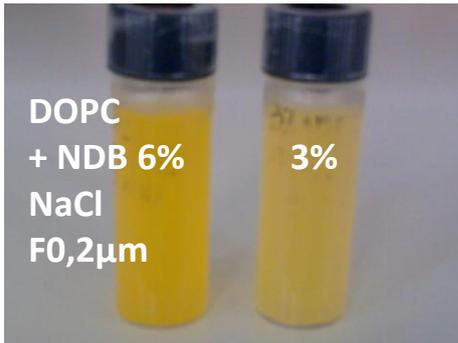


Figure 19 : Photos des solutions de DOPC/DNB à 6% et 3% après filtration

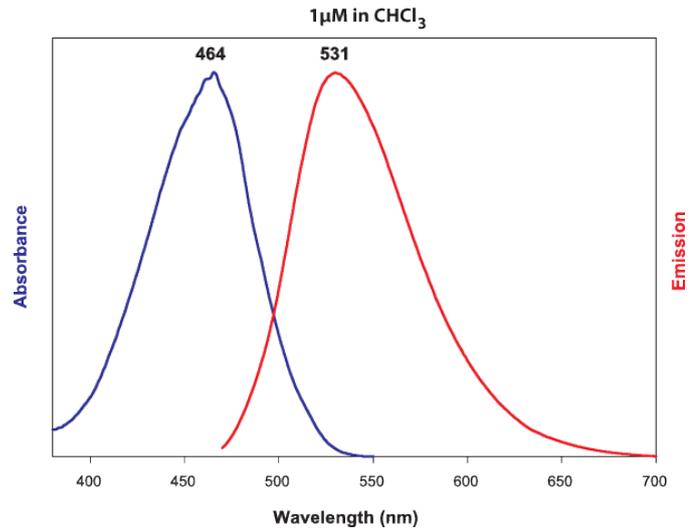


Figure 20 : Spectres d'adsorption et d'émission du marqueur NBD

B. Technique d'analyse « Résonance Plasmon de Surface »



Dispositif Horiba Scientific SPRi.

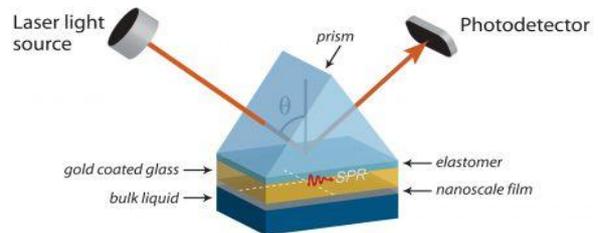


Schéma explicatif de la configuration SPR.

En réflexion totale interne d'une onde électromagnétique incidente, les plasmons de surface de l'or génèrent une onde évanescente à l'interface métal/milieu diélectrique (dont l'amplitude décroît exponentiellement en s'éloignant de la surface, soit dans la profondeur de la solution). A un angle d'incidence de cette onde EM particulier, les photons incidents créent une résonance des électrons libres du métal. L'énergie des photons utilisée pour l'excitation ("SPR" pour résonance des plasmons de surface en anglais), provoque une

chute de l'intensité réfléchi du faisceau incident à cet angle. Le plasmon de la couche d'or est donc excité pour une combinaison *indice du milieu diélectrique/angle d'incidence du faisceau* bien particulière. Si donc l'indice du milieu varie (avec l'arrivée et l'association de vésicules par exemple), le minimum de réflectivité se déplace. Le suivi du déplacement de ce minimum permet de remonter à la masse de molécules associées à la surface en passant par des équations faisant intervenir le changement d'indice.

L'onde plasmon joue donc le rôle de sonde à l'interface et ses variations pourront être recueillies en suivant l'intensité du faisceau réfléchi spéculairement. La plupart des travaux de SPR ont été faits en utilisant des films minces de métaux nobles comme l'or et l'argent. Généralement, l'onde incidente, traverse d'abord un prisme de verre d'indice de réfraction élevé et se réfléchit sur l'interface recouverte de métal. Ce prisme constitue le dispositif de couplage de l'onde incidente avec l'onde plasmon de surface de la couche mince métallique. Lors de sa première utilisation pour des études de biochimie, la SPR fut comparée à de nombreuses techniques de référence en biochimie analytique dont la microbalance à cristal de quartz. C'est aujourd'hui une technique très répandue et la sensibilité du dispositif Horiba Scientific utilisé est de 10pg/mm^2 mais elle peut atteindre le pg/mm^2 sur d'autres montages bien plus coûteux.

C. Technique d'analyse « Microbalance à Cristal de Quartz »

QCM 922
Quartz Cristal Microbalance



Illustration of quartz crystal oscillator

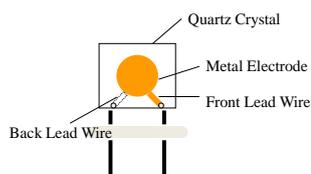
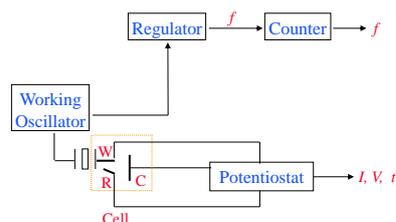


Illustration of EQCM instrument



Ref.: S. Bruckenstein, M. Shay, *Electrochim. Acta*, 30(1985)1295.
S. Bruckenstein, S. Swathnaian, *Electrochim. Acta*, 30(1985)851.

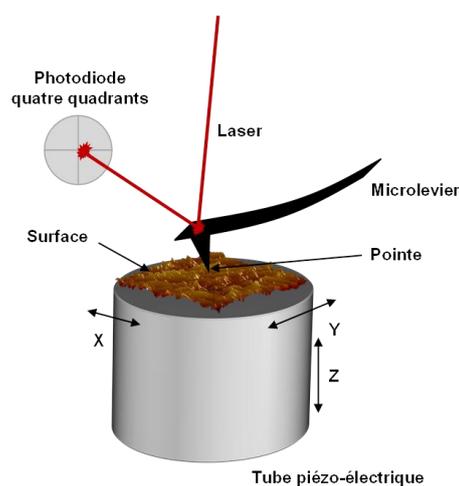
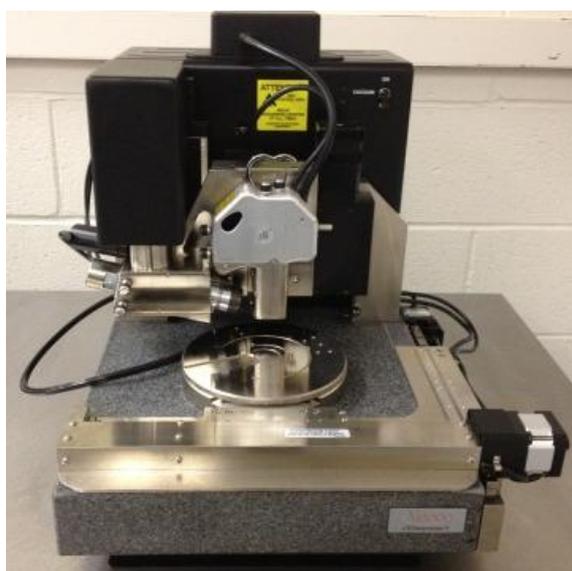
Une microbalance à quartz est un cas particulier de la microbalance piézoélectrique dans lequel le matériau piézoélectrique utilisé est le quartz. Elle est classiquement réalisée en déposant deux électrodes conductrices de part et d'autre d'un substrat piézoélectrique (ici le quartz). Le principe de base de la microbalance est la perturbation des conditions aux limites d'un résonateur : dans le cas de la microbalance à quartz, il s'agit de l'épaisseur effective du substrat dans laquelle est confinée une onde acoustique. En déposant un matériau (polymère, protéines, métal) sur une microbalance, l'épaisseur vue par l'onde

acoustique est augmentée par rapport à l'épaisseur initiale et la fréquence de résonance du dispositif est décalée ($\frac{\Delta f}{f} = \frac{\Delta h}{h}$ avec f la fréquence de résonance du dispositif et h l'épaisseur de confinement de l'onde).

Suivant la théorie la plus grossière proposée initialement par Sauerbrey (G. Sauerbrey, Z. Phys. 155, 206 (1959)), la couche additionnelle est supposée avoir les mêmes propriétés mécaniques que le substrat. De nombreux modèles ont depuis été développés pour tenir compte de la différence d'impédance acoustique des multicouches, de la viscosité ou la rugosité du substrat, etc (J.-M. Friedt, « Introduction à la microbalance à quartz : aspects théoriques et expérimentaux », Bulletin de l'Union des Physiciens n.852, mars 2003, p. 429-440.)

La QCM922 utilisée est calibrée de façon à travailler sur des quartz d'or, ou de platine, de résonance proche de 9MHz. Cette gamme de fréquence est suffisante pour procurer une sensibilité de l'ordre du ng/cm^2 (soit dix fois moindre que celle revendiquée en SPR), tout en travaillant avec une épaisseur de quartz peu fragile. La fréquence de résonance de surface change avec la masse effective à la surface du cristal et la résistance de résonance change avec la viscosité du matériau situé à l'interface quartz/solution. La résolution en fréquence est de 0,1Hz pour un échantillonnage à 100ms. La QCM 922 a été développée pour travailler en conjugaison avec un potentiostat, en temps que microbalance électrochimique à cristal de quartz (EQCM).

D. Technique de Microscopie à Force Atomique



Dispositif expérimental classique en microscopie à force atomique

Le principe de fonctionnement du microscope à force atomique trouve ses racines dans les travaux de Tabor et Israelachvili concernant la mesure des forces "intermoléculaires"

de surface. Il s'agit de mesurer l'interaction s'exerçant entre deux corps en fonction de leur distance de séparation. Une pointe, très fine (jusqu'à 10nm de rayon et 10 μ m de hauteur), est solidaire d'un micro-levier (en anglais : cantilever) à son extrémité. La souplesse de ce dernier (raideur en flexion comprise entre 10^{-2} et 10^2 N/m) l'autorise à fléchir avec une bonne sensibilité sous l'action des forces agissant sur la pointe. Le système micro-levier/pointe peut être grossièrement assimilé à un système masse-ressort et la force de rappel du ressort, égale au produit de la raideur en flexion du micro-levier k_1 par sa déflexion Δz , est en équilibre avec la force d'interaction pointe-surface correspondant à la distance de séparation d . Dans la plupart des cas, la détection de la déflexion est optique. Elle se fait au moyen d'un faisceau laser dirigé vers l'extrémité du micro-levier et réfléchi vers un système de photodiode à quatre cadrans. La différence d'éclairement entre ces cadrans est proportionnelle à la déflexion angulaire du micro-levier au point d'impact du laser. En général, les systèmes récents disposent de photodiodes à 4 cadrans qui vont permettre non seulement la détection de mouvements de flexion, mais aussi la détection de mouvements de torsion du micro-levier lorsque la pointe sera soumise à un phénomène de friction. L'échantillon peut être déplacé dans les trois dimensions par rapport à la pointe fixe à l'aide de tubes piézoélectriques (PZT cylindriques creux). La sensibilité de ces tubes est de l'ordre de 1 à 100 nm/V. Une précision de l'ordre du millivolt dans les tensions de commande permet des déplacements avec une précision meilleure que l'angström. Parfois, c'est la pointe qui est déplacée par rapport à l'échantillon. Cette configuration autorise l'analyse des grands échantillons et le travail en milieu liquide. Les principaux problèmes liés à l'utilisation des tubes piézoélectriques résultent des phénomènes d'hystérésis et de la non linéarité de la relation tension-déformation sur l'ensemble de leur domaine d'utilisation. Ces déviations à la linéarité sont d'autant plus importantes que les tensions appliquées sont élevées. Pour minimiser ces effets, on utilise dans la pratique des tubes dont l'excursion est adaptée à l'échelle de l'étude, c'est à dire de quelques nanomètres à une centaine de micromètres. L'obtention d'images topographiques (le relief) de la surface peut se faire en maintenant la force d'interaction pointe-échantillon constante au cours du balayage de la zone étudiée. Une boucle d'asservissement (contre-réaction) permet d'ajuster la position de l'échantillon par rapport à la pointe. Le signal récupéré par la photodiode est comparé à un signal de consigne et un signal d'erreur est généré. Celui-ci est envoyé au tube piézoélectrique et a pour effet de provoquer des déplacements verticaux de l'échantillon. Ce sont ces déplacements verticaux qui sont enregistrés et utilisés pour la création d'une image qui reflète le relief de la surface ; la validité de cette image étant limitée par des effets dits de "dilatation". Dans la littérature, par abus de langage, on parle fréquemment de "convolution" de la forme de la pointe avec la topographie de l'échantillon.

E. Vérification de la présence de membrane séchée par AFM et angle de contact sur les surfaces SPR

Nous avons ensuite observé les surfaces SPR qui n'ont pas été rincées avec une solution de régénération (SDS) mais à l'eau, en AFM dans l'air, surtout dans le but de vérifier la présence de membrane déposée, celle étant complètement déstructurée une fois séchée. En passant les surfaces dans l'humidité ambiante et lorsque les molécules peuvent conserver leur mobilité, nous nous attendons à ce que l'orientation des chaînes lipidiques vers l'air soit favorisée et à ce qu'il y ait des reconstructions de surfaces. Les images sont présentées pour les surfaces d'or, fonctionnalisées PEO₂₃ seul et avec Brij58 qui ont été au contact d'une solution de vésicules et doivent surtout être comparés avec la surface d'or nu. En effet, du fait de la rugosité assez importante des surfaces SPR commerciales (>1nm) la comparaison des surfaces avec membrane entre elles est difficile même qualitativement. Elles présentent globalement les mêmes structures (ou grains). Dans un premier temps nous commençons avec la surface d'or non fonctionnalisée et mise en contact avec les SUVs.

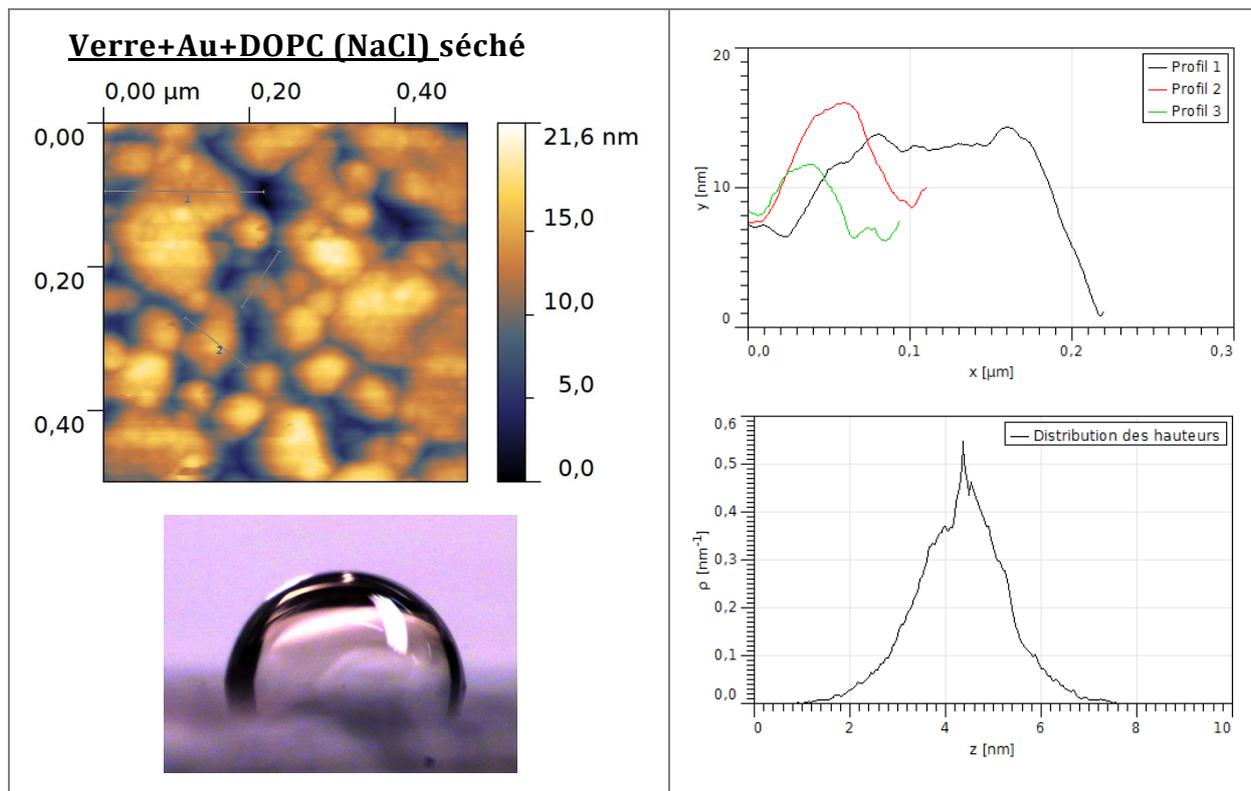


Figure 21 : Images de topographie AFM ($RMS = 3,24\text{nm}$) et de mouillabilité d'une goutte d'eau ($81,7 \pm 1,8^\circ$) sur une surface SPR d'or ayant adsorbé du DOPC dans NaCl (150mM). Profils et distribution de hauteur ($\sim 4,5\text{nm}$ compatible avec une bicouche inversée).

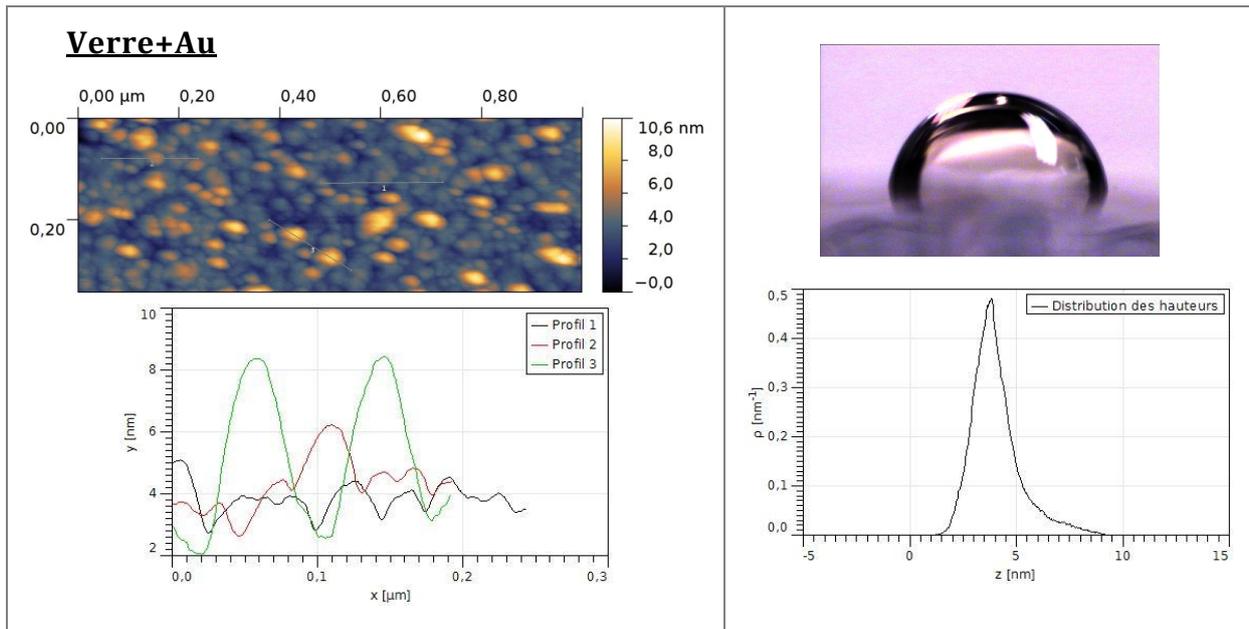


Figure 22 : Images de topographie AFM ($RMS = 1,2nm$) et de mouillabilité d'une goutte d'eau ($78,7 \pm 3,1^\circ$) sur une surface SPR d'or brut. Profils de hauteur

Les surfaces d'or nu mises en contact avec de la membrane (1,26 en équivalent déposé) montrent bien des figures de membrane réorganisée au séchage (Figure 21). La rugosité ($RMS = 3,24nm$) a largement augmenté par rapport à celle de l'or nu ($RMS = 1,4nm$) ce qui témoigne bien de la présence d'un dépôt de membrane très rugueux (pour sûr non homogène latéralement une fois mise à l'air), certainement dû à la réorganisation après séchage. De même, l'angle de contact sur or avec membrane ($81,7^\circ$) augmente par rapport à l'or nu ($78,7^\circ$, les surfaces SPR brutes sont déjà très hydrophobe à la base). La membrane se réorganise une fois sèche pour placer les chaînes des phospholipides vers l'air et forment dès lors des îlots, pyramides et autre reliefs de plusieurs strates stables dans l'air. Cependant, les profils de hauteurs permettent d'identifier facilement des domaines plans de membrane mais pas de compter le nombre de strates exacte, en raison de la rugosité élevée des surfaces d'or SPR (Figure 22, surface d'or de rugosité bien moins bonne que celle des quartz qualité miroir utilisés pour la QCM et que les lames ou lamelles de chrome préparées au Mans).



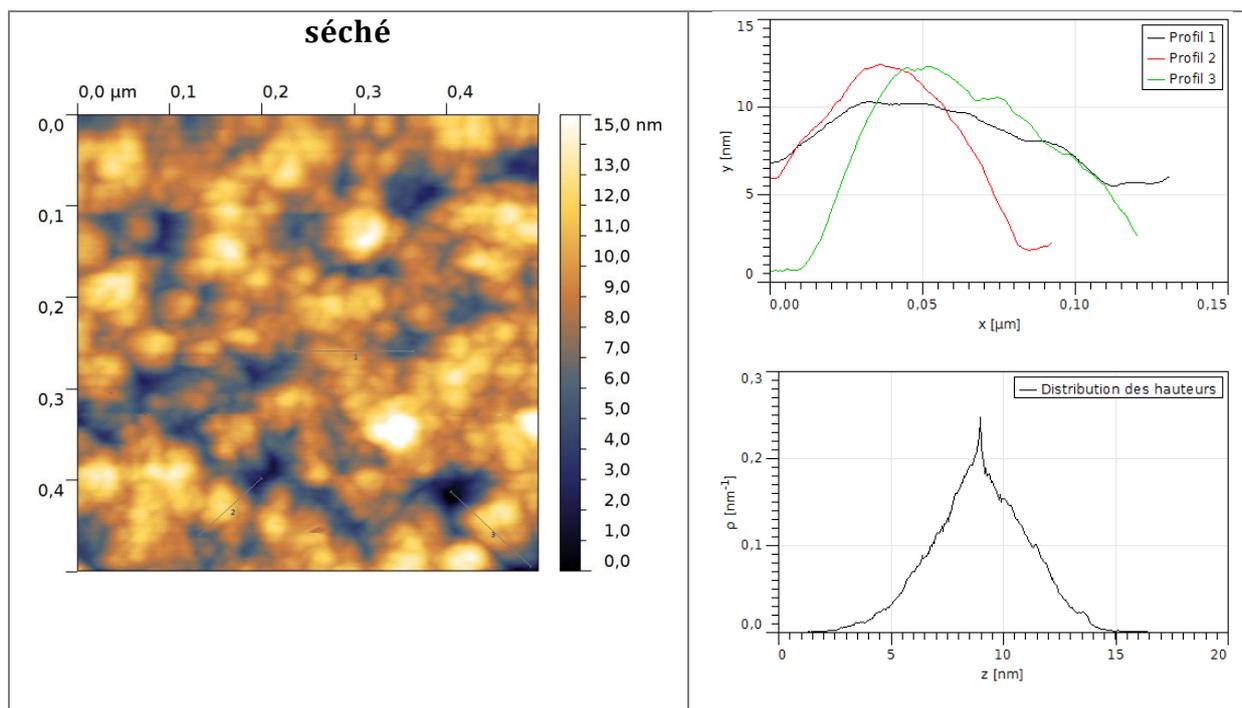


Figure 23 : Images de topographie AFM ($RMS = 2,24nm$) et de mouillabilité d'une goutte d'eau $75,1 \pm 1,4^\circ$ sur une surface SPR Au-SO₂-Brij58 et -PEO₂₃ ayant adsorbé du DOPC dans NaCl. Profils et distribution de hauteur ($\sim 8nm$).

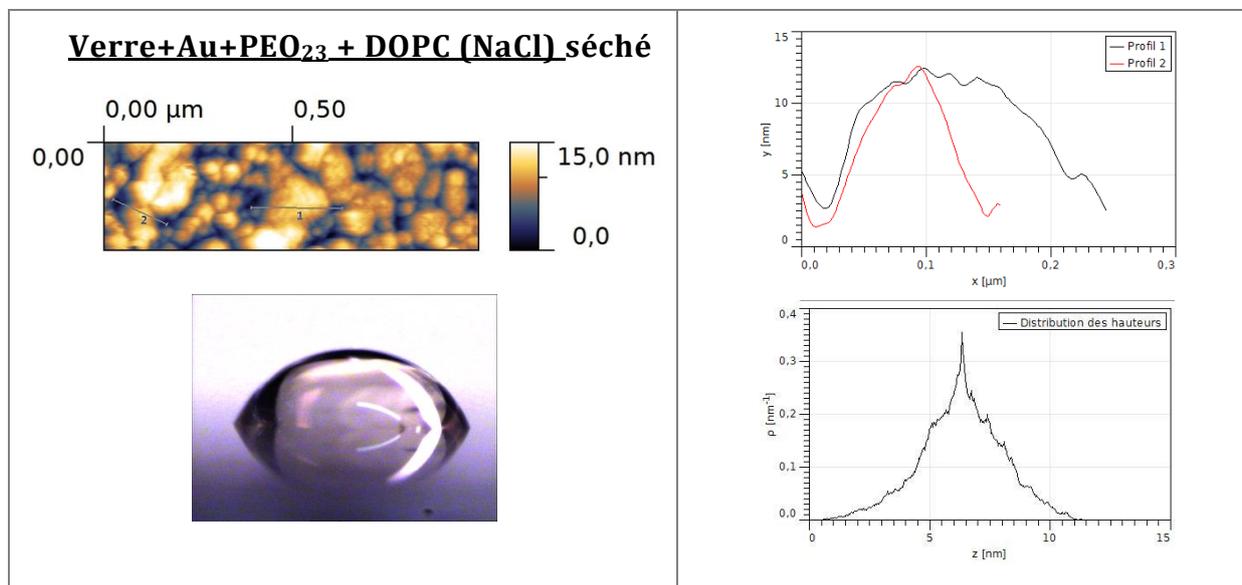


Figure 24 : Images de topographie AFM ($RMS = 3,4nm$) et de mouillabilité d'une goutte d'eau $69,2 \pm 2,7^\circ$ sur une surface SPR Au-SO₂-PEO₂₃ ayant adsorbé du DOPC dans NaCl. Profils et distribution de hauteur ($\sim 6,5nm$).

Les surfaces de Brij58 complété par PEO₂₃ (Figure 23) et de PEO₂₃ seul (Figure 24) exposées à la solution de vésicules de DOPC dans NaCl montrent elles aussi des images topographiques de membrane séchée. La rugosité de ces surfaces a augmenté par rapport aux surfaces d'or nu et est comparable à celles d'or seul ayant adsorbé de la membrane

dans le sel. Ceci montre bien qu'il y a un dépôt de membrane qui se réorganise dans l'air. Nous pouvons voir que l'angle de contact, sur ces surfaces mises au contact des vésicules, est un peu plus faible que sur la surface d'or brut elle-même ($<75^\circ$), mais n'oublions pas que celles-ci étaient devenues beaucoup plus hydrophiles ($<25^\circ$) après la fonctionnalisation PEO₂₃ ou Brij58 (Figure 25). Ces surfaces présentent donc de la membrane adsorbée avec des chaînes orientées côté air.

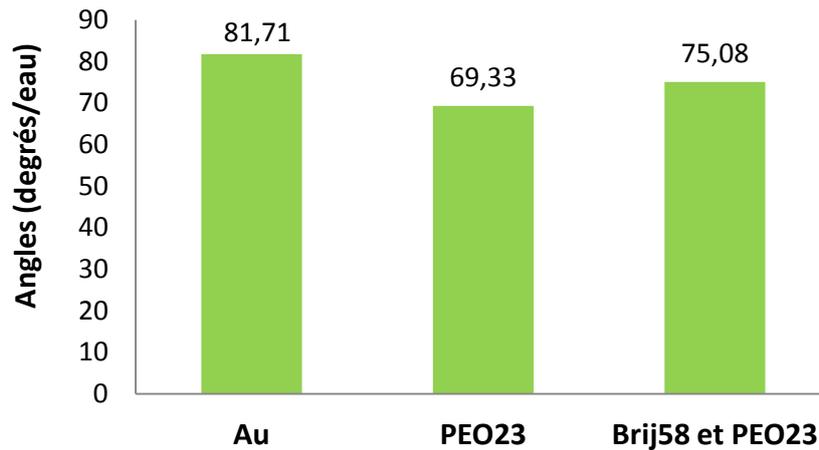


Figure 25 : Angles de contact sur lames SPR d'or, fonctionnalisées Ar-SO₂-Brij58 et Ar-SO₂-PEO₂₃ avec DOPC dans NaCl 150mM et sans DOPC (pour l'or)

Bibliographie Ch.III

- Bailey, F. E. and R. W. Callard (1959). "Some properties of poly(ethylene oxide)¹ in aqueous solution." Journal of Applied Polymer Science **1**(1): 56-62.
- Briscoe, B., P. Luckham, et al. (1996). "Rheological Study of Poly(ethylene oxide) in Aqueous Salt Solutions at High Temperature and Pressure." Macromolecules **29**(19): 6208-6211.
- Chapman, R. G., E. Ostuni, et al. (2001). "Polymeric Thin Films That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria." Langmuir **17**(4): 1225-1233.
- Hardy, G. J., R. Nayak, et al. (2012). "Biomimetic supported lipid bilayers with high cholesterol content formed by alpha-helical peptide-induced vesicle fusion." Journal of Materials Chemistry **22**(37): 19506-19513.
- Heeb, R., S. Lee, et al. (2009). "Influence of Salt on the Aqueous Lubrication Properties of End-Grafted, Ethylene Glycol-Based Self-Assembled Monolayers." ACS Applied Materials & Interfaces **1**(5): 1105-1112.
- Keller, C. A., K. Glasmaster, et al. (2000). "Formation of supported membranes from vesicles." Phys Rev Lett **84**(23): 5443-5446.
- Keller, C. A. and B. Kasemo (1998). "Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance." Biophysical Journal **75**(3): 1397-1402.
- Masuda, Y. and T. Nakanishi (2002). "Ion-specific swelling behavior of poly(ethylene oxide) gel and the correlation to the intrinsic viscosity of the polymer in salt solutions." Colloid and Polymer Science **280**(6): 547-553.
- Nagle, J. F. and S. Tristram-Nagle (2000). "Structure of lipid bilayers." Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes **1469**(3): 159-195.
- Reimhult, E., C. Larsson, et al. (2004). "Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water." Analytical Chemistry **76**(24): 7211-7220.
- Reimhult, E., M. Zach, et al. (2006). "A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂." Langmuir **22**(7): 3313-3319.
- Reviakine, I. and A. Brisson (2000). "Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy." Langmuir **16**(4): 1806-1815.
- Richter, R., A. Mukhopadhyay, et al. (2003). "Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study." Biophysical Journal **85**(5): 3035-3047.

- Richter, R. P., R. Berat, et al. (2006). "Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view." Langmuir **22**(8): 3497-3505.
- Sackmann, E. (1996). "Supported Membranes: Scientific and Practical Applications." Science **271**(5245): 43-48.
- Schönherr, H., J. M. Johnson, et al. (2004). "Vesicle Adsorption and Lipid Bilayer Formation on Glass Studied by Atomic Force Microscopy." Langmuir **20**(26): 11600-11606.
- Shahid, M. N. and V. Tsoukanova (2011). "Effect of Saline on Transitions in Poly(ethylene glycol)-Grafted Succinyl-Phosphoethanolamine Monolayers Bearing C16 Aliphatic Chains." The Journal of Physical Chemistry B **115**(13): 3303-3314.
- Suraniti, E., T. Tumolo, et al. (2007). "Construction of hybrid bilayer membrane (HBM) biochips and characterization of the cooperative binding between cytochrome-c and HBM." Langmuir **23**(12): 6835-6842.
- Tasaki, K. (1999). "Poly(oxyethylene)-cation interactions in aqueous solution: a molecular dynamics study." Computational and Theoretical Polymer Science **9**(3-4): 271-284.

TABLE DES MATIERES CH.IV

CH. IV. ELABORATION D'ELECTRODES ULTRA-PLANES ADAPTEES A L'ETUDE DES MEMBRANES SUPPORTEES..... 159

A. REALISATION DES ELECTRODES DE TYPE COUCHES MINCES DE CHROME SUR VERRE OU SILICIUM, PAR EVAPORATION THERMIQUE ET PULVERISATION CATHODIQUE	161
1. DEPOT DE COUCHES MINCES DE CHROME	161
a. Choix de la technique de dépôt	161
b. Conditions de dépôt des couches-minces de chrome	162
2. QUALITE DES ELECTRODES REALISEES	163
a. Conductivité électrique des couches minces de chrome	164
b. Etat de surface et composition des couches minces de chrome	166
i. Rugosité de surface par microscopie à force atomique	166
ii. Réflectivité spéculaire des rayons x à l'air des couches de chrome	167
iii. Composition par spectrométrie photo-électronique par irradiation X (XPS)	169
3. CONCLUSIONS SUR L'OPTIMISATION DES ELECTRODES DE CHROME.....	172
B. FONCTIONNALISATION DES COUCHES MINCES DE CHROME POUR L'ANCRAGE DES MEMBRANES	173
1. PRE-FONCTIONNALISATION PARABENZENE DE SULFONYLE ET SUR-GREFFAGE DES MOLECULES COMMERCIALES BRIJ58 ET PEO	174
a. Pré-fonctionnalisation parabenzene de sulfonyle par voltamérométrie cyclique	174
b. Sur-greffage des molécules commerciales Brij58 (ancres-harpon) et PEO (coussin hydrophile)	175
2. SIGNATURE ELECTROCHIMIQUE DE LA FONCTIONNALISATION DES COUCHES MINCES	176
3. HOMOGENEITE DE LA FONCTIONNALISATION VERIFIEE PAR AFM A L'AIR.....	180
4. CARACTERISATION DE LA FONCTIONNALISATION PAR REFLECTIVITE DES RAYONS-X A L'AIR.....	183
5. EVOLUTION DE L'ANGLE DE CONTACT ENTRE LES DIFFERENTES ETAPES DE LA FONCTIONNALISATION	184
6. CONCLUSIONS SUR LA FONCTIONNALISATION DES COUCHES MINCES CHROME.....	186
C. FORMATION D'UNE MEMBRANE HARPONNEE SUR LES ELECTRODES DE CHROME PLAN FONCTIONNALISEES	187
1. SIGNATURE ELECTROCHIMIQUE DES MEMBRANES SUR CHROME FONCTIONNALISE	187
2. EVOLUTION DES ANGLES DE CONTACT ET DE LA TOPOGRAPHIE AFM.....	193
3. CARACTERISATION PAR REFLECTIVITE DES RAYONS-X APRES CONTACT AVEC LE DOPC	196
D. DYNAMIQUE DES MEMBRANES SUIVIE PAR FLUORESCENCE. VALORISATION DE LA TRANSPARENCE DES ELECTRODES DE CHROME.....	197
1. DYNAMIQUE DES MEMBRANES BIOMIMETIQUES	197
2. MESURE DES COEFFICIENTS DE DIFFUSION D'UNE BICOUCHE SUPPORTEE.....	199
a. Mesures sur verre nu, mise au point de l'analyse FRAP avec le lipide NBD.	200
b. Couches minces de chrome semi-transparentes pour le FRAP.	201

c. Couches minces de chrome fonctionnalisées PEO hydrophile.....	206
E. CONCLUSIONS DU CHAPITRE.....	208
<u>ANNEXES CH. IV.....</u>	<u>210</u>
A. REFLECTIVITE SPECULAIRE DES RAYONS X ET DES NEUTRONS.....	210
<i>i. Surface idéale : réflectivité de Fresnel :.....</i>	<i>211</i>
<i>ii. Interfaces multiples : théorie dynamique et formalisme matriciel.....</i>	<i>212</i>
<u>BIBLIOGRAPHIE CH. IV</u>	<u>214</u>

Ch. IV. Elaboration d'électrodes ultra-planes adaptées à l'étude des membranes supportées

Ce chapitre vise la réalisation d'un modèle de membrane biomimétique supportée et fluide en pleine immersion. L'étude de la structure et dynamique d'une membrane unique localisée à l'interface solide/solution, impose des contraintes sur le choix du substrat. Celui-ci doit être, ultra-plan (avec une rugosité bien inférieure aux 4nms d'épaisseur de la bicouche), fonctionnalisable, stable dans le temps et adapté à la technique de caractérisation mise en œuvre.

Comme il est bien difficile de réaliser une fonctionnalisation identique de type ancre-harpon sur des substrats de nature différente, il est particulièrement intéressant de pouvoir élaborer un substrat adapté aux différentes approches expérimentales qu'on souhaite utiliser. Nous avons choisi de développer des supports conducteurs, adaptés à l'électro-greffage et à l'analyse électrochimique, mais qui permettent aussi d'utiliser les techniques de caractérisation structurale de la membrane par diffusion des rayonnements X et/ou neutrons. Nous souhaitons aussi que le support de la membrane soit transparent pour utiliser les microscopies optiques (de type fluorescence et exaltées, telles que l'imagerie SPR ou l'imagerie SEEC, (Ausserré and Valignat 2006)). La réflectivité des rayonnements de courte longueur d'onde (x et neutrons) est ici utilisée pour remonter au profil de densité de la membrane perpendiculairement au substrat ; les microscopies donnent une visualisation de l'homogénéité latérale du système ainsi qu'une mesure de la fluidité de la membrane en visualisant la diffusion de marqueurs fluorescents. Les données structurales combinées à l'analyse électrochimique (type EIS, CV...) permettent de remonter aux constantes diélectriques des matériaux et à la dynamique des porteurs de charge près de la membrane. Ces substrats sont aussi utilisables pour l'imagerie par sonde locale (AFM,...), de par leur faible rugosité et ils peuvent constituer la base de biocapteurs électrochimiques

Ces contraintes imposent le choix de certains matériaux ainsi que l'épaisseur des couches à déposer pour conserver la transparence du substrat et sa conductivité (Tableau 1). Nous avons choisi d'élaborer des électrodes ultra-planes en couches minces de chrome sur substrat de verre. Des métaux nobles comme l'or, l'argent ou le platine présentent certains avantages par rapport au chrome dont celui d'être plus inerte et moins résistif au courant électrique : $\rho_{Ag} \sim 15,9$; $\rho_{Au} \sim 22,1$; $\rho_{Pt} \sim 103,5$ et $\rho_{Cr} \sim 129$ en $10^{-7}\Omega\text{cm}$, mais ils ne peuvent pas s'utiliser sans couche d'ancrage sur verre ou silicium en raison de leur faible adhésion (quelques nanomètres de chrome ou de titane sont nécessaires sous l'or, surtout

quand on applique par la suite des champs électriques qui arrachent la couche métallique). Ils sont par contre difficilement utilisables, même en couches minces, pour la réflectivité des rayons x puisqu'ils apportent une densité électronique très élevée à l'interface ($\rho_{Ag}^e \sim 2,766$; $\rho_{Pt}^e \sim 4,890$; $\rho_{Au}^e \sim 4,425$ et $\rho_{Cr}^e \sim 1,985$ en électrons/Å³ pour des RX de 8,042 keV) et donc un contraste important avec l'air ou le solvant et le substrat ($\rho_{Si}^e \sim xxx$), ce qui rend la membrane supportée sur ces couches difficile à résoudre. De plus, l'absorption des neutrons par ces métaux les rend difficiles à utiliser ($\sigma_{Ag}^{Abs} \sim 63,3$; $\sigma_{Pt}^{Abs} \sim 10,3$; $\sigma_{Au}^{Abs} \sim 98,65$ et $\sigma_{Cr}^{Abs} \sim 3,05$ en Barns pour des neutrons de 2200m/s). Aux neutrons, le faisceau passe généralement par le substrat de silicium qui est pratiquement transparent ($\sigma_{Si}^{Abs} \sim 0,171$). Les sections efficaces de diffusion cohérente qui apportent le contraste avec le substrat étant aussi à l'avantage du chrome qui a une valeur proche de celle du silicium ($\sigma_{Si}^{Dif} \sim 2,167$ Barns alors que $\sigma_{Ag}^{Dif} \sim 4,407$; $\sigma_{Pt}^{Dif} \sim 11,58$; $\sigma_{Au}^{Dif} \sim 7,32$ et $\sigma_{Cr}^{Dif} \sim 1,66$).

L'empilement Verre/Cr/Au est forcément moins mince que Verre/Cr quand la conductivité de la couche est suffisante pour l'utilisation des méthodes électrochimiques. Nous avons aussi utilisé des substrats de silicium car ils font partie des surfaces les plus planes dont nous pouvons disposer et ils sont adaptés à la réflectivité des neutrons via le substrat. Par contre ils ne sont pas transparents et interdisent l'utilisation des microscopies au travers du substrat. Le caractère semi-conducteur dopé des siliciums utilisés complique l'application de l'électrochimie (discuté plus loin).

Tableau 1 : Utilisation de divers supports pour l'étude des membranes uniques. Une version enrichie par la discussion qui suit se trouve en conclusion du chapitre

Substrat	Electrochimie	Microscopie Optique via le substrat	RX sur membrane	Réflectivité neutrons sur membrane via substrat	Absence de pollution (largage) ou d' oxydation (stabilité) dans l'eau
Substrat Verre ou Quartz	✘	✓	✓	✘	✓
Verre/ITO	✓	✓	✓	✘	✘
Substrat Saphir	✘	✓	✓	✓	✓
Couche mince Cr (transparent)	✓	✓	✓	✘	✘
Couche mince Au (transparent)	✓	✓	✘	✘	✓
Substrat Si (dopé P)	✓	✘	✓	✓	✘

La grande majorité des travaux publiés utilisent un substrat par technique expérimentale (dont celles qui font office de référence pour l'analyse de l'EIS à partir des données structurales issues de la réflectivité des neutrons, (McGillivray, Valincius et al. 2007; Hertrich, Stetter et al. 2014)). Nous cherchons ici à combiner, éventuellement simultanément, des mesures structurales et électrochimiques sur la même membrane supportée. Le tableau ci-dessus résume les aspects discutés dans cette introduction.

A. Réalisation des électrodes de type couches minces de chrome sur verre ou silicium, par évaporation thermique et pulvérisation cathodique

Nous avons réalisé des films minces de chrome conducteurs et de très faible épaisseur pour que ceux-ci soient transparents à la lumière visible lorsqu'ils sont déposés sur du verre et utilisables en microscopie via le substrat. Au-dessus d'environ 40nm, ils ne sont pas assez transparents. Pour les plus minces, il faut alors vérifier qu'ils restent conducteurs et mesurer cela quantitativement, car le chrome diffuse dans le verre et s'oxyde par ses deux interfaces. La conductivité de ces films va dépendre de leur épaisseur, du degré d'oxydation (formation d'un profil de Cr_2O_3) et de la nature du substrat (verre ou silicium).

1. Dépôt de couches minces de chrome

a. Choix de la technique de dépôt

Parmi les différentes méthodes de dépôt des couches minces, le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) et le dépôt physique en phase vapeur (PVD) sont particulièrement utilisées. Les couches minces obtenues suite à une réaction chimique entre des produits gazeux appartiennent à la catégorie "dépôt chimique en phase vapeur" et celles obtenues par la condensation sur l'interface d'un matériau à partir de sa phase vapeur sont dits "dépôts physiques en phase vapeur". Les couches minces chimiques sont souvent contaminées par des gaz résiduels de la réaction, au contraire les couches minces physiques sont denses, non contaminées et le processus de dépôt mieux contrôlé. De nombreux procédés de revêtements physiques existent (l'évaporation par faisceau d'électrons, l'évaporation thermique, la pulvérisation cathodique,...). Parmi ceux-ci, citons les plus performants et ceux dont on dispose au Mans (Evaporation thermique et pulvérisation cathodique) :

- L'évaporation par faisceau d'électrons utilise le bombardement de la cible (matériau pour le dépôt) sous vide poussé, par un faisceau d'électrons émis par un

filament de tungstène. Le faisceau transforme la cible en phase gazeuse et ces molécules précipitent alors sous forme solide sur un substrat de notre choix ;

- L'épithaxie par jets moléculaires (ou MBE pour « Molecular Beam Epitaxy ») est une technique consistant à envoyer un ou plusieurs jets moléculaires vers un substrat préalablement choisi pour réaliser une croissance souvent épithaxiale. Elle permet de faire croître des échantillons plans à l'échelle atomique de plusieurs centimètres carrés et à une vitesse d'environ une monocouche atomique par seconde ;
- L'évaporation thermique repose sur l'échauffement par effet Joule d'un matériau jusqu'à le vaporiser pour qu'il se dépose ensuite sur le substrat ;
- La pulvérisation cathodique passe par la création d'une vapeur métallique suite à un bombardement physique de la cible par un flux de gaz inerte (Ar, ...).

L'épithaxie par jets moléculaires est certainement la technique la plus appropriée pour élaborer des substrats ultra-plans puisqu'elle donne généralement les plus faibles rugosités et de fortes densités, mais c'est aussi la technique la plus coûteuse et souvent réservée à la recherche en nano-électronique. L'évaporation par faisceau d'électrons conduit à des couches moins homogènes, souvent suite à la dégradation des filaments du canon à électrons qui donnent un taux d'évaporation non-uniforme. Parmi les techniques accessibles sur le campus du Mans, l'évaporation thermique se trouve dans le laboratoire IMMM. La morphologie des films déposés est liée au rapport entre la température du substrat et la température de fusion du matériau à déposer. Ces dépôts peuvent être légèrement poreux avec la présence de grains fins sur le dessus liés à la taille des clusters qui s'amassent sur le substrat pendant le dépôt. Une étude sur la réalisation de quelques films par pulvérisation cathodique a néanmoins été menée dans le cadre du stage de Natalia Massara à l'ENSIM pour comparaison, elle est présentée section 2.

b. Conditions de dépôt des couches-minces de chrome

Des lamelles de verre sont préparées afin d'éliminer tous résidus organiques et favoriser l'adhésion du chrome sur la surface. Le protocole de nettoyage se base sur la littérature et est décrit en annexe (Protocole de nettoyage des lamelles de verre avant dépôt de chrome).

Pour les dépôts de chrome, l'appareillage d'évaporation thermique utilisé est un équipement ME 300 de la société Plassys (Marolles-en-Hurepoix, France). Cet appareil permet de générer un vide à 10^{-5} Pa et de disposer d'une gamme de vitesse de dépôt allant de 0,01nm/s à 1 μ m/s. Le contrôle de l'épaisseur de chrome déposé se fait grâce à une microbalance à cristal de quartz placée à côté des échantillons. Pour fonctionnaliser les électrodes et faire une étude électrochimique de l'interface, il est nécessaire de déposer un film de chrome assez épais pour conduire le courant sans qu'il y ait une trop grande

résistance. A l'inverse, pour former une belle membrane sur la surface fonctionnalisée nous avons besoin que le film de chrome soit peu rugueux ($< 1\text{nm}$) et donc assez mince. Cette condition permet aussi l'utilisation par la suite des microscopies optiques via le substrat et de la réflectivité X. Pour ces raisons nous avons généralement déposé un film de chrome d'épaisseur visée à 30 nm ou moins. Le film mince se construit sous vide par la sublimation d'une infime partie des graviers de chrome (Neyco, 99.99% de pureté) situés face aux lamelles de silice, à une vitesse moyenne de 0.1 nm/s. Après le dépôt, les échantillons sont ramenés à température ambiante dans l'enceinte sous vide avant d'être retirés.

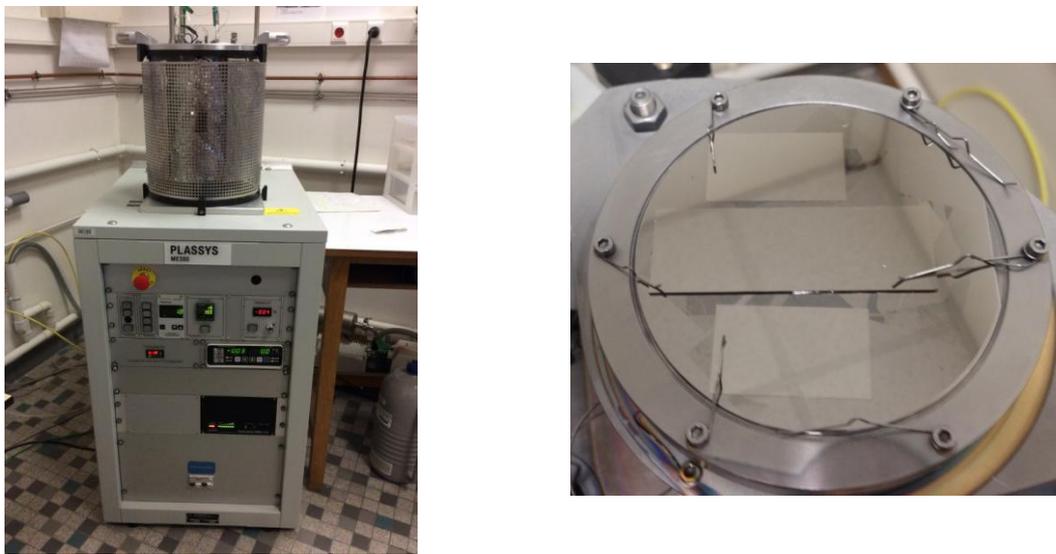


Figure 1 : Photographies de l'appareillage d'évaporation thermique et des lames et lamelles de verre après dépôt de chrome sur celles-ci.

Les électrodes de chrome sont ensuite fonctionnalisées dans les deux jours qui suivent le dépôt pour limiter l'effet de vieillissement du chrome dans le temps. Pour transmettre le courant à la couche métallique, un ruban de cuivre est maintenu par contact mécanique sur la couche de chrome. Un fil de cuivre soudé sur ce ruban permet de faciliter le branchement de l'électrode au potentiostat.

2. Qualité des électrodes réalisées

Les dépôts de chrome réalisés ont été caractérisés en termes de transparence optique, de rugosité et densité (par AFM, réflectivité X et XPS pour certains). La conductivité électrique a été mesurée par la technique quatre pointes (annexe : Mesure quatre pointes pour la conductivité) et les propriétés électrochimiques en solution par CV et EIS faradique et non-faradique. Nous avons aussi comparé la conductivité des couches minces obtenues par évaporation thermique à celles obtenues par pulvérisation cathodique. L'objectif étant

de diminuer l'épaisseur déposée autant que possible en conservant une bonne conduction. Les dépôts par pulvérisation ont été réalisés sur deux types de surfaces : verre et silicium, en faisant varier le temps de dépôt afin d'étudier différentes épaisseurs.

a. Conductivité électrique des couches minces de chrome

Les résultats de conductivité des films de chrome issus des techniques d'évaporation et de pulvérisation sont comparés sur la Figure 2 et les valeurs reportées dans le Tableau 2.

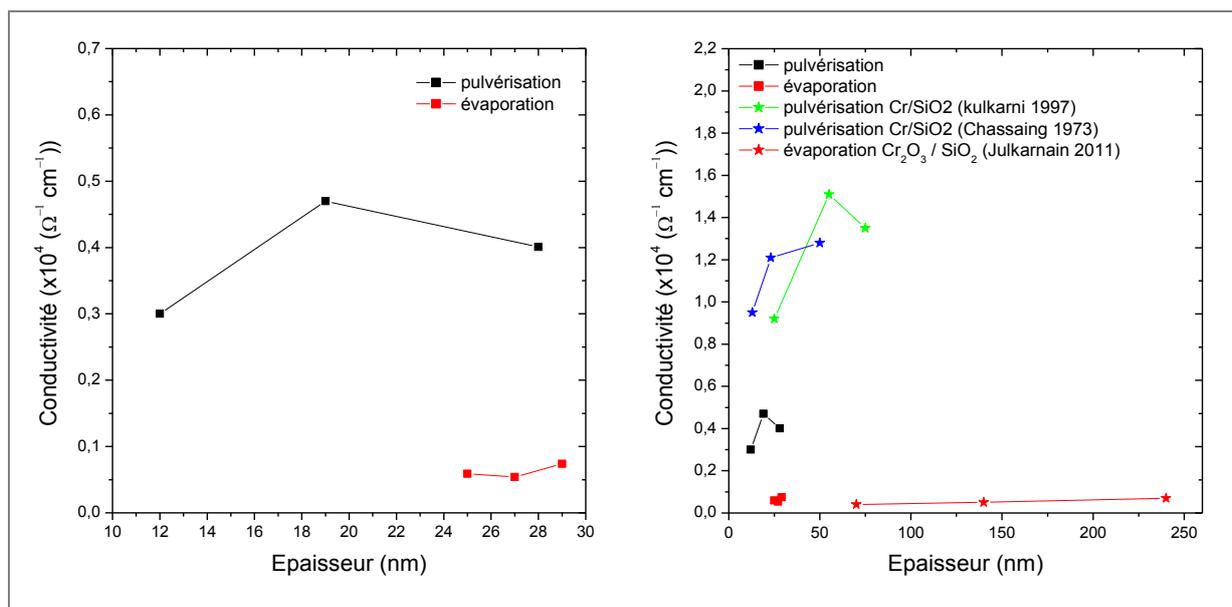


Figure 2 : Conductivité des couches de chrome déposées par pulvérisation cathodique et évaporation thermique en fonction de leur épaisseur (à gauche) et comparées à la littérature (à droite)

Tableau 2 : Conductivités (obtenue par mesure 4 pointes) et épaisseurs (obtenue par mesure RX) de dépôts par pulvérisation cathodique et par évaporation thermique.

Evaporation thermique			Pulvérisation cathodique		
Pression (Pa)	Epaisseur (nm)	Conductivité (Ω ⁻¹ .cm ⁻¹)	Pression (Pa)	Epaisseur (nm)	Conductivité (Ω ⁻¹ .cm ⁻¹)
1,14.10 ⁻³	25	0,59 x 10 ³	1,50	12	0,3 x 10 ⁴
1,14.10 ⁻³	27	0,54 x 10 ³	1,52	19	0,47 x 10 ⁴
1,14.10 ⁻³	29	0,74 x 10 ³	1,53	28	0,4 x 10 ⁴

Nous constatons que les couches de chrome pulvérisées ont une meilleure conduction que celles évaporées (pratiquement un facteur dix, Tableau 2). Ceci est lié à la structure et aux défauts piégés dans la couche de chrome. La jonction des grains de chrome des films formés par pulvérisation est meilleure que celle des films formés par évaporation pour laquelle l'énergie cinétique des agrégats de chrome est plus faible. De plus, au vu des comparaisons faites avec la littérature dont les valeurs de conductivité des films de Cr_2O_3 se rapprochent des nôtres (Figure 2), il semble qu'une couche d'oxyde plus importante se soit formée par évaporation que par pulvérisation, après quelques heures ou jours.

La conduction des films minces déposés par pulvérisation sur verre a été mesurée un mois plus tard, pour connaître l'effet du vieillissement (électrodes conservées dans des boîtes fermées sous hotte mais à l'air ambiant). Cette même étude a été effectuée sur silicium, substrats de prédilection pour la réflectivité neutron (Figure 3).

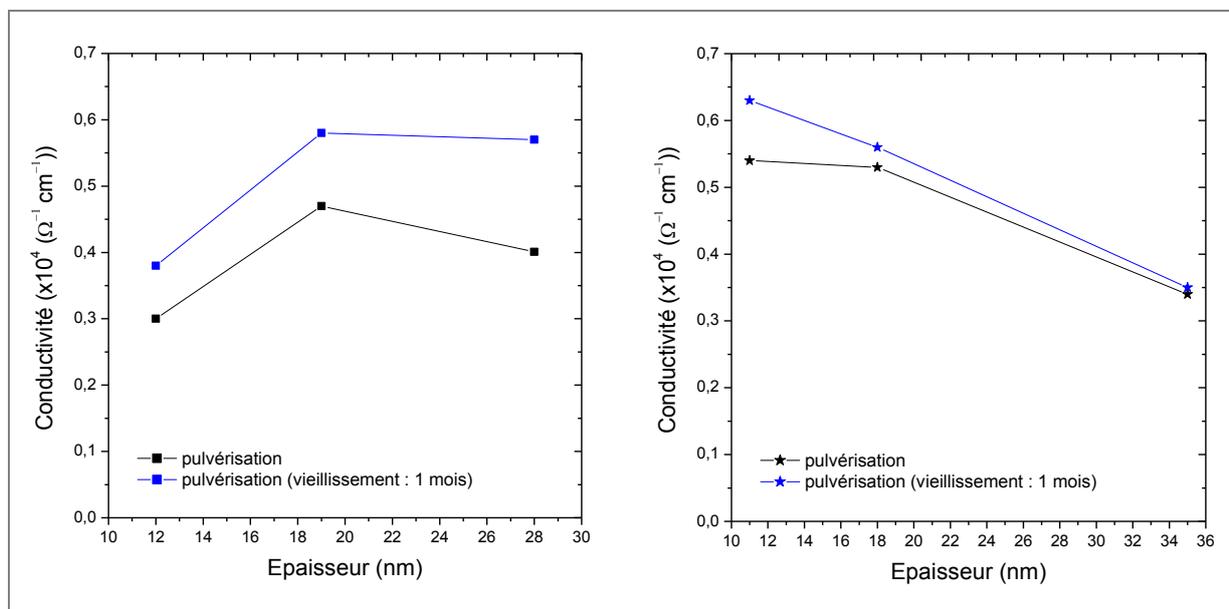


Figure 3 : *Conductivité des couches de chrome déposées par pulvérisation cathodique sur verre (à gauche) et sur silicium (à droite) en fonction de leur épaisseur*

Nous pouvons nous attendre à ce que la conduction diminue avec le vieillissement si la couche d'oxyde évolue, cependant, nous constatons que son évolution reste faible et varie peu avec l'épaisseur de chrome déposée sur verre. Sur silicium, on remarque qu'elle diminue avec l'épaisseur, ce qui est probablement dû à des effets complexes liés à la jonction du conducteur et du semi-conducteur, effets que nous n'avons pas explorés puisque la littérature du domaine indique de grandes variations des conductivités obtenues suivant les paramètres de dépôt et ceci d'une machine à l'autre (Figure 2). Nous pouvons prédire que la conductivité remonte aux plus fortes épaisseurs de chrome sur

silicium, quand moins d'électrons injectés atteignent le semi-conducteur. Par contre la rugosité augmente généralement avec l'épaisseur de la couche.

Cette étude récente par pulvérisation cathodique nous montre qu'il sera possible suivant nos protocoles sur verre de diminuer encore l'épaisseur du chrome en conservant une bonne conduction pour l'électrochimie. Nous pouvons de même considérer que la conductivité de nos couches minces (par évaporation ou pulvérisation), est relativement stable dans le temps suivant nos protocoles et suffisante pour l'électrochimie, même si elle est certainement affectée par la présence d'oxydes de chrome en surface.

b. Etat de surface et composition des couches minces de chrome

i. Rugosité de surface par microscopie à force atomique

Les mesures AFM de la surface des couches minces de chromes montrent une faible rugosité avec une légère augmentation de celle-ci avec l'épaisseur déposée (Figure 4) mais qui restent inférieures au nanomètre (condition nécessaire pour pouvoir étudier le profil des membranes par la suite).

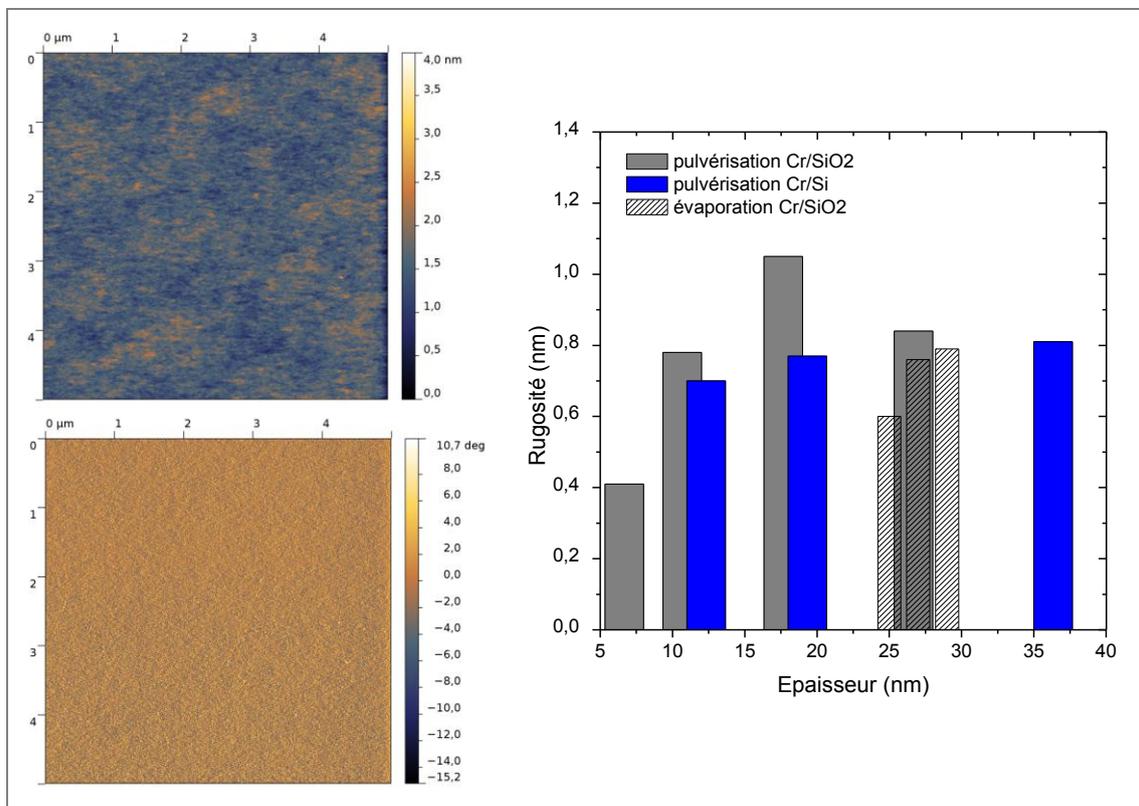


Figure 4 : Images AFM de topographie (en haut à gauche) et de phase (en bas à gauche) d'une électrode de chrome obtenue par évaporation thermique (5x5µm, RMS=0,6nm) et diagramme des

rugosités des couches de chrome déposées sur verre et sur silicium en fonction de leur épaisseur (à droite)

ii. Réflectivité spéculaire des rayons x à l'air des couches de chrome

Les couches minces de chrome ont été caractérisées par réflectivité spéculaire des rayons x à l'air (Figure 5). La technique est présentée en annexe. L'analyse de la réflectivité x permet de remonter aux profils de densité électronique en profondeur des couches minces (profils de la Figure 6), exprimés ici sous la forme d'une succession de couches homogènes séparées par des interfaces rugueuses et diffuses ayant un profil de type fonction erreur. Les meilleurs ajustements des courbes de réflectivité x spéculaire sont superposés aux courbes mesurées sur la Figure 5 pour trois épaisseurs de chrome déposées sur verre (lames de microscope, SiO₂) par pulvérisation ou évaporation, ou sur silicium par pulvérisation (wafers Siltronix, Si). Chacun de ces ajustements est obtenu pour un jeu de paramètres correspondant aux épaisseurs, densités et rugosités d'interface de chaque couche. Ils sont donnés dans le Tableau 3 pour les meilleurs ajustements de la Figure 5.

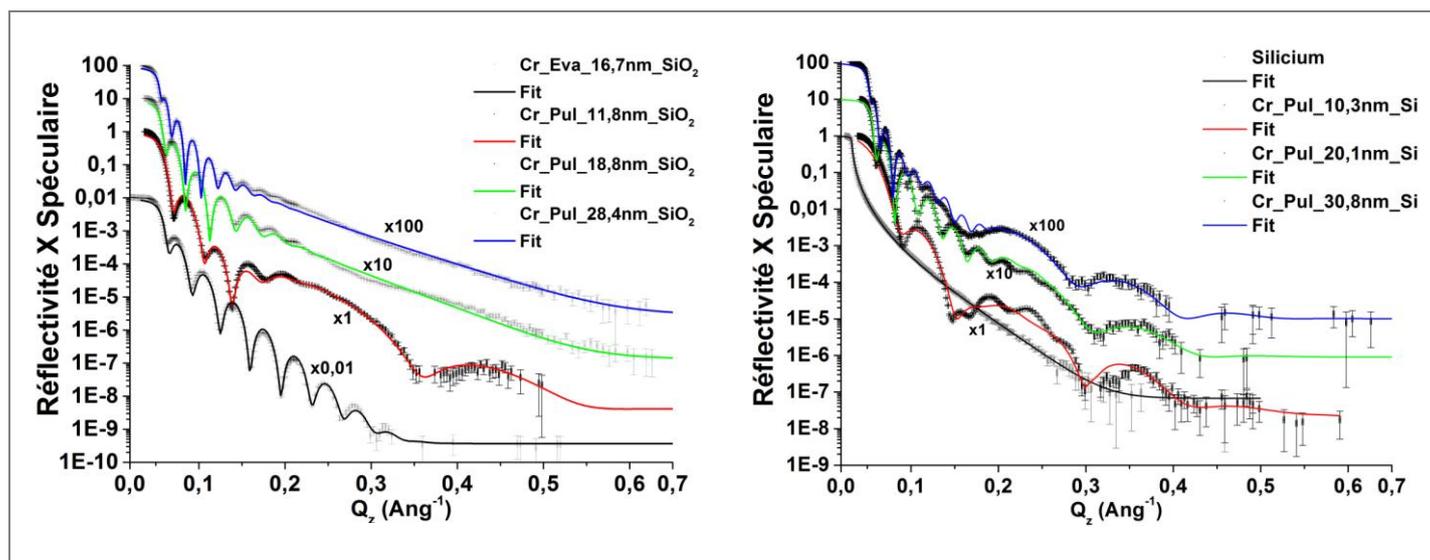


Figure 5 : Réflectivité spéculaire des rayons x des couches de chrome sur verre (à gauche) et sur silicium (à droite). Ajustements obtenus avec les jeux de paramètres présentés dans le tableau ci-dessous.

Pour identifier les matériaux qui composent ces couches, nous pouvons comparer ces paramètres ajustés aux valeurs calculées et attendues pour le chrome, ses oxydes, le verre ou le silicium. En partant des densités volumiques des matériaux considérés, nous avons construit le tableau joint en annexe, présentant notamment les densités électroniques des différentes couches quand celles-ci sont constituées d'un matériau unique et dense (pour les expériences de réflectivité x et neutron, discutée ultérieurement). Ces valeurs sont calculées à partir des constantes atomiques élémentaires données par le NIST en fonction

Ch. IV. Elaboration d'électrodes ultra-planes adaptées à l'étude des membranes supportées

des énergies des rayonnements utilisés et tiennent compte des mélanges isotopiques naturels pour les neutrons (<http://www.nist.gov/pml/data/xraycoef/index.cfm>).

*Tableau 3 : Paramètres d'ajustement des courbes de réflectivité x présentées ci-dessus. L'épaisseur des couches d est donnée en Å ainsi que les rugosités σ (RMS). Les indices optiques des matériaux aux rayons x sont exprimés ici sous forme de densité de longueur de diffusion complexe ρb (en Å⁻²). La densité électronique ρ_e (électrons/Å³) s'obtient par division de $Re(\rho b)$ par la constante $r_0 = 2.81794.10^{-5}$ Å. L'absorption des rayons x est quantifiée par la partie imaginaire $Im(\rho b)$, souvent fixée pendant l'ajustement (marquées de *). Certaines valeurs calculées pour des matériaux purs sont indiquées en italique et bleu dans le tableau pour être comparée aux valeurs ajustées de l'expérience.*

Echantillons: Couches minces	Substrat				1				2				3			
	-	$Re(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$Im(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$\sigma, \text{Å}$	$d, \text{Å}$	$Re(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$Im(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$\sigma, \text{Å}$	$d, \text{Å}$	$Re(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$Im(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$\sigma, \text{Å}$	$d, \text{Å}$	$Re(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$Im(\rho b),$ $\times 10^{-6}$ Å ⁻²	$\sigma, \text{Å}$
Substrat de Verre Nu (nettoyé mais partiellement)	Verre: -	<i>17,6 à 19</i>	<i>0,228</i>													
	-	19	0,228*	10,3												
Chrome évaporé sur verre	Verre: -				Cr: 55,9	5,73										
	-	18,9	0,228*	3,7	167,6	55,4	5,73*	9,9								
Chrome pulvérisé sur verre	Verre: -				Cr: "	"	"									
	-	18,9	0,228*	4,6	118	55,2	5,73*	14,8								
Chrome pulvérisé sur verre	Verre: -				Cr: "	"	"									
	-	19	0,228*	4	188,2	53	5,73*	13,6								
Chrome pulvérisé sur verre	Verre: -				Cr: "	"	"									
	-	18,8	0,228*	3,5	284	53,8	5,73*	16,3								
Substrat de silicium Nu (nettoyé mais partiellement)	Silicium: -	<i>19,9 à 20,7</i>	<i>0,458 à 0,471</i>													
	-	21	0,471*	6,7												
Chrome évaporé sur silicium	Silicium: -				<i>SiCr₂O₃:</i>				<i>Cr:</i> 55,9	5,73		<i>Cr₂O₃:</i>				
	-	20,7	0,471*	9,6	19,4	28	0,1	8,2	45	56	5,73*	6,2	35	51	2,34	2,9
Chrome évaporé sur silicium	Silicium: -				<i>Cr:</i> 55,9	5,73			<i>Cr:</i> 55,9	5,73			<i>Cr₂O₃:</i> 41,9	2,9		
	-	19,5	0,471*	5,8	43,2	60	3,06	3,9	120,6	52,9	5,73*	12,9	37	46,1	0,4	13
Chrome évaporé sur silicium	Silicium: -				<i>SiCr₂O₃:</i>				<i>Cr:</i> 55,9	5,73		<i>Cr₂O₃:</i> 41,9	2,9			
	-	22	0,471*	5	48,7	50	0,42	3	224,1	48,3	5,73*	14,9	34,6	31,1	1,3	15

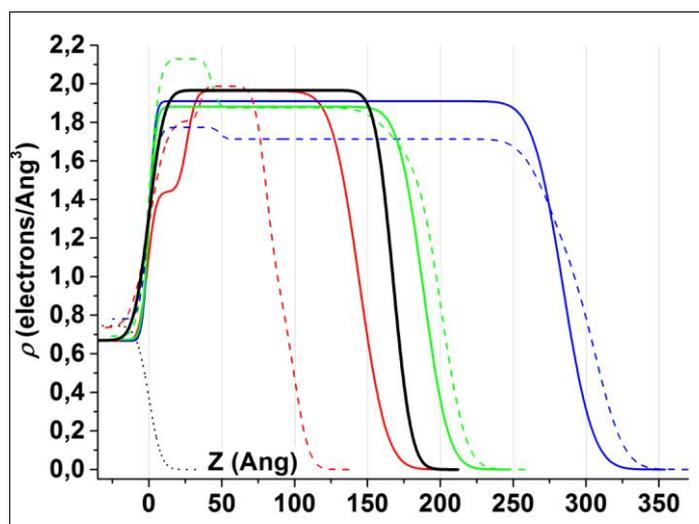


Figure 6 : Profils de densité électronique des films en profondeur, correspondant aux meilleurs ajustements des courbes de réflectivité x . Les densités de longueur de diffusion ont été converties en densités électroniques (en divisant la densité de longueur de diffusion $Re(\rho b)$ par $r_0=2.81794 \cdot 10^{-5}$ Å). La courbe noire correspond à un film obtenu par évaporation thermique sur verre. Les courbes en trait plein à des dépôts par pulvérisation cathodique sur verre et les traits pointillés sur silicium

Sur verre et silicium, les profils de densité électronique montrent des couches denses de chrome métallique au cœur des films à la densité attendue ($\rho_{e,Cr} \sim 1,98 \text{ \AA}^{-3}$). Nous obtenons un bon contrôle de l'épaisseur déposée mais la loi de dépôt à utiliser dépend du substrat et doit être calibrée indépendamment sur chaque instrument suivant celui-ci en raison des propriétés de conduction thermique différentes entre le verre et le silicium.

Pour les couches les plus fines et tout particulièrement sur le silicium plan, nous voyons qu'il faut de plus ajouter dans le profil des interfaces, une couche intermédiaire correspondant à la présence d'oxydes de chrome (de densité électronique comparable au Cr_2O_3). Du côté du substrat le profil de densité montre bien la diffusion du chrome sur environ 1 nm, ce qui permet d'avoir un bon encrage de la couche mince. Sur les couches les plus épaisses, on est moins sensibles au détail du profil de l'interface côté substrat, notamment en raison de l'absorption des rayons X dans la couche de chrome qui précède. La prise en compte des absorptions de chaque couche (via le paramètre $Im(\rho b)$) est primordiale pour obtenir de bons ajustements des mesures. On obtient dans tous les cas des profils de densité très simples sur le verre et ceux sur silicium montrent la présence plus marquée de couches de nature intermédiaires et nécessitent d'être ajustés plus finement par des fonctions de profil plus complexes. Pour ceux-ci un histogramme à trois ou quatre couches séparées par des fonctions erreur ne suffit plus. Ceci sera confirmé par la suite, par spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) mesurée à différentes profondeurs par ablation progressive de la couche. Des phases de chrome oxydé plus stables que le chrome métallique sont attendues quand on laisse le substrat en contact avec l'air. Côté air, le profil de l'interface tient compte des effets liés à la formation d'oxydes de chrome en surface et les effets liés à la rugosité topographique (rugosité Gaussienne, RMS). Les rugosités sont en bon accord avec celles mesurées en AFM à l'air.

Nous verrons que la présence d'oxydes n'empêche pas le chemin réactionnel mis au point au chapitre II, notamment car les films métalliques conservent une bonne conduction électrique.

iii. Composition par spectrométrie photo-électronique par irradiation X (XPS)

L'analyse de la composition chimique en surface et en profondeur de quelques couches minces de chrome déposées par pulvérisation sur SiO_2 a été réalisée par spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X avec ablation progressive par jet d'argon (XPS, en collaboration avec Anna Bajorek, University of Silesia, Katowice, Pologne).

La Figure 7 présente les spectres XPS d'une couche mince de chrome de 30nm, obtenus sans ablation en conditions obliques d'irradiation, qui permet de récolter les photoélectrons provenant plus spécifiquement de la surface de l'échantillon.

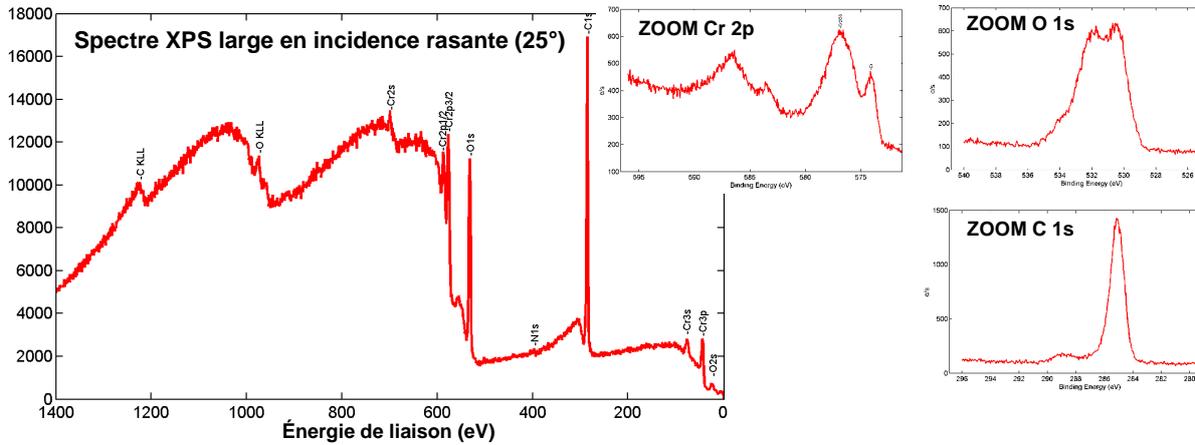


Figure 7 : Spectres XPS d'une couche mince de 30nm de chrome déposée par pulvérisation cathodique sur lame de verre, mesurée en incidence oblique à 25°. Des mesures mieux résolues en énergie sont présentées à droite autour des énergies des liaisons Cr2p, O1s et C1s

Le passage de l'incidence normale à oblique permet d'identifier une variation d'intensité des pics du carbone et du silicium qui peuvent être attribués à une micropollution de surface. Celle-ci peut s'attendre quand les échantillons voyagent, sont manipulés et redécoupés à l'air libre pour la mesure. En dehors du carbone et silicium, les spectres sont semblables pour tous les échantillons mesurés (11,8 ; 18,8 et 28,4nm) et ils permettent d'identifier les niveaux électroniques de cœur du chrome métallique, ainsi que de ses oxydes non-stœchiométriques (Cr_xO_y) et du sesquioxyde de chrome (Cr_2O_3 ou Oxyde de chrome (III)), le plus stable. Nous avons regroupé les énergies de liaison mesurées pour le plus épais dans le Tableau 4 et l'intégration des pics conduit à une composition relative entre éléments chimiques.

Tableau 4 : Identification partielle des éléments chimiques en surface par XPS en incidence rasante

Film Cr 28,4 nm (irradiation oblique) % élément	Environnement chimique	Liaison identifiée	Energie (eV)	% comp./élément	Source
Cr 8,39%	Cr_2O_3	Cr 2p3/2	576,685	83,32	Couche mince Cr, Cr_xO_y
		Cr 2p3/2	574,026	16,62	Couche mince Cr, Cr_xO_y
O 25,28%	Cr_2O_3	O 1s	534,076	6,57	
		O 1s	532,969	58,69	
		O 1s	530,322	34,74	Couche mince Cr, Cr_xO_y
C 64,44%		C 1s	288,78	8,09	Pollution surface
		C 1s	285,941	15,18	Pollution surface
		C-C	285,072	76,73	Pollution surface

Pour étudier la composition en profondeur, les films ont ensuite été soumis à un bombardement d'ions argon (Ar+) afin d'abraser progressivement les matériaux. Une série de 25 bombardements d'Ar+ à 500 eV d'une minute sur 1x1 mm², avec collecte entre chacun d'un spectre mesuré en incidence oblique, permet d'établir l'évolution du profil en composition présentée sur la Figure 8. Cette première abrasion permet tout juste d'éliminer la pollution de surface du film le plus épais. Elle est suivie par 325 minutes cumulées de bombardements de 5 minutes à la même énergie et finalement d'un bombardement plus efficace à 4 keV sur une empreinte de 2x2mm² pendant 90 minutes par séquences de 10 minutes. La fin de la seconde séquence correspond à une profondeur sans traces de polluants composée de ~43% de chrome et 57% d'oxygène pouvant correspondre à du Cr₂O₃. La dernière séquence plus énergétique entame la couche mince et une zone centrale de chrome métallique avec moins de 15% d'oxygène en composition. On atteint ensuite un mélange d'oxydes de chrome dont le CrO₃ et de silicium puis la composition du verre. Le diagramme d'Ellingham-Richardson montre qu'à température et pressions partielles d'oxygène ambiantes ($pO_2 \sim 0.2$ atm), le silicium est plus réducteur que le chrome (enthalpie de formation de SiO₂ plus faible que celle de Cr₂O₃). En l'occurrence, le verre ne devrait pas oxyder spontanément le chrome métallique (meilleur réducteur que Si, *i.e.* Cr₂O₃ est un meilleur oxydant que SiO₂). On peut par contre s'attendre à une légère diffusion du chrome et à la formation d'une couche d'oxydes sur quelques nanomètres au contact de SiO₂.

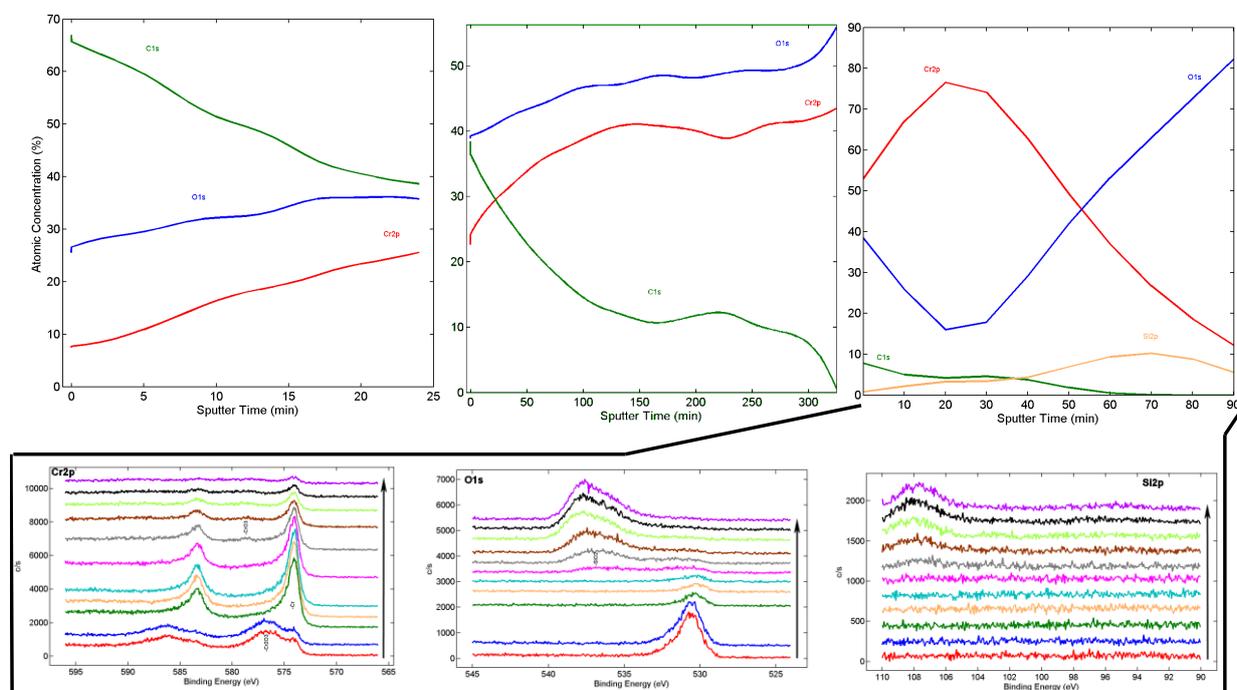


Figure 8 : Evolution des compositions chimiques en profondeur de la couche mince de 30nm étudiée en XPS suite à trois séquences différentes de bombardement d'ions Ar+. Dessous sont présentées les zones d'intérêt correspondantes pour l'état Cr_{2p}, O_{1s} et Si_{2p} en fonction du temps pour la dernière séquence

A l'interface avec l'air, l'enthalpie de formation de l'oxyde de chrome nous indique qu'on s'attend à la formation spontanée de chrome corrodé et à une couche de passivation nanométrique en Cr_2O_3 transparent, bien visible en réflectivité spéculaire des rayons X. Rappelons que cela impacte la conductivité (mesures quatre pointes sur la surface présentées précédemment) et nous allons vérifier dans la suite que l'oxyde n'est pas un élément bloquant pour l'électrochimie et les fonctionnalisations envisagées.

3. Conclusions sur l'optimisation des électrodes de chrome

Les valeurs de conduction de la couche de chrome pour de faibles épaisseurs (testées jusqu'à 12nm) montrent qu'il est possible de fonctionnaliser des couches très minces. Le dépôt de chrome par évaporation thermique donne de bonnes valeurs de conduction proche de celles données dans la littérature. Il serait possible d'utiliser d'autres techniques de dépôt qui améliore encore cette conduction (pulvérisation cathodique par exemple) et permettent ainsi la diminution de l'épaisseur du métal. La possibilité de diminuer la couche métallique permet l'obtention d'électrodes très transparentes (Figure 9) et donc l'utilisation des microscopies optiques, en fluorescence par exemple, à puissance laser réduite pour réaliser par exemple de l'imagerie ou du photo-blanchiment à partir de sondes de fluorescence introduites dans la membrane (résultats présentés par la suite). D'autre part, elle permet aussi de limiter l'augmentation de la rugosité de surface pendant le dépôt conducteur. Avec un métal léger en densité électronique et de faible épaisseur, il devient possible d'utiliser la réflectivité des rayons x pour étudier les couches très minces et donc la structure d'une membrane.

La conductivité des couches minces sur silicium rend aussi possible l'étude de ce modèle de membrane supportée par réflectivité neutrons. Une alternative qui n'a pas été explorée ici, serait de travailler sur saphir transparent aux neutrons (bloc de saphir plan (Oleson, Sahai et al. 2012)) mais l'épaisseur des substrats nécessaire au passage des neutrons par le substrat est incompatible avec la conservation d'une épaisseur faible du substrat transparent qui est nécessaire en imagerie pour travailler avec des ouvertures numériques élevées. Dans notre cas, les substrats dédiés à la réflectivité des neutrons ne seront pas ceux utilisés en microscopies. Nous pouvons par contre mettre en jeu la même chimie et fonctionnalisation de surface en partant d'une couche très mince de chrome, identique sur verre ou silicium pour la fonctionnalisation.

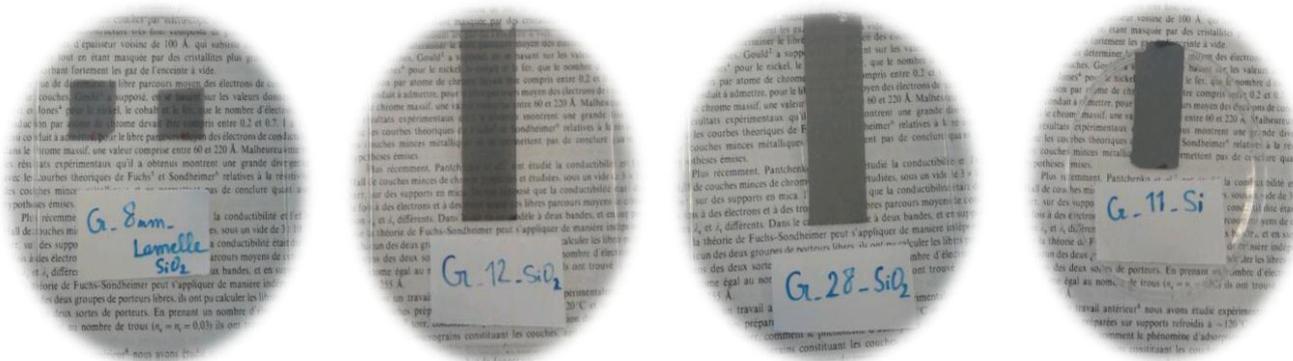


Figure 9 : Photographies des électrodes de chrome sur verre pour 8, 12 et 28nm d'épaisseur (transparentes) et sur silicium pour 11nm d'épaisseur (non transparent)

En contre partie, l'arrachage de chrome lors de l'application de champs électriques élevés pour la pré-fonctionnalisation a pu être observé à plusieurs reprises pour des couches évaporées à moins de 20nm sur verre. L'utilisation de la pulvérisation cathodique et de couches plus denses en chrome seront préférés pour l'adhésion du chrome. Il faut donc trouver un compromis entre finesse et transparence de la couche métallique déposée, conduction et tenue de celle-ci sous champ. L'adhésion du chrome sur le verre doit alors être améliorée pour résister au passage du courant. Rappelons que pour les dépôts de métaux nobles, tel que l'or, l'adhésion est insuffisante sous champ sans couche de pré-ancrage de chrome ou titane (~2nm), ce qui conduit à des couches très absorbantes pour les neutrons et de densité électronique très élevée pour les rayons X. D'autre part, l'analyse RX montre que les couches de chrome métallique sont denses au cœur des films, à la densité attendue, et l'XPS montre la présence d'oxyde de chrome (Cr_2O_3) en surface du film.

B. Fonctionnalisation des couches minces de chrome pour l'ancrage des membranes

Nous avons ensuite réalisé sur ces couches minces de chrome planes, la fonctionnalisation discutée au chapitre II pour harponner les membranes biomimétiques. Ces couches minces permettent surtout de coupler les techniques de greffage et d'analyse électrochimique (EIS faradique et non faradique, CV, ...), à des techniques d'analyse structurales (réflectivité des rayonnements, AFM, ...) et optiques (fluorescence et FRAP, SEEC, ...).

1. Pré-fonctionnalisation parabenzène de sulfonyle et sur-greffage des molécules commerciales Brij58 et PEO

a. Pré-fonctionnalisation parabenzène de sulfonyle par voltamérométrie cyclique

Pour fonctionnaliser la couche mince de chrome par électro-greffage des sels d'aryle diazonium, celle-ci est placée en solution dans un bécher, avec une petite plaque de platine en contre-électrode et une électrode de référence (mêmes conditions qu'au chapitre II), le tout connecté au potentiostat qui délivre le courant. La CV enregistrée lors de cette étape est présentée Figure 10. Le pic de réduction du sel d'aryldiazonium apparaît à un potentiel de $-0,23 \text{ V} / (\text{Ag}|\text{AgCl})$ décalé par rapport au pic de réduction observé sur l'électrode d'or et possède un courant de réduction de $-0,11 \text{ mA}$ beaucoup plus faible d'environ $0,3 \text{ mA}$ bien que la surface de l'électrode soit plus grande, du fait de sa rugosité plus faible (Electrode plane) que celle de l'électrode millimétrique d'or (polie manuellement à l'alumine calibrée) et de par sa conductivité moins grande.

Les électrodes sont ensuite rincées à l'eau et trempées dans la solution de dichlorométhane à 5 mM de PCl_5 pendant 3 min . Après cette étape de fonctionnalisation $\text{Cr-Ar-SO}_2\text{Cl}$, l'électrode est devenue très hydrophile, bien plus que la surface de chrome initiale.

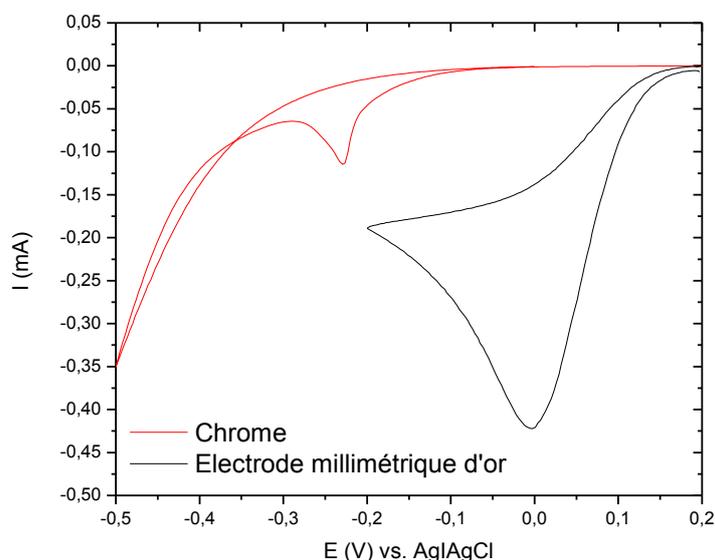


Figure 10 : Voltampérogrammes cycliques de la fonctionnalisation $\text{Cr-ArSO}_3\text{H}$ sur or et chrome.

b. Sur-greffage des molécules commerciales Brij58 (ancree-harpon) et PEO (coussin hydrophile)

Une fois pré-fonctionnalisée Cr-Ar-SO₂Cl les électrodes sont rincées au dichlorométhane et à l'acétone avant d'être mises au contact des molécules Brij58 et/ou PEO. Ce sur-greffage est effectué en milieu organique dans de l'acétonitrile, contrairement aux électrodes millimétriques d'or qui étaient fonctionnalisées dans des mélanges aqueux des molécules commerciales. La raison principale de ce choix est liée à la surface des électrodes. L'électrode d'or millimétrique et les quartz ont des surfaces de 0,07 et 0,2 cm² respectivement, tandis que les surfaces de chrome sont plus grande d'environ 2 cm². Les molécules d'eau étant susceptibles de réagir avec la fonction Ar-SO₂Cl par hydrolyse, nous cherchons à limiter cette compétition avec les molécules commerciales pour maximiser la fonctionnalisation et l'homogénéité de surface. L'effet du temps de contact des électrodes pré-fonctionnalisées avec les solutions organiques de Brij58 et PEO sur les propriétés électrochimiques des surfaces a été étudié et ne s'est pas révélé significatif au delà de plusieurs heures. De même le trempage immédiat ou stockage des surfaces fonctionnalisées sur quelques heures n'a pas montré de changement sur les mesures électrochimiques (Figure 11).

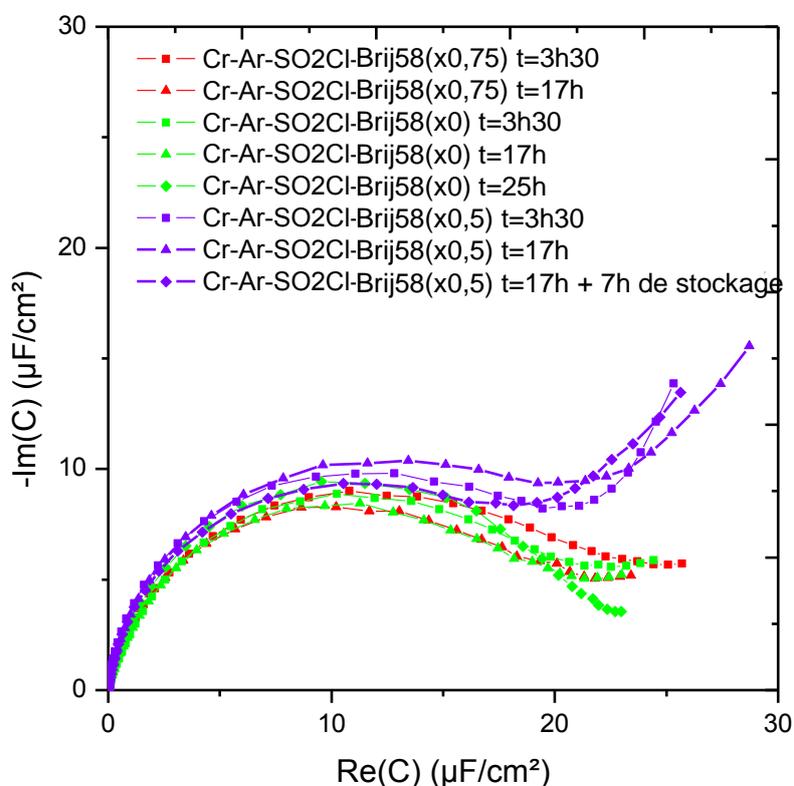


Figure 11 : Effet du temps de trempage et de stockage des lames de Cr fonctionnalisées sur les spectres EIS

Nous avons utilisé des surfaces fonctionnalisées dans la limite de sept heures de stockage avant dépôt de membrane (sauf pour les expériences de fluorescence montrée ultérieurement avec 35h de stockage à l'air ambiant). Les expériences réalisées par McGillivray et al. par EIS et angle de contact, montrent que leurs systèmes (molécule harpon : PEO-lipide WC14 et molécule de dilution β ME) se construisent sur la surface en quelques minutes, qu'une réorganisation mineure s'effectue dans les 4h qui suivent, puis qu'ils restent stables sur plusieurs jours (McGillivray, Valincius et al. 2007). La figure suivante montre clairement que le choix du mélange de molécules sur-greffées (Brij58 et/ou PEO) détermine principalement la forme du signal EIS (Figure 12).

2. Signature électrochimique de la fonctionnalisation des couches minces

Les différentes étapes de fonctionnalisation des électrodes sont étudiées par EIS non-faradique et faradique comme au chapitre II. Les spectres EIS des électrodes fonctionnalisées sont présentés Figure 12 et les paramètres d'ajustement des modèles de ces courbes sont résumés dans le Tableau 5.

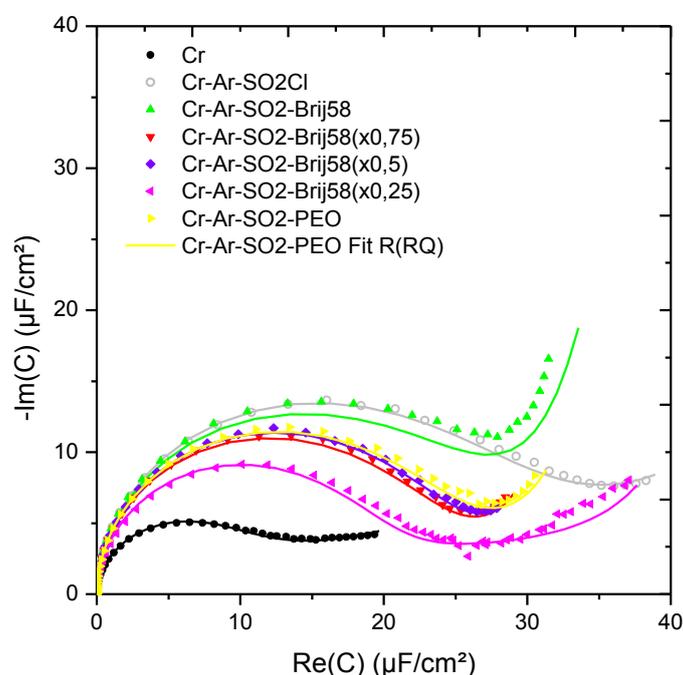


Figure 12 : Diagramme de Nyquist de la capacitance en mode non faradique des électrodes de chrome et fonctionnalisées Ar-SO₂Cl, Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0

*Ch. IV. Elaboration d'électrodes ultra-planes adaptées à l'étude
des membranes supportées*

Tableau 5 : Paramètres d'ajustement des spectres EIS des électrodes brutes, pré-fonctionnalisées et avec membrane (modèle $R_s(R_{ci}CPE_{dc})$)

Paramètres d'ajustement. <i>Paramètres déduits en italique</i> ($R_s(R_{ci}CPE_{dc})$)	Cr	Cr-Ar-SO ₃ H	Cr-Ar-SO ₂ Cl	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58 (75%)	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58 (50%)	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58 (25%)	Cr-Ar-SO ₂ -PEO ₉
Q ($\mu F s^{\alpha-1} cm^{-2}$)	18,99	35,43	37,93	33,46	28,56	27,89	26,59	30,67
<i>C</i> ($\mu F cm^{-2}$)	<i>9,42</i>	<i>24,82</i>	<i>25,86</i>	<i>24,41</i>	<i>21,52</i>	<i>22,33</i>	<i>12,6</i>	<i>22,35</i>
α	0,867	0,913	0,902	0,910	0,927	0,931	0,921	0,922
R_{ci} ($k\Omega cm^2$)	10 956	1 500	985,89	120,35	488,2	697,93	540	361,66
R_s (Ωcm^2)	547,73	672,96	776,43	1233,58	962,8	1788,35	849,76	773,45
<i>f_{c1}</i> (Hz) ; <i>τ_{c1}</i> (s)	<i>3,3 10⁻³; 472</i>	<i>2 10⁻³; 78</i>	<i>2,9 10⁻³; 55</i>	<i>0,034; 4,6 9 10⁻³; 17</i>	<i>2 10⁻³; 67</i>	<i>9 10⁻³; 18</i>	<i>10⁻²; 14</i>	
<i>f_{c2}</i> (Hz) ; <i>τ_{c2}</i> (s)	<i>30,8; 5 10⁻³</i>	<i>9,53; 0,017</i>	<i>7,9; 0,02</i>	<i>5,34; 0,03</i>	<i>7,7; 0,02</i>	<i>4; 0,04</i>	<i>9,8; 0,016</i>	<i>9,3; 0,017</i>
Ajustement rmse	0,4	0,46	0,36	1,2	0,43	0,26	1,74	0,52

Nous pouvons premièrement remarquer que sur film mince de chrome, la résistance de cellule, R_s , augmente de deux ordres de grandeur par rapport à celle obtenue sur le montage utilisant l'électrode millimétrique d'or. Ceci provient principalement d'effets liés à la conduction dans la couche mince et au changement de cellule, ce qui implique une limitation pour le suivi des phénomènes aux hautes fréquences puisque le régime résistif de cellule se décale à des fréquences plus basses (quand $f > f_{c2} = 1/(R_{ci}R_sQ/(R_{ci} + R_s))^{1/\alpha}2\pi$). L'allure de la courbe noire (Figure 12) pour le chrome nu ressemble à un système R_sCPE_{dc} en série. En effet, l'ajustement de la courbe avec un modèle $R_s(R_{ci}CPE_{dc})$ donne une valeur de R_{ci} très grande et le terme $1/R_{ci}$ est négligeable aux fréquences mesurées (Figure 13). On retrouve un comportement $R_s(R_{ci}CPE_{dc})$ à des fréquences plus basses que $f_{c1} = 1/(R_{ci}Q_{dc})^{1/\alpha}2\pi \sim 3 \cdot 10^{-3} Hz$. Nous observons donc surtout l'effet de la dispersion des valeurs locales de capacité de la double couche le long de la surface, ce qui implique la nécessité d'une pseudo-capacité (élément CPE avec $\alpha = 0,86$ ici). Etant donné la très bonne planéité de surface de l'électrode de chrome, cette distribution de capacités de surface trouve son origine principalement dans la présence d'oxyde de chrome (Cr_2O_3) en surface et donc d'états de conduction de surface différents. Ceci se

couple à une faible capacité de double couche ($C_{Cr,dc} = 9,42 \mu F cm^{-2}$, 2 fois plus faible que pour la microélectrode d'or).

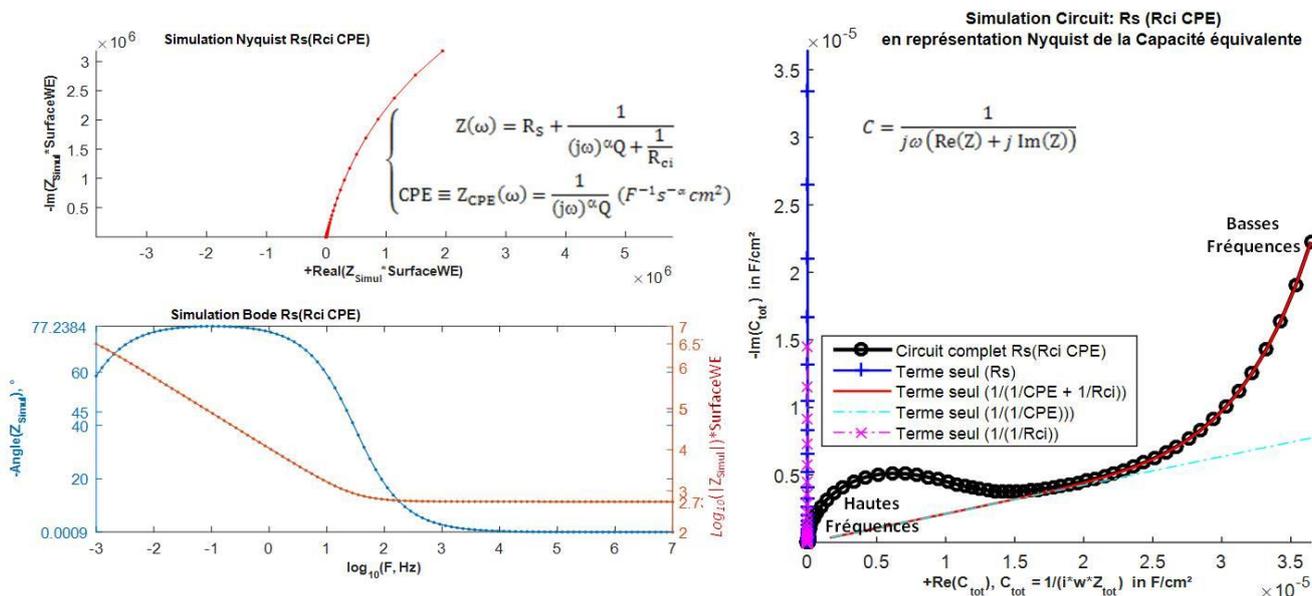


Figure 13 : Simulation sur une gamme de fréquences élargie (10^{-3} à 10^7 Hz) du spectre d'impédance mesuré sur chrome nu (courbe noire de la Figure 12), à gauche en représentations de Nyquist et de Bode de l'impédance et à droite en représentation Nyquist de la capacité équivalente, en montrant les courbes correspondant aux différentes contributions à la capacité complexe.

Lors du passage à la pré-fonctionnalisation, les spectres EIS des surfaces Cr-Ar-SO₃H et Cr-Ar-SO₂Cl donnent des courbes d'une allure semblable à un modèle RCPE également mais avec une augmentation de la capacité de double couche moyenne à l'interface ($C \sim 25 \mu F cm^{-2}$). La valeur de α augmente également ce qui indique qu'une homogénéisation de la surface a été apportée par la pré-fonctionnalisation. Ceci s'explique certainement par le greffage des sels d'aryle diazonium qui a eu lieu sur le chrome nu ainsi que sur l'oxyde de chrome (Hinge, Ceccato et al. 2009). Ces trois surfaces se caractérisent donc par une forte résistance R_{ci} en parallèle de la pseudo-capacité, c'est-à-dire à de très faibles courants de fuite et donc à une grande majorité d'ions qui participent à la capacité d'interface.

Pour les fonctionnalisations suivantes, sur-greffage des oligomères Brij58 et PEO₉-CH₃, l'allure générale des courbes rejoint un système $R_s(R_{ci}CPE)$ du fait des plus faibles valeurs de R_{ci} . Les molécules greffées vont induire un régime limité par diffusion des ions, visible aux basses fréquences avec une réduction de la dispersité des capacités d'interface (le paramètre α augmente au-delà de 0,91 ce qui atteste d'une meilleur homogénéité). La comparaison des deux surfaces distinctes Brij58 seul ($x=1$) et PEO₉-CH₃ seul ($x=0$), montre des capacités de double couche du même ordre de grandeur ($24,41$ et $22,35 \mu F cm^{-2}$) et

proches de celles mesurées sur électrode millimétrique d'or au chapitre II (21,04 et 20,5 $\mu\text{F cm}^{-2}$). Par contre la résistance aux déplacements ioniques R_{ci} est plus importante pour $\text{PEO}_9\text{-CH}_3$ (0,362 $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$) que pour Brij100% (0,120 $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$), nous trouvons des valeurs plus faibles sur l'or autour de 80 $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$.

Ceci peut s'expliquer certainement par un assemblage plus compact et homogène des chaînes $\text{PEO}_9\text{-CH}_3$ hydrophiles qui recouvrent la surface, alors qu'on peut supposer pour le Brij58 (100%), un assemblage moléculaire moins compact en raison des harpons hydrophobes de la molécule. Sur des SAMs 100% WC14, molécules composées de 6 monomères PEO greffés à deux chaînes alkyles en C_{14} , Mathias Lösche et al. ont observé un désordre significatif dans la couche par FT-IRRAS (« spectra in reflection-absorption Spectroscopy ») (McGillivray, Valincius et al. 2007). Aux plus forts taux de greffage de cette molécule ($x_{\text{W}14} > 0,7$), ils mesurent un effondrement de la pseudo-capacité et une augmentation de la résistance (Q de 9 à 0,9 $\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{(\alpha-1)}$ et R_{ci} de 0,5 à 20 $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$) puisque leur molécule forme alors une couche dense épaisse avec une constante diélectrique faible dans la zone des alkyles hydrophobes. Nous n'atteignons pas ce régime avec les greffages du Brij58, ce qui n'est de toute façon pas souhaitable pour la suite, et nous conservons une capacité d'interface haute ($Q \sim 30 \mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{(\alpha-1)}$) et une résistance faible ($R_{ci} \sim 120 \text{k}\Omega \text{ cm}^2$). On peut supposer que l'effondrement des alkyles sur la surface est responsable de cette forte capacité. La couche de Brij58 seul est celle qui offre le moins de résistance (faible R_{ci}) aux courants de fuite de la capacité en parallèle, soit le plus d'ions de la double couche qui traversent en quelque sorte le diélectrique qui sépare les armatures du condensateur d'interface. Cet effet de conductance diminue la quantité d'espèces accumulées aux "armatures" et provoque ici le passage d'un circuit $R_S \text{ CPE}_{dc}$ à $R_S (R_{ci} \text{ CPE}_{dc})$ avec l'apparition d'une tangente verticale aux basses fréquences dans la représentation Nyquist en capacités (partie droite de la courbe verte de la (Figure 12)). Une plus forte valeur de R_{ci} pour le PEO seul indique que les espèces ioniques participent en plus grande proportion à la formation de la double couche et s'accumulent aux armatures du condensateur formé avec la couche hydratée. La fonctionnalisation $\text{PEO}_9\text{-CH}_3$ est certainement plus dense, homogène et difficile à traverser pour les espèces chargées que celle obtenue avec du Brij58 seul.

Pour les fonctionnalisations obtenues par mélange Brij58/ $\text{PEO}_9\text{-CH}_3$, le PEO est utilisé pour réduire la densité d'ancre-harpons et remplir les zones non greffées par les Brij58 afin que la membrane ne se retrouve pas face à des zones de pré-fonctionnalisation. En ajoutant du $\text{PEO}_9\text{-CH}_3$ au Brij58, R_{ci} augmente ce qui témoigne de la densification de la couche greffée (moins de courants de fuite), en particulier pour les fractions 50-25% où le système tend vers un modèle capacitif de type $R_S \text{ CPE}_{dc}$. (grandes valeurs de R_{ci}). Autant nous n'avons pas de différences très marquées sur microélectrode d'or, autant sur les

surfaces de chrome de bien meilleure planéité nous voyons une nette évolution de la résistance d'interface avec la fonctionnalisation (Figure 14 et Figure 15).

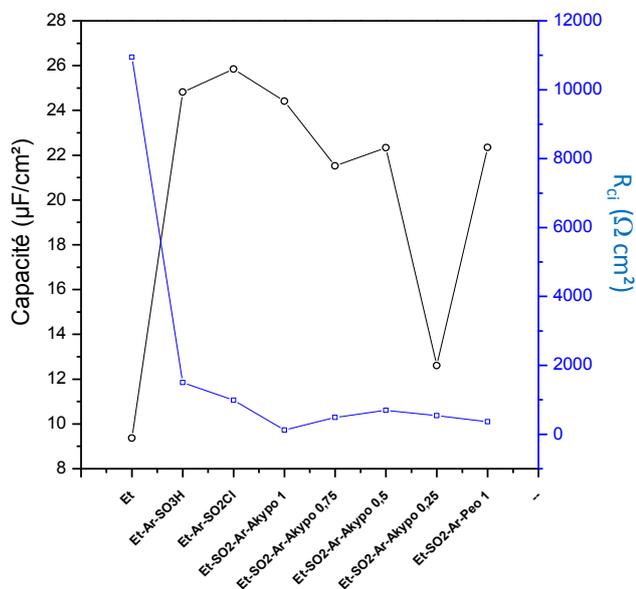


Figure 14 : Capacité et résistance extraites des ajustements des spectres EIS sur électrodes de chrome fonctionnalisées Ar-SO₂Cl, Ar-SO₂-Brij58 (xi) -PEO₉-CH₃ (1-xi) avec i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0

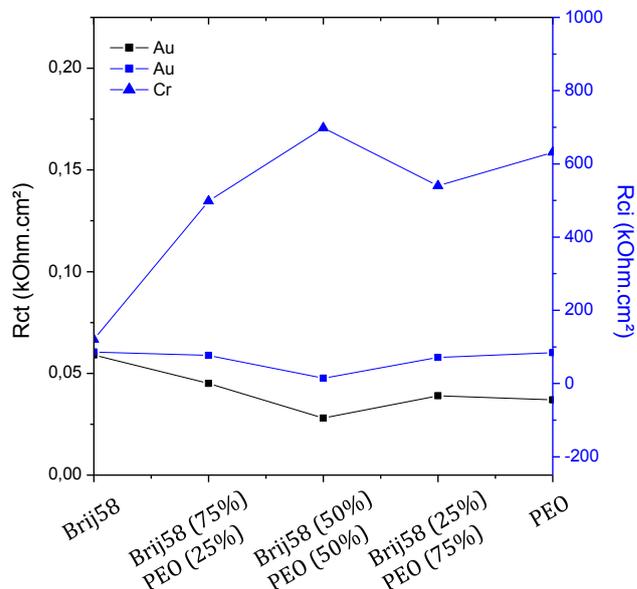


Figure 15 : Comparaison des résistances aux transferts ioniques R_{ci} du mode non faradique sur or et chrome fonctionnalisés et aux transferts de charges R_{ct} du mode faradique sur or fonctionnalisé

Afin de vérifier la bonne homogénéité de fonctionnalisation des électrodes, nous avons aussi mesuré par AFM l'épaisseur des couches organiques Ar-SO₂-Brij58 et Ar-SO₂-PEO₂₃ formées sur les couches minces de chrome et regardé les angles de contacts sur ces différentes surfaces. C'est ce que nous abordons dans les parties suivantes.

3. Homogénéité de la fonctionnalisation vérifié par AFM à l'air

Nous utilisons, à présent, l'AFM pour pouvoir visualiser l'organisation de la surface, une fois modifiée par le sur-greffage des tensio-actifs et pour mesurer l'épaisseur de la fonctionnalisation. La rugosité et l'épaisseur de la couche organique Ar-SO₂Cl sur chrome déposé sur silicium, a déjà été caractérisée antérieurement au laboratoire par la méthode dite de « rayure » (Anariba, DuVall et al. 2003; Leroux, Fei et al. 2010). L'épaisseur mesurée pour cette couche organique (0,8 nm) est relativement proche de la valeur théorique (0,7 nm) obtenue pour des groupements de types Ar-SO₂Cl, montrant que les conditions de modifications de surface par la réduction du sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique en milieu HCl 1M, en présence d'un équivalent de NaNO₂ et après application d'une solution de PCl₅ (5mM)/CH₂Cl₂, permet d'obtenir une pré-fonctionnalisation Ar-SO₂Cl de l'ordre de la mono-couche organique.

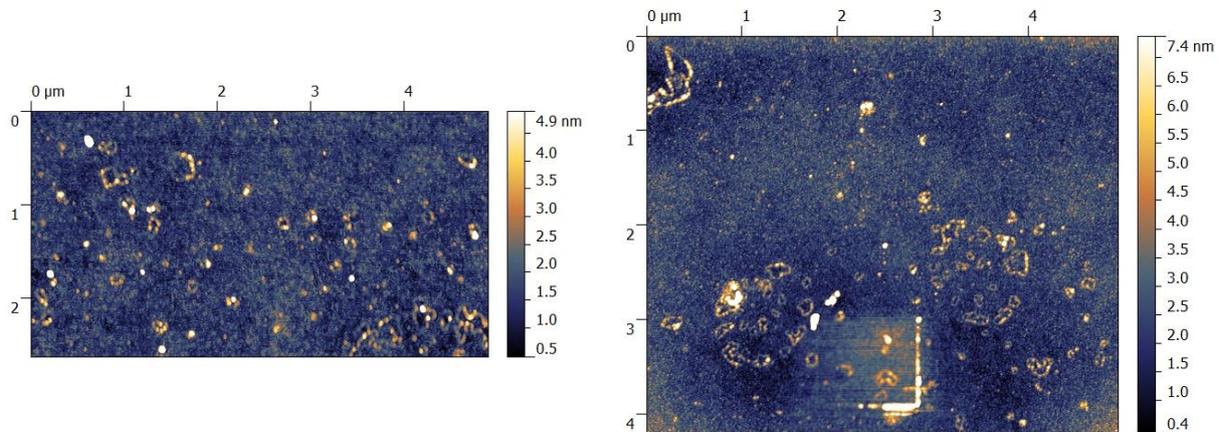


Figure 16 : Images topographiques AFM du chrome sur verre avant indentation (à gauche, RMS = 0,6nm) et après indentation (à droite) sur 500x500nm avec une force de 0,6μN, visible en bas de l'image.

La méthode de « rayure » par AFM consiste à appliquer en mode contact une force appropriée avec une pointe diamant sur la surface, de façon à traverser la couche de fonctionnalisation jusqu'à toucher la couche métallique sans l'endommager, puis à balayer seulement la couche de fonctionnalisation organique faisant apparaître le métal. La marche entre la fonctionnalisation de la zone non balayée et le métal dénudé sera mesurée pour déterminer l'épaisseur de la couche. Pour pouvoir mesurer la rugosité de la couche sur-greffée et son épaisseur, il est nécessaire de partir d'une surface possédant une très faible rugosité. Les surfaces de chrome déposés sur verre, que nous avons réalisées, possèdent une rugosité d'environ 0,6 nm. En commençant avec une surface de chrome nu, nous avons pu déterminer la force à appliquer avec la pointe AFM de façon à frôler le chrome sans l'endommager visiblement (Figure 16). Une force de 0,6 μN est déjà suffisante pour cela (dépend des pointes et conditions de balayage). Cette force en mode contact est ensuite appliquée à la pointe sur une zone de 500x500nm des surfaces fonctionnalisées. Le fait d'être en mode contact permet de labourer et arracher la couche organique présente sur le chrome. Cette zone est ensuite visualisée par AFM en mode non-contact par un balayage plus grand de 5x5μm. Nous avons utilisé cette technique sur les surfaces pré-fonctionnalisées avec sur-greffage des molécules Brij58 et PEO₂₃-OH.

Pour la surface fonctionnalisée Cr-Ar-SO₂-Brij58, la rugosité a augmenté par rapport à la surface de chrome nu, passant de 0,6nm à 1,1nm, nous indiquant qu'une couche supplémentaire est présente sur le chrome (Figure 17). Après l'indentation, nous pouvons voir la surface du chrome apparaître là où a été appliqué le mode contact, ce qui nous permet de déterminer une marche de hauteur entre la surface du chrome et celle de la couche organique déposée sur le reste de la surface. Pour estimer correctement cette marche, nous traçons le profil des hauteurs perpendiculairement à la marche de gauche et

l'ajustons par un profil abrupt. Nous trouvons alors une épaisseur de 1,8nm pour le Brij58 sur-greffé. Les amas de matière organique autour de l'indentation correspondent à la matière arrachée par la pointe AFM lors de son passage en mode contact. Pour la surface fonctionnalisée Cr-Ar-SO₂-PEO₂₃-OH la rugosité a elle aussi augmenté par rapport à la surface de chrome nu, passant à 1,2nm. Après l'indentation de la couche par la pointe diamant, la marche mesurée nous donne une épaisseur de 1,1nm (Figure 18).

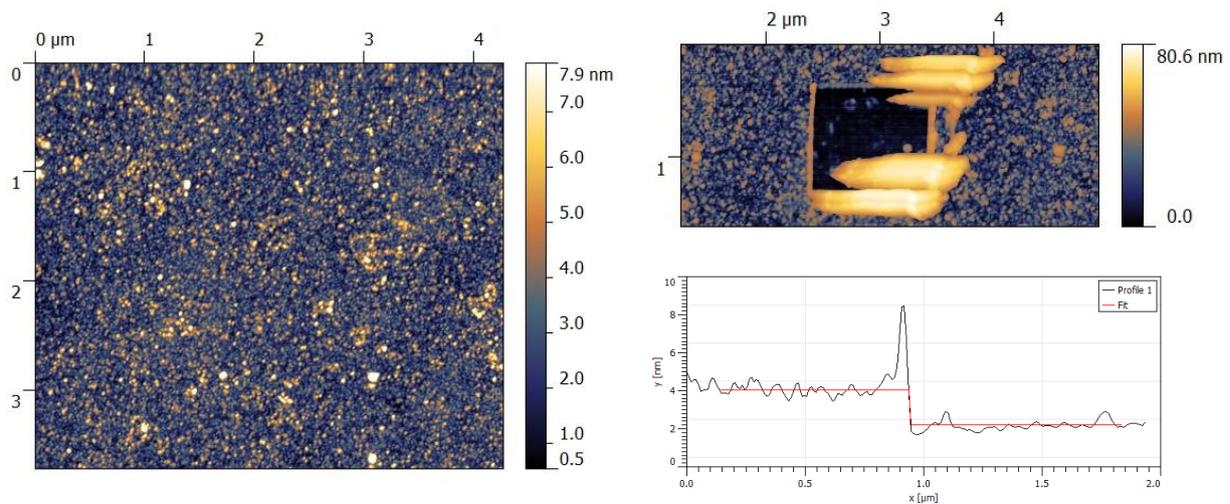


Figure 17 : Images topographiques AFM de la fonctionnalisation Cr-Ar-SO₂-Brij58 avant indentation (à gauche, RMS = 1,1nm) et après indentation (en haut à droite) sur 500x500nm avec une force de 0,6μN visualisé sur une zone à champ plus large. Représentation graphique du profil de marche en noir et de son ajustement moyen en rouge (en bas à droite)

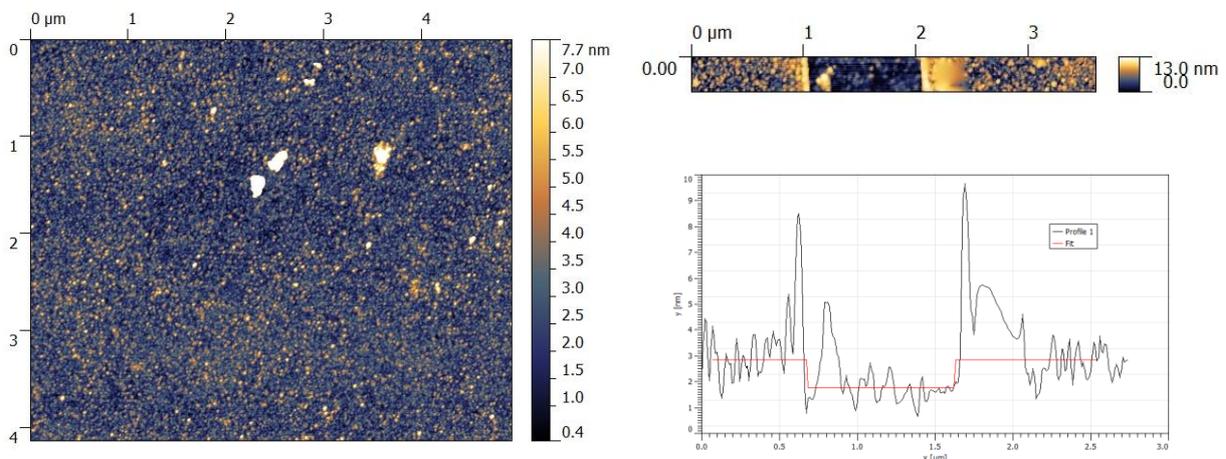


Figure 18 : Images topographiques de la fonctionnalisation Cr-Ar-SO₂-PEO₂₃ avant indentation (à gauche, RMS = 1,1nm) et après indentation (en haut à droite) sur 500x500nm avec une force de 0,6μN visualisé sur une zone à champ plus large. Représentation graphique du profil de marche en noir et de son ajustement en rouge (en bas à droite)

Ces hauteurs sont supérieures aux valeurs théoriques et expérimentales de l'épaisseur de la couche Ar-SO₂Cl mais sont inférieures aux valeurs théoriques qui peuvent être calculées pour des polymères denses sur une surface et s'organisant en brosses (2,7 nm pour le Brij58 et 1,1 nm pour le PEO₂₃ (Advincula, Brittain et al. 2004). Ceci nous permet de dire que les conditions de sur-greffage des oligomères PEO et Brij58 en milieu organique, permettent d'obtenir une couche organique très régulière et homogène sur la surface de la couche mince de chrome.

4. Caractérisation de la fonctionnalisation par réflectivité des rayons-X à l'air

Il est très difficile de mesurer le signal provenant d'une monocouche organique déposée sur un métal dense par réflectivité des rayons X, puisque celle-ci n'apporte qu'un faible épaulement dans le profil de densité électronique situé au pied de la marche qui mène d'une densité élevée (métal) à faible (couche organique). Pour ce faire, il faut absolument mesurer le substrat nu avant et après fonctionnalisation en veillant à conserver les mêmes réglages du réflectomètre et réaligner la surface dans le faisceau à l'identique. Nous avons utilisé la technique systématiquement et présentons l'exemple d'une fonctionnalisation PEO et Brij58 sur couche mince de chrome plus ou moins épaisse.

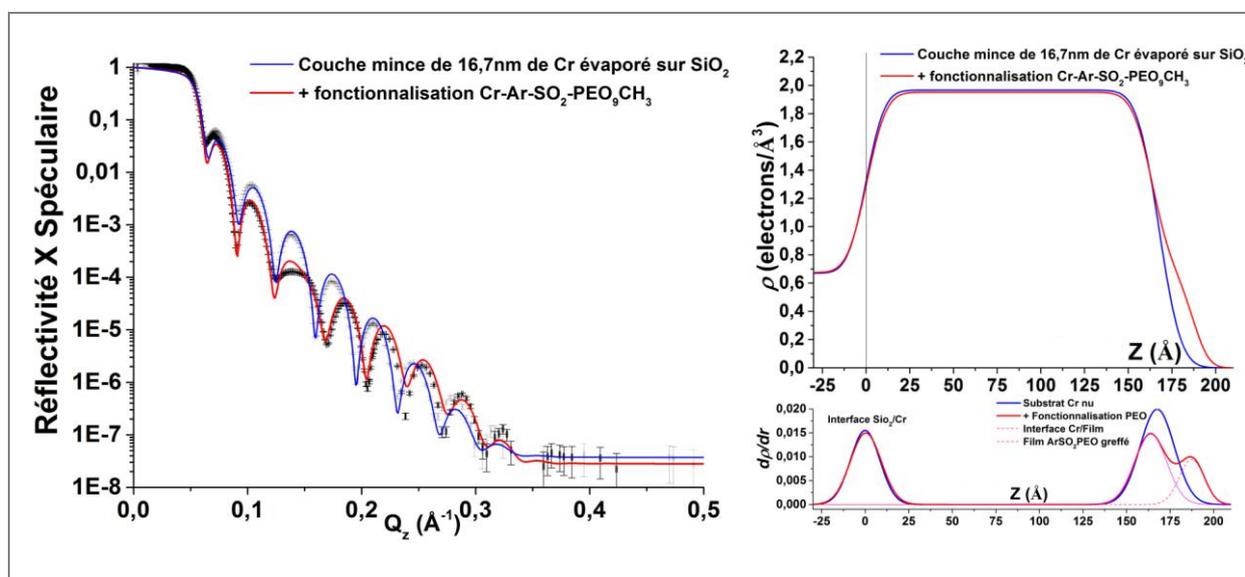


Figure 19 : A) Réflectivité spéculaire des rayons x d'une couche mince de chrome (fine) nue, ensuite recouverte d'une fonctionnalisation Ar-SO₂-PEO (x=0) ; B) Profils de densité électronique correspondants et première dérivée du profil en dessous

*Ch. IV. Elaboration d'électrodes ultra-planes adaptées à l'étude
des membranes supportées*

Tableau 6 : Paramètres d'ajustement des courbes de réflectivité x présentées ci-dessus et au sous-chapitre suivant (significations identiques à celles déjà introduites)

Echantillons: Couches minces	Substrat				1				2				3				
		Re(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	Im(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	σ , Å	d, Å	Re(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	Im(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	σ , Å	d, Å	Re(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	Im(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	σ , Å	d, Å	Re(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	Im(ρb), X10 ⁻⁶ Å ⁻²	σ , Å	
Chrome évaporé sur verre nu	Verre:	17,6 à 19	0,228		Cr:	55,9	5,73										
	-	18,9	0,228*	8,4	167,6	55,4	5,73*	9,9									
+ Fonctionnalisation PEO	Verre:	17,6 à 19	0,228		Cr:	55,9	5,73		Ar-:				PEO:				
	-	19	0,228*	8,9	166	54	5,73*	10	5	6,4	0,01	6,5	17,2	15	0,01	6,6	
Chrome évaporé sur verre nu	Verre:	17,6 à 19	0,228		Cr:	55,9	5,73										
	-	19	0,228*	9	255,5	54	5,73*	13,5									
+ Fonctionnalisation Brij58	Verre:	17,6 à 19	0,228		Cr:	55,9	5,73		Ar-SO ₂ Cl et Brij58 + eau								
	-	18,75	0,228*	10,8	251	53,5	5,73*	14,8	36,9	13,7	0,02*	4,3					
+ Contact vésicules DOPC	Verre:	17,6 à 19	0,228		Cr:	55,9	5,73		Ar-SO ₂ Cl PEO du + têtes + et Brij58 DOPC eau				Alkyle et DOPC Brij58 Chaînes				
	-	19	0,228*	12,9	252	53,5	5,73*	11,2	36,6	16,3	0,02*	3,7	22,9	6,0	0,02*	6,5	

Sur la couche la plus mince de chrome de 16,7 nm, fonctionnalisée PEO ensuite, nous obtenons de bons ajustements de la réflectivité x avec des profils assez simples atteignant les valeurs attendues pour le chrome et les rugosités constatées précédemment par évaporation. Les rugosités d'interfaces sont compatibles avec toutes nos autres déterminations mais il faut tenir compte du fait qu'elles sont sondées ici sur plusieurs mm² et intègrent aussi le lissage provenant de la présence d'oxydes de chrome. La mesure après fonctionnalisation montre très clairement l'ajout de l'épaisseur provenant de la monocouche greffée -Ar-SO₂- et -PEO₉-CH₃, avec une densité électronique compatible avec un greffage dense mais incluant certainement de l'eau gonflant la couche dans l'air ambiant. Pour la fonctionnalisation Brij58 (présentée plus loin Figure 30) sur une couche de chrome plus épaisse (25,5nm), nous perdons clairement en résolution au niveau de l'analyse des profils à l'interface et mesurons des rugosités légèrement plus fortes. La mesure reste compatible avec les épaisseurs mesurées précédemment par AFM. L'utilisation de couches très minces de chrome (15nm ou moins) est un atout indéniable quand il s'agit de résoudre la structure des monocouches greffées.

5. Evolution de l'angle de contact entre les différentes étapes de la fonctionnalisation

Dans cette partie nous comparons les angles de contact (θ) mesurés avec de l'eau dans l'air, obtenus sur les différentes surfaces, pré-fonctionnalisées sans oligomères et avec oligomères sur-greffés, qui ont été rincées au dichlorométhane, à l'acétone et séchées avant cette mesure. Ces substrats offrent une surface d'au moins 2,25 cm² qui permet de déposer plusieurs gouttes d'un microlitre d'eau milli-Q. Elles sont visualisées une à une sur en éclairage et agrandissement télé-centrique avec une caméra numérique et mesurées avec une précision de l'ordre de 0,1° à l'aide d'un logiciel d'analyse dédié (Krüss TM). Les

résultats moyennés sont présentés sur la Figure 20. L'incertitude obtenue résulte de la mesure de 4 à 5 gouttes par surface sur des zones séparées de plusieurs millimètres.

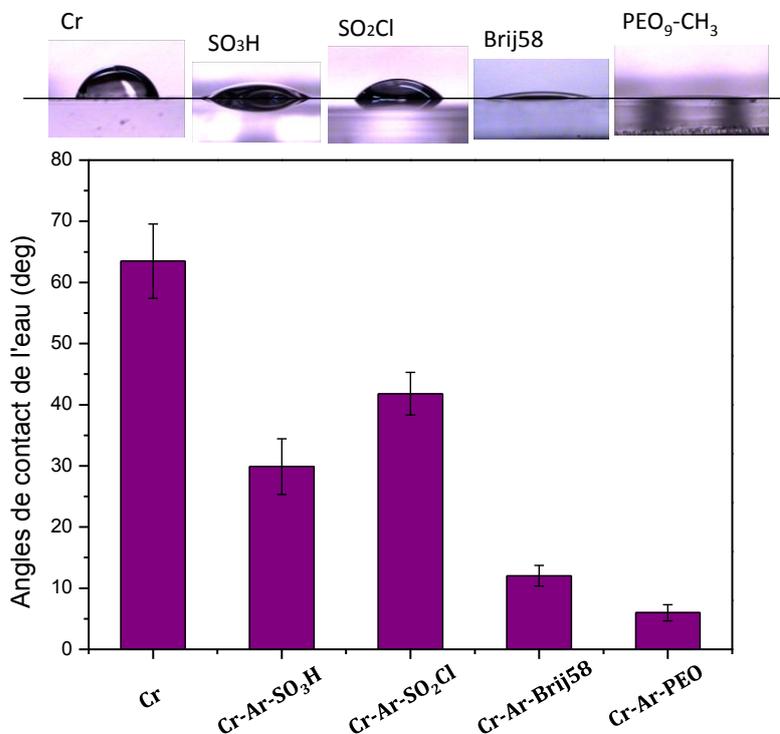


Figure 20 : Angles de contact sur lames de chrome fonctionnalisées avec et sans tensio-actifs

La surface de chrome nu après nettoyage présente un angle de contact d'environ $\theta_{Cr} > 60^\circ$, il s'agit de la surface la plus hydrophobe. Après électro-réduction des sels d'aryldiazonium, la surface devient plus hydrophile $\theta_{Ar-SO_3H} \sim 30^\circ$. Une fois la fonction d'ancrage pour $-OH$ activée par la solution CH_2Cl_2/PCl_5 , elle redevient un peu plus hydrophobe $\theta_{Ar-SO_2Cl} \sim 43^\circ$ (ce qui confirme bien une modification de la nature de l'interface au contact de l'eau). Lorsque les molécules hydrophiles et amphiphiles sont sur-greffées, en trempant les électrodes de chrome 20h dans les solutions de PEO_9-CH_3 et Brij58, la surface devient bien hydrophile avec $\theta_{Brij58} \sim 12^\circ > \theta_{PEO_9-CH_3} \sim 6^\circ$. La molécule de Brij58 présentant 20 segments PEO, mais aussi une chaîne alkyl en C_{16} (harpon pour la membrane), conduit à une surface plus hydrophile que pour la petite molécule de PEO_9-CH_3 avec un seul méthyle hydrophobe utilisée pour cet exemple.

Ces expériences de suivi d'angle de contact sont très reproductibles et simples pour mettre en évidence la fonctionnalisation des électrodes de chrome et l'obtention de surface fonctionnalisées très hydrophiles. Un second type de comportement a également été observé quelques fois et a permis de mettre en évidence l'effet de l'oxydation du chrome en surface sur la fonctionnalisation ultérieure (Figure 21). En effet, nous avons

constaté qu'en partant d'une électrode nue, moyennement hydrophobe ($<50^\circ$), présentant certainement plus d'oxyde à sa surface que les précédentes, les angles de contact après fonctionnalisation sont bien moins hydrophiles. Nous pensons qu'une oxydation plus importante de la couche mince de chrome, réduit tout de même l'efficacité de la fonctionnalisation réalisée par la suite et donc la densité de molécules organiques sur-greffées, même si chrome et oxydes de chrome de surface sont conducteurs et fonctionnalisables.

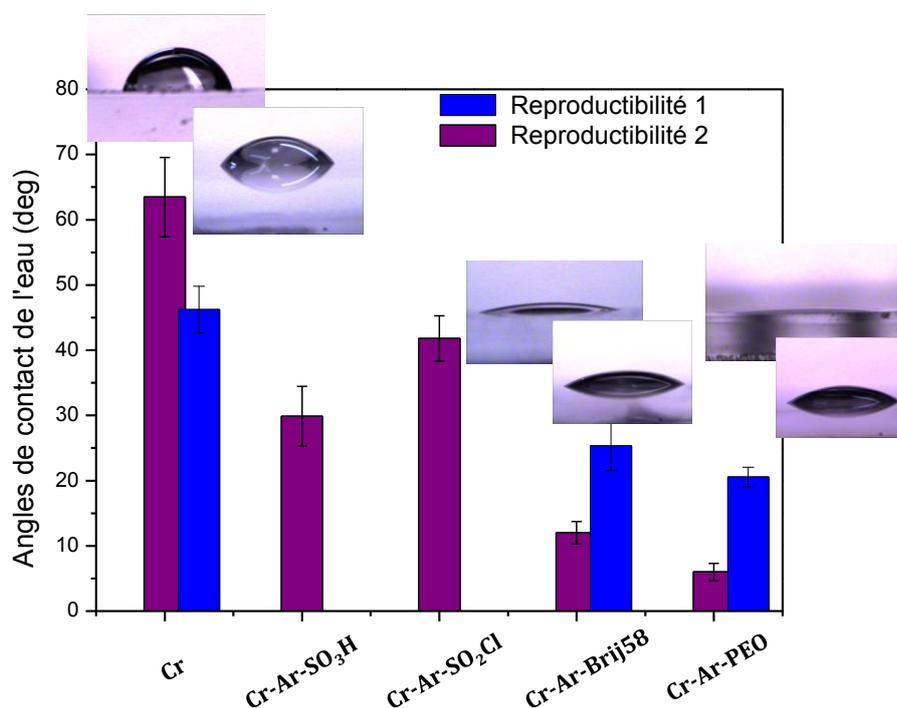


Figure 21 : Effet d'oxydation sur les angles de contact sur lames de chrome fonctionnalisées avec et sans tensio-actifs

6. Conclusions sur la fonctionnalisation des couches minces chrome

Les mesures EIS ont révélé une importante distribution de capacité sur la surface de chrome nu pourtant très plan. Ceci est donc principalement attribué à la présence d'oxyde de chrome (Cr_2O_3) et donc d'états de conduction de surface variables (vue en XPS et RX). Lors du passage à la pré-fonctionnalisation du chrome, l'effet de cette distribution de capacités vu sur le chrome nu s'amointrit. Nous pouvons en conclure que le greffage des aryles fonctionne aussi sur les oxydes de chrome. La formation rapide d'oxydes de chrome sur les électrodes exposées à l'air n'est pas un frein à l'élaboration d'un système de membrane supportée sur une fonctionnalisation ancre-harpon, mais elle peut réduire l'efficacité de la fonctionnalisation, puisqu'elle conduit moins, et donc diminuer la densité

de molécules organiques sur-greffées. Les surfaces ensuite fonctionnalisées par différentes fractions Brij58/PEO montrent de véritables différences de comportement au travers d'une nette évolution de la résistance d'interface (seules des mesures EIS en mode non faradique ont été menées dans ce chapitre), ce qui se doit notamment à la très bonne planéité du chrome (peu visible avec l'électrode d'or millimétrique). La transformation du chrome modifié Cr-Ar-SO₂Cl en Cr-Ar-SO₂-Brij58 et Cr-Ar-SO₂-PEO₂₃-OH, est aussi mise en évidence par AFM et RX, qui montrent des épaisseurs de couche organiques différentes et proches des valeurs attendues (2,7 et 1,1 nm). L'évolution du mouillage et des angles de contact avec l'eau entre ces surfaces est aussi forte et un moyen facile de suivre les différentes étapes de préparation.

C. Formation d'une membrane harponnée sur les électrodes de chrome plan fonctionnalisées

Les électrodes planes de chrome sur lamelle de verre et fonctionnalisées sont ensuite montées sur la cellule fluide en téflon avec un joint (bio tape TM) inerte qui assure son étanchéité. Un quartz recouvert d'or fait office de contre-électrode. La cellule est remplie de solution NaCl à 0,15 mol/L par l'intermédiaire de tubes inertes (1/16") pour la microfluidique à l'aide d'une seringue. Les solutions de vésicules (SUVs) de DOPC à 1mg/mL sont ensuite injectées. Les spectres EIS sont enregistrés juste après injection des vésicules (t=0) et sur plusieurs heures après l'injection. En fin d'expérience, une solution NaCl de rinçage est injectée avant de décoller l'électrode. Celle-ci est ensuite rincée abondamment à l'eau milli-Q. Des mesures d'angle de contact et d'AFM à l'air s'ensuivent afin d'identifier le plus simplement possible la présence de membrane restée, même si celle-ci se dénature et se réorganise au passage de l'interface solide/eau à solide/air. Nous commençons par présenter l'analyse électrochimique en immersion.

1. Signature électrochimique des membranes sur chrome fonctionnalisés

Les spectres EIS des électrodes pré-fonctionnalisées Ar-SO₂Cl, Ar-SO₂-Brij58, Ar-SO₂-PEO₉-CH₃ et de leurs mélanges sont rappelés Figure 12 (en haut à gauche) et mis au regard des spectres de ces mêmes surfaces après contact avec la solution de SUVs en fonction du temps. Les paramètres d'ajustement des modèles de ces courbes sont résumés dans le Tableau 7.

L'allure des mesures EIS dans l'eau salée seule, ont été discutés dans la section précédente. Une fois exposées aux vésicules de DOPC, nous pouvons distinguer deux comportements bien distincts au cours du temps pour ces différentes fonctionnalisations (Figure 22). Le premier est celui des surfaces de PEO pur ($\text{PEO}_9\text{-CH}_3$) ($x = 0$; en jaune) ou de PEO avec peu de Brij58 ajouté en solution à la fonctionnalisation ($x=0,25$; en rose). Ces courbes n'évoluent que peu au cours des 4 heures d'exposition aux vésicules et les courbes après rinçage ressemblent à celles avant contact. Elles se caractérisent par un comportement $R_s(R_{ci}CPE)$ très proche d'un comportement R_sCPE , en raison notamment d'une valeur R_{ci} élevée, soit d'un régime assez capacitif (α élevé de plus) avec peu de courants de fuite résistifs à la capacité (Tableau 7 et Figure 23).

La surface suivante en proportion de Brij58 ajouté ($x=0.5$; en mauve), montre ce comportement dans un premier temps (dans l'eau salée et au contact t_0) mais va plutôt suivre ensuite (après t_4h) la seconde tendance qui est celle des fonctionnalisations avec plus de Brij58 (à 75% en rouge et à 100% de Brij58 en vert). Celles-ci évoluent au cours du temps vers un comportement $R_s(R_{ci}CPE)$ marqué et avec R_{ci} qui chute d'environ un ordre de grandeur en présence de membrane, montrant l'apparition d'une tangente quasi-verticale aux basses fréquences qui s'accroît après rinçage (Figure 22). Le chrome activé par la fine couche de pré-fonctionnalisation $-\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$, suit ce comportement, mais dans une bien moindre mesure, et ne protège pas la surface de l'adsorption de membrane. Par contre cette surface montre peu d'évolution avant et après rinçage, ce qui n'est pas le cas des surfaces qui suivent le second comportement. Seul la surface de PEO et de PEO avec 25% de Brij58 n'évoluent quasiment pas, y compris au rinçage.

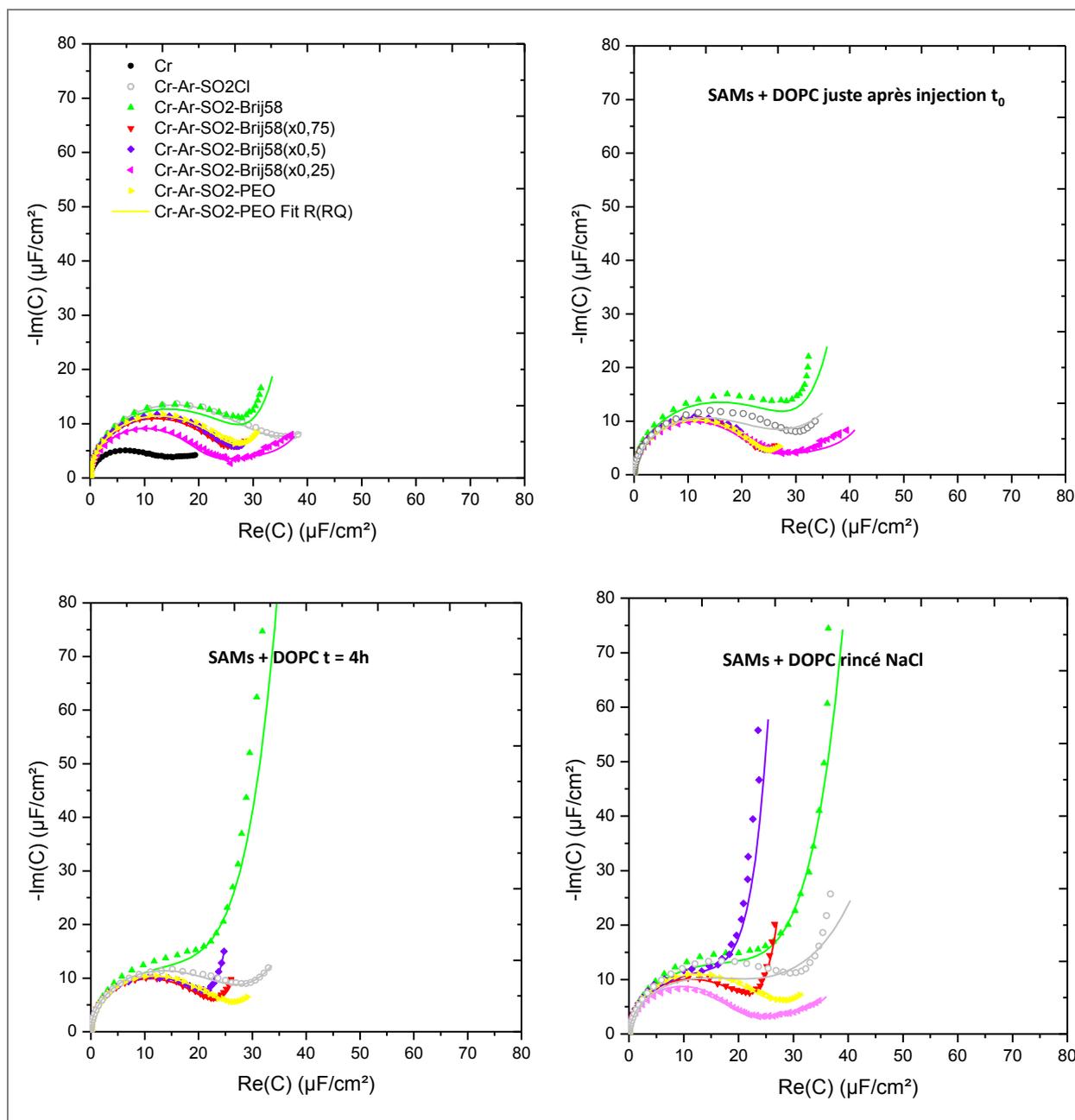


Figure 22 : Diagrammes de Nyquist de la capacitance d'une électrode de chrome brut, fonctionnalisée Ar-SO₂Cl, Ar-SO₂-Brij58 (xi) - PEO₉-CH₃ (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0$ avant et après contact avec une solution de SUVs de DOPC à 1mg/mL (à t_0 , $t_4\text{h}$ et après rinçage)

*Ch. IV. Elaboration d'électrodes ultra-planes adaptées à l'étude
des membranes supportées*

Tableau 7 : Paramètres d'ajustement des spectres EIS des électrodes brutes, pré-fonctionnalisées et avec membrane (ajustements avec le modèle $R_s(R_{ci}CPE_{dc})$), mesurés de 0,1Hz à 2 10⁵Hz.

Surfaces	Paramètres d'ajustement. (paramètres déduits en italique) ($R_s(R_{ci}CPE_{dc})$)	Cr-Ar-SO ₂ Cl	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58 (100%)	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58 (75%)	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58 (50%)	Cr-Ar-SO ₂ -Brij58 (25%)	Cr-Ar-SO ₂ -PEO ₉ (0%)
Cr-SAM	Q ($\mu F s^{\alpha-1} cm^{-2}$)	37,932	33,46	28,56	27,89	26,59	30,67
	<i>C</i> ($\mu F cm^{-2}$)	<i>25,86</i>	<i>24,41</i>	<i>21,52</i>	<i>22,33</i>	<i>12,6</i>	<i>22,35</i>
	α	0,902	0,910	0,927	0,931	0,921	0,922
	R_{ci} (k Ωcm^2)	985,89	120,351	488,205	697,927	536,897	361,664
	R_s (Ωcm^2)	776,43	1233,58	962,8	1788,35	849,76	773,45
	f_{c1} et f_{c2} (Hz)	2,9 10 ⁻³ ; 7,9	0,034; 5,34	9 10 ⁻³ ; 7,7	2 10 ⁻³ ; 4	9 10 ⁻³ ; 18	10 ⁻² ; 14
	Ajustement rmse	0,363	1,202	0,429	0,262	1,7414	0,516
Cr-SAM-DOPC, t0	Q ($\mu F s^{\alpha-1} cm^{-2}$)	33,97	35,61	25,87	25,31	29,78	26,73
	<i>C</i> ($\mu F cm^{-2}$)	<i>19,53</i>	<i>26,22</i>	<i>20,53</i>	<i>21,15</i>	<i>14,10</i>	<i>20,06</i>
	α	0,868	0,908	0,938	0,943	0,920	0,928
	R_{ci} (k Ωcm^2)	451,946	83,598	670,788	890,226	498,206	814,579
	R_s (Ωcm^2)	771,83	1367,58	1173,29	2019,07	524,92	922,88
	f_{c1} et f_{c2} (Hz)	6,8 10 ⁻³ ;10,6	4,8 10 ⁻² ;4,5	7,6 10 ⁻³ ;6,6	5,8 10 ⁻³ ;3,7	8,5 10 ⁻³ ;14,6	5,7 10 ⁻³ ;8,6
	Ajustement rmse	1,947	1,362	0,267	0,204	2,158	0,361
Cr-SAM-DOPC, t4h	Q ($\mu F s^{\alpha-1} cm^{-2}$)	32,91	40,30	26,09	25,56		28,71
	<i>C</i> ($\mu F cm^{-2}$)	<i>21,36</i>	<i>18,64</i>	<i>19,39</i>	<i>20,09</i>		<i>20,17</i>
	α	0,884	0,814	0,923	0,925		0,913
	R_{ci} (k Ωcm^2)	293,914	8,730	125,171	88,136		721,904
	R_s (Ωcm^2)	1127,42	880,6	1093,05	2008,17		854,67
	f_{c1} et f_{c2} (Hz)	1,2 10 ⁻² ; 6,6	0,57; 10,8	0,04 ; 7,6	0,066 ; 4,04		5,7 10 ⁻³ ; 9,2
	Ajustement rmse	0,459	0,900	0,270	0,212		0,294

*Ch. IV. Elaboration d'électrodes ultra-planes adaptées à l'étude
des membranes supportées*

Cr-SAM-DOPC, rincé	Q ($\mu\text{F s}^{\alpha-1}\text{cm}^{-2}$)	39,29	40,11	26,89	28,35	49,96	30,91
	C ($\mu\text{F cm}^{-2}$)	17,61	22,05	19,52	19,13	23,83	21,19
	α	0,833	0,855	0,919	0,880	0,923	0,908
	R_{ci} ($\text{k}\Omega \text{cm}^{-2}$)	120,682	23,919	95,601	28,589	70,408	64,845
	R_s (Ωcm^{-2})	464,5	731,02	981,6	1973,5	745,25	778,04
	f_{c1} et f_{c2} (Hz)	0,025; 19,5	0,17 ; 10,2	0,057 ; 8,4	0,2 ; 4,55	0,041 ; 5,69	0,074; 9,8
	Ajustement rmse	2,358	0,748	0,286	0,765	1,328	0,381

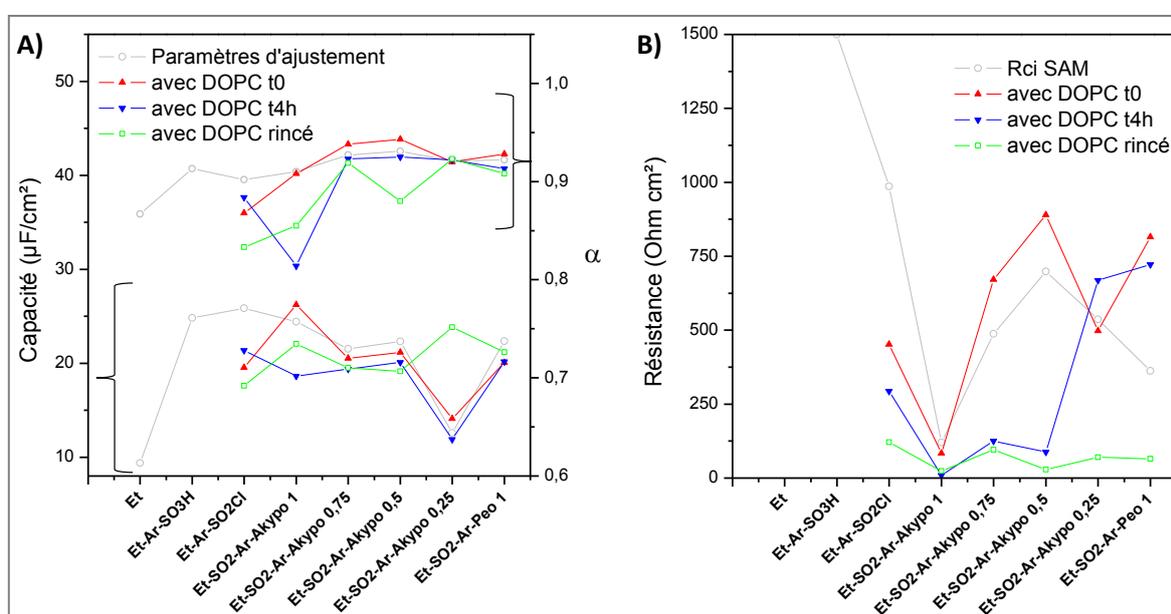


Figure 23 : Paramètre d'ajustement A) la capacité et α , B) la résistance aux transferts ioniques, extraits des spectres EIS sur électrodes de chrome fonctionnalisées Ar-SO2Cl, Ar-SO2-Brij58 (xi) -PEO9-CH3 (1-xi) avec $i = 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0$ ayant été en contact avec des vésicules

Le comportement constaté en présence de Brij58 (courbes verte, rouge et mauve) s'apparente aux simulations des courbes EIS réalisées par Valincius et al. (Valincius, Meškauskas et al. 2011) qui tient compte d'une certaine densité de pores ou défauts dans la membrane partiellement supportée. La diminution de R_{ci} , la montée aux basses fréquences de la partie imaginaire de la capacitance et le fait que les cercles des pseudo-capacités ne rejoignent pas l'axe, proviennent dans leur modèle d'une augmentation de la densité de pores dans la membrane ou/et de l'augmentation de leur taille qui réduit leur résistivité au passage des ions (Figure 23). Nous pouvons comprendre que les zones de la surface couvertes par de la membrane plane vont être les plus épaisses et constituées de diélectriques faibles ce qui constitue une faible capacité alors que les zones non couvertes

(défauts, zones avec la fonctionnalisation nue) sont peu épaisses et de constantes diélectriques élevées (proches de l'eau) avec des ions qui viennent plus près du métal former une forte capacité. A cela s'ajoutent les courants ioniques le long de la surface entre la membrane et le métal et qui prennent place uniquement en présence de défauts. Ce sont ces derniers qui expliquent en partie la forme des courbes simulées par Valincius (Figure 23) et nos plus fortes capacités d'interface nous empêchent de visualiser le second cercle de grand rayon qui se forme aux basses fréquences pour leurs calculs, mais nous mesurons bien son début en présence de Brij58.

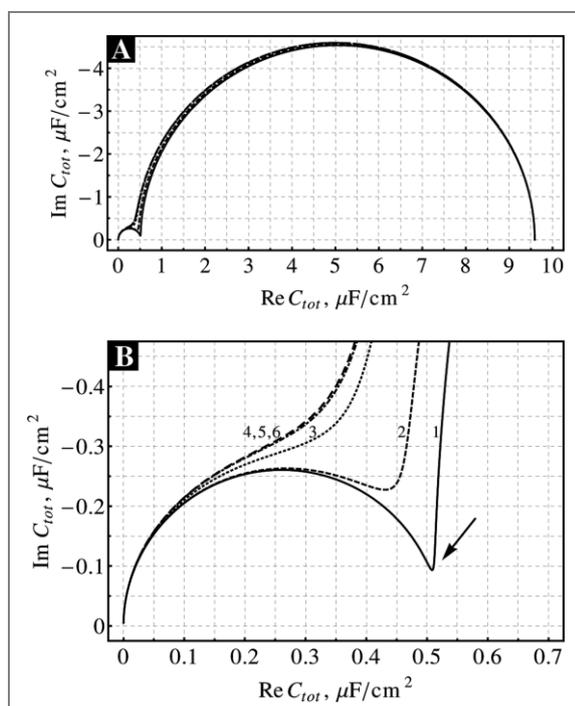


Figure 24 : Diagramme de Nyquist de la capacitance modélisant une membrane harponnée présentant des canaux ioniques de rayon 1 nm et de densité $30 \mu\text{m}^{-2}$ (A) spectre complet de 10^{-4} à 10^6 Hz, (B) grossissement sur la partie haute fréquences) (Valincius, Meškauskas et al. 2011). La flèche indique un minima qui se déplace vers le coin en haut à gauche alors que leur résistance diminue (de $10^{11}\Omega$ à $10^8\Omega$). Un effet similaire se produit si leur densité augmente (ici de $30\mu\text{m}^{-2}$).

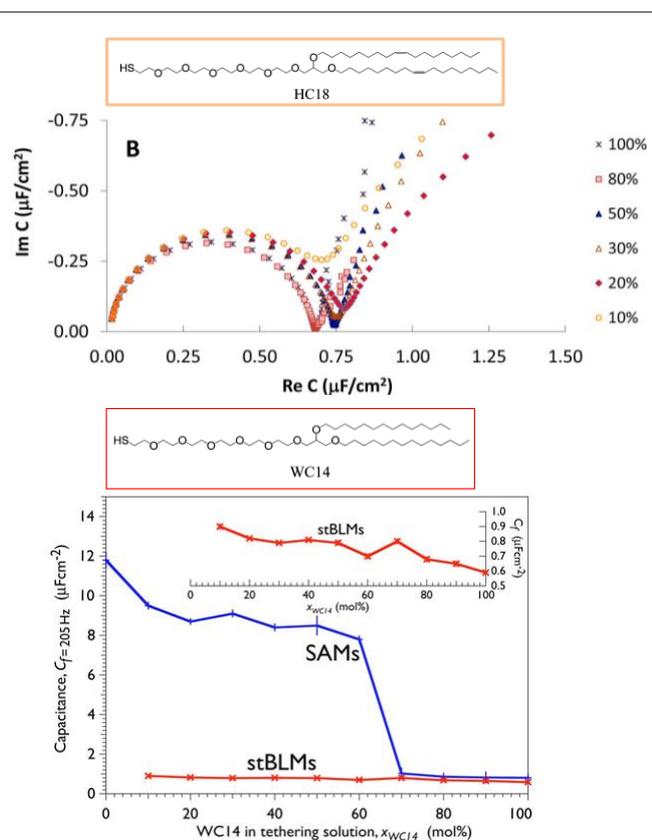


Figure 25 : En haut) Diagramme de Nyquist de la capacitance pour des membranes de DOPC harponnées par HC18/ β ME (en haut à droite). En Bas) Valeurs des capacités de la SAM WC14 avec et sans membranes de DPhyPC en fonction de la fraction de WC14 mélangée à la β ME pour la fonctionnalisation de l'or (McGillivray, Valincius et al. 2007; Budvytyte, Valincius et al. 2013)

Une autre similitude avec le système étudié par McGillivray et al. (McGillivray, Valincius et al. 2007), déjà discuté précédemment, concerne leurs résultats quand ils mettent en contact de la membrane de DPhyPC sur les fractions de molécule ancre-harpon WC14 ($\text{Au-S-PEO}_6\text{-(-O-C}_{14}\text{H}_{29})_2$) supérieures à 70% à la fonctionnalisation. Dans ce cas la valeur de la

capacité d'interface déjà faible initialement, varie peu après l'apport de membrane supportée (Figure 24, de 0,6 à 0,9 $\mu\text{F cm}^{-2} \text{s}^{\alpha-1}$). Ce comportement s'applique dans notre cas mais pour des capacités globalement plus fortes d'un ordre de grandeur pour notre système sur chrome. En accord avec tous les autres résultats, on peut estimer que nos fonctionnalisations de Brij58 ne constituent pas une monocouche dense de molécules ancre-harpon mais des molécules greffées plus éparses, comme c'est le cas pour le WC14 en dessous de 30%. Des chaînes alkyles recroquevillées sur la surface expliqueraient les fortes capacités mesurées, leurs distributions et le peu d'évolution de la capacité d'interface quand une membrane se forme et contient une certaine densité de pores.

Une fois les surfaces de chrome fonctionnalisées mises au contact des SUVs pendant plusieurs heures et rincées à la solution de NaCl, celles-ci sont décollées proprement de la cellule en téflon fabriquée pour l'EIS, puis abondamment rincée à l'eau. Les expériences d'angle de contact et d'AFM réalisées alors sont présentées dans la partie suivante.

2. Evolution des angles de contact et de la topographie AFM

De manière générale, la surface de chrome nu présente un angle compris entre 45° et 65°, en fonction de la croissance d'oxydes de chrome en surface. Elle devient plus hydrophile après électro-réduction des sels d'aryldiazonium, activation de la fonction d'ancrage pour -OH et sur-greffage des molécules amphiphiles ($\theta < 25^\circ$) ou hydrophiles ($\theta_{\text{PEO}} < 6^\circ$). Une fois les surface fonctionnalisées exposées à la solution de SUVs et rincées, l'angle de contact augmente drastiquement ($\theta_{\text{Brij58}(xi)} < 25^\circ$ passe à $\theta_{\text{DOPC,Brij58}(xi)} > 60^\circ$) pour les surfaces fonctionnalisées Cr-Ar-SO₂-Brij58(xi) pour x=1 et x=0,5 (Figure 25), qui deviennent plus hydrophobe que le chrome nu. Cet effet est attribué à la présence de membrane qui se réarrange hors de l'eau pour exposer ses chaînes à l'air. Pour les surfaces Cr-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃ la surface devient aussi légèrement plus hydrophobe après contact avec la membrane ($\theta_{\text{DOPC,PEO}} = 33,8^\circ$) mais bien moins qu'avec le Brij58. Ainsi, le suivi de l'angle de contact avant et après exposition aux vésicules, montre que les surfaces fonctionnalisées immobilisent bien de la membrane. Le PEO₉-CH₃ en immobilise en bien plus faible quantité et ne remplit donc pas complètement son rôle anti-adhérent pour la membrane.

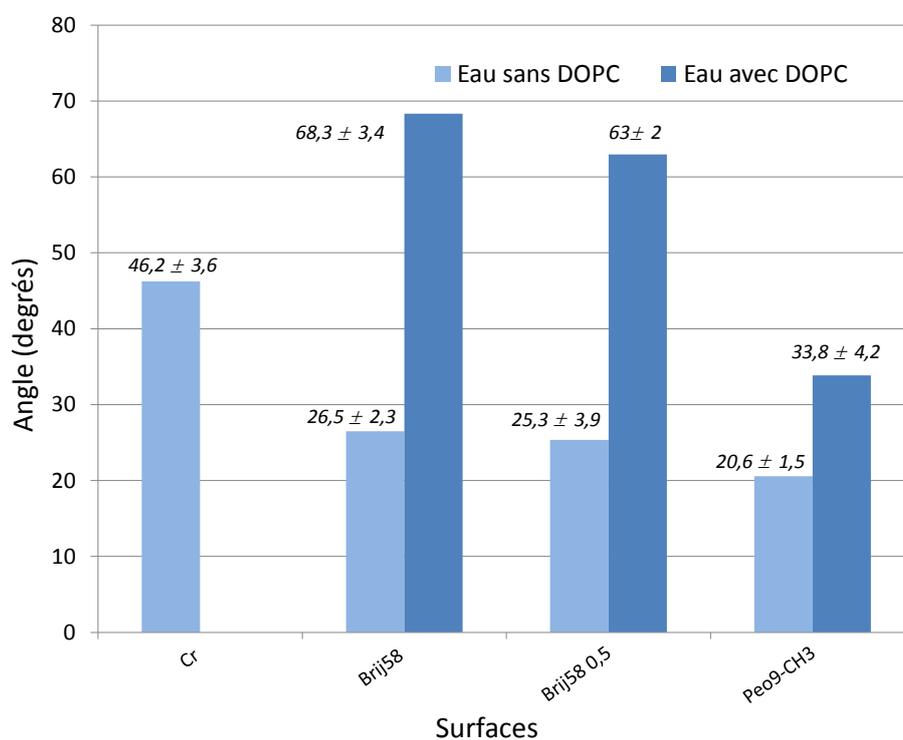


Figure 26 : Angles de contact sur lames de chrome fonctionnalisées et avec membrane

Les images AFM confirment également la présence de membrane restructurée après séchage. Les Figure 27 et Figure 28 présente la topographie des surfaces présentant la molécules Brij58 seule où à 50% avec du PEO dans la solution de fonctionnalisation. Les profils de hauteur montrent que le fond moyen de l'image (par rapport au plan le plus bas) se situe entre 3 et 4 nm avec des marches de +4nm et +8nm au-dessus et présente des figures compatibles avec le démoillage/reconstruction des feuillettes de DOPC au séchage (empilement tri-feuillettes avec la première tête vers le bas et imbriquée avec les Brij58, (Mohamad, Noel et al. 2012). Au dessus coexistent des zones éparses avec une bicouche inverse additionnelle formée au démoillage.

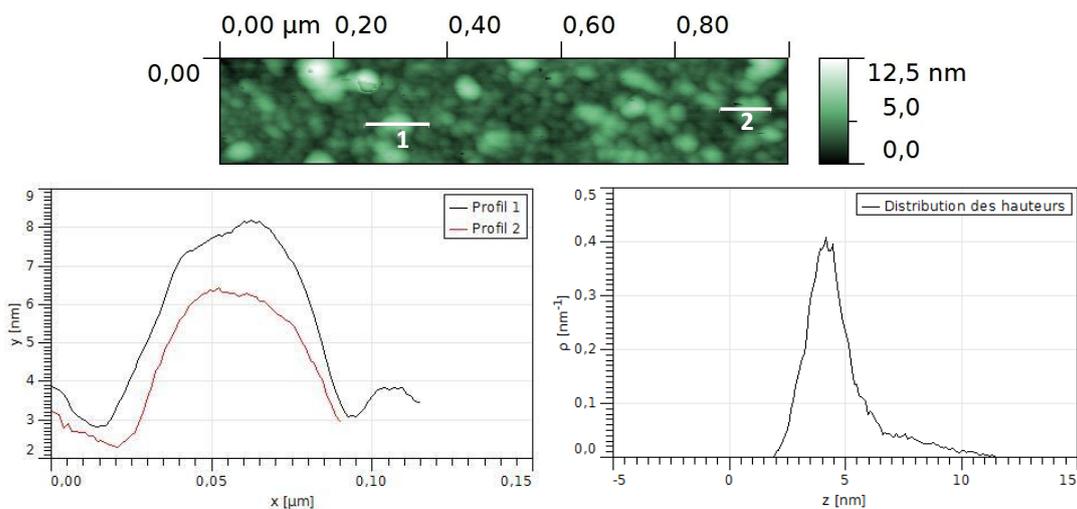


Figure 27 : Images AFM de topographie d'une surface Cr-Ar-SO₂-Brij58 et profils des hauteurs correspondants (RMS=1,35nm sur 5x5μm)

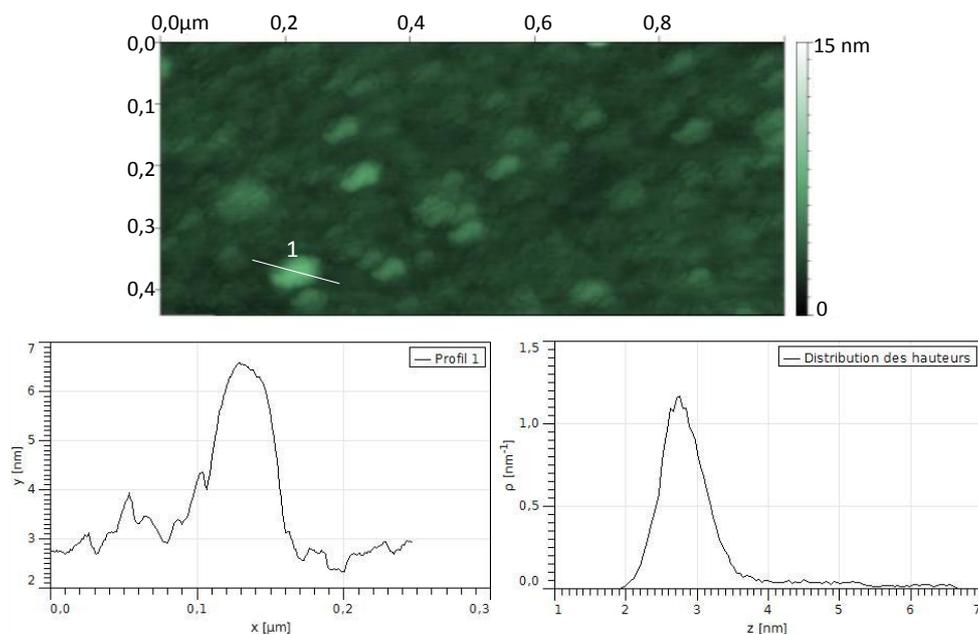
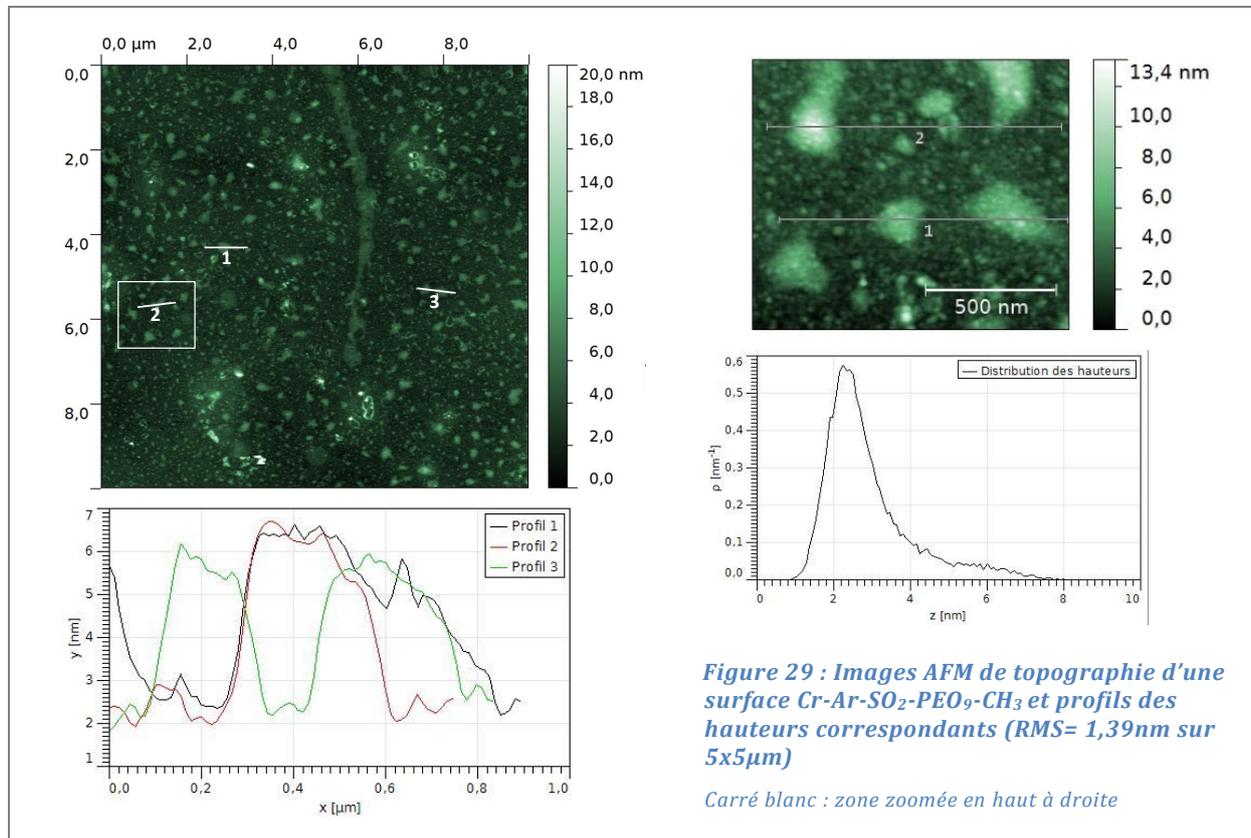


Figure 28 : Images AFM de topographie d'une surface Cr-Ar-SO₂-Brij58(x0,5) et profils des hauteurs correspondants (RMS=1,9nm sur 5x5μm)

Les profils de hauteur des surfaces de PEO, ont un fond à 2 nm de haut puis des marches de +4nm par-dessus. En comparaison avec le Brij58, on voit ici des petits îlots de membrane, plutôt qu'une couche homogène sur toute la surface avec des défauts de membrane. On pense à une monocouche tête en bas sur PEO et bicouche inversée par-dessus, terminant par un feuillet avec ses chaînes en haut. Bien moins de membrane est immobilisée sur PEO court par rapport au Brij58 qui comporte 20 brins PEO aussi mais possède un harpon pour la bicouche. Bien que la bicouche de DOPC se reconstruise au

passage dans l'air, les analyses d'images AFM dans l'air confirment l'immobilisation de celle-ci mise en évidence par SPR, QCM, EIS et les angles de contact.



3. Caractérisation par réflectivité des rayons-X après contact avec le DOPC

Nous présentons peu de mesures de réflectivité X des membranes harponnées par nos fonctionnalisations puisque la reconstruction des bicouches au séchage dans l'air conduit à des surfaces très hétérogènes et des profils de densité électronique complexes. Ceux-ci dépendent du taux de couverture atteint mais aussi du type de domaines latéraux stabilisés quand les chaînes passent à l'air (Mohamad, Noel et al. 2012). Nous n'avons pas encore porté ces échantillons sur un instrument à haute énergie pour traverser l'eau. Nous présentons le cas d'une surface de chrome mince (épaisseurs les plus élevées ~25,5 nm) fonctionnalisée -Ar-SO₂-Brij58 avant et après contact avec les vésicules de DOPC, puis séchage. L'analyse met en évidence l'apparition d'une monocouche au séchage à l'air provenant de l'ouverture des feuillettes de la bicouche harponnée en solution (Figure 30). Pour de la membrane fluide homogène, on peut s'attendre aux densités électroniques de $\rho^{\text{chaînes}} \sim 0,303$ et $\rho^{\text{Têtes}} \sim 0,47$ electrons/Å³ (soit $\rho b_{\text{chaînes}} \sim (8,55+i,0,12) \cdot 10^{-6} \text{Å}^{-2}$ et

$\rho_{Têtes} \sim (13,26 + i.3,58).10^{-6} \text{Å}^{-2}$ sur 2nm et moins de 0,5nm respectivement) et nous les retrouvons ici aux bonnes épaisseurs (voir Tableau 6). Par contre nous n'atteignons pas le détail du profil fin souhaité pour une analyse structurale en raison d'un taux de couverture important mais incomplet en feuillet avec des ilots qui perturbent la mesure.

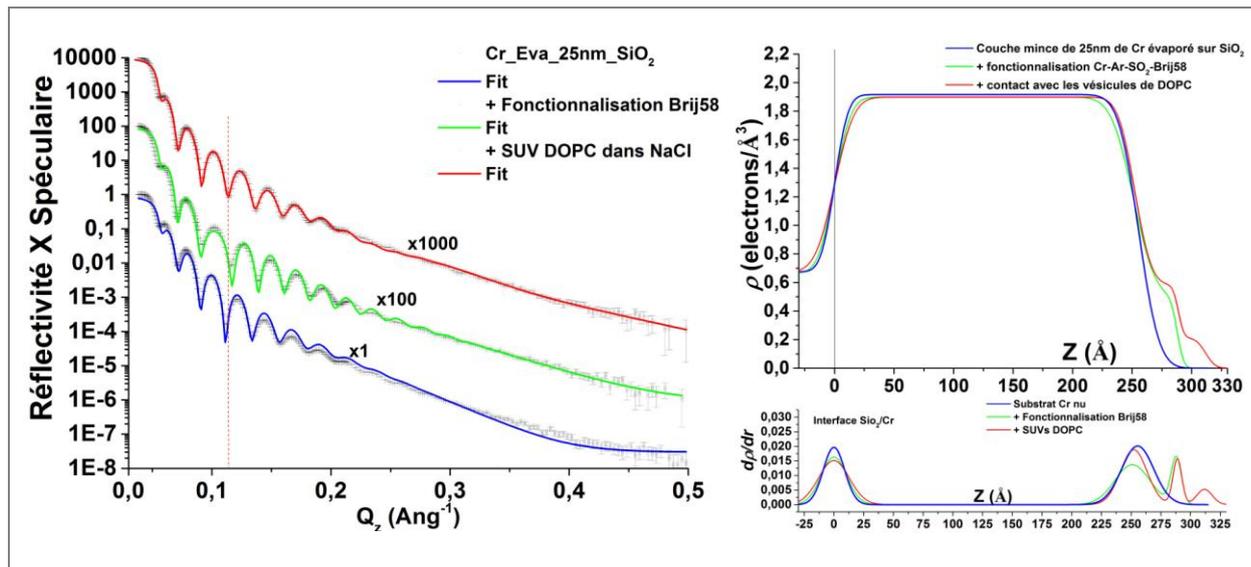


Figure 30 : A) Réflectivité spéculaire des rayons x d'une couche mince de chrome nu, fonctionnalisée par du Brij58 ($x=1$), avant et après contact avec les vésicules ; B) Profils de densité électronique correspondants et première dérivée

D. Dynamique des membranes suivie par fluorescence. Valorisation de la transparence des électrodes de chrome.

1. Dynamique des membranes biomimétiques

Une propriété particulièrement importante pour les mécanismes cellulaires provient de la fluidité des lipides (et protéines, etc... pour une bicouche biologique) et de leur diffusions (Figure 31). La diffusion latérale liée à l'échange de lipides voisins (~ 100 fois par seconde) est très rapide à l'intérieur d'un feuillet. Typiquement, le coefficient de diffusion est de l'ordre du $\mu\text{m}^2/\text{s}$ dans des membranes en phase liquide désordonnée, ce qui signifie qu'il faut environ 1 seconde à un lipide pour parcourir toute la longueur d'une cellule bactérienne d'une taille de 2 μm . Dans la littérature, ce coefficient de diffusion a été mesuré, à la fois dans des membranes biomimétiques et des membranes biologiques, par des techniques de plus en plus sophistiquées (de la RMN (Badia, Cuccia et al. 1997) au suivi de molécule individuelle de lipide (SPT : « single particle tracking ») (Saxton, Jacobson et al. 1997) en passant par des mesures de FRAP ("Fluorescence recovery after photobleaching" (Axelrod, Koppel et al. 1976)).

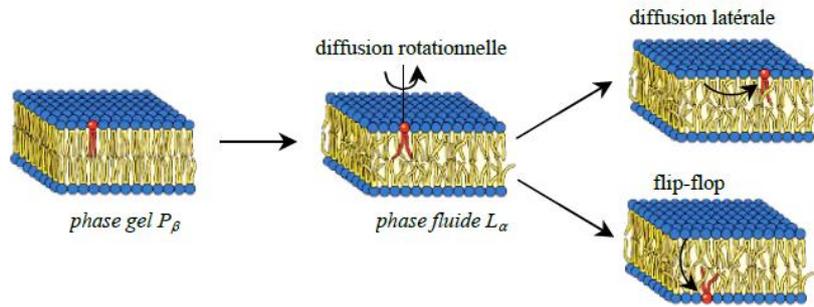


Figure 31 : Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes

La technique de FRAP (Recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment) est devenue une méthode standard en microscopie à fluorescence pour l'étude de la dynamique latérale des composés de la membrane (Figure 32).

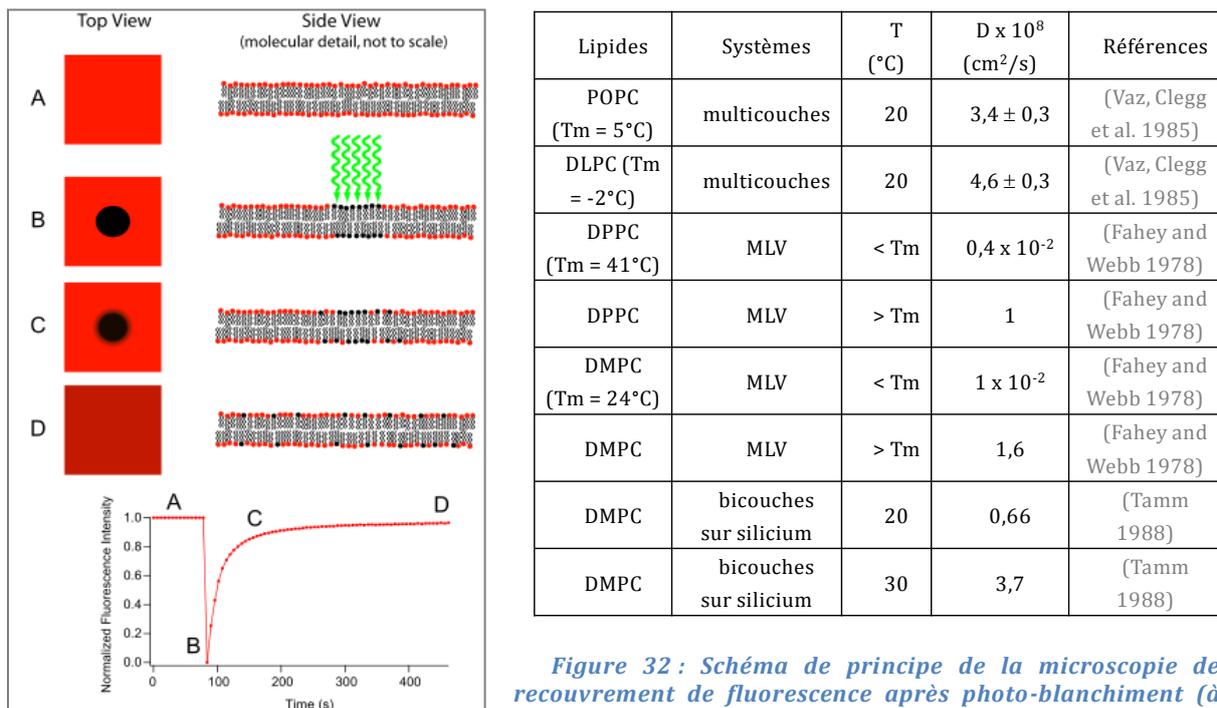


Figure 32 : Schéma de principe de la microscopie de recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment (à gauche) et exemples de coefficients de diffusion latérale mesurés dans des systèmes différents par FRAP (à droite)

En exposant brièvement au laser une zone de la membrane marquée par fluorescence, il est possible d'inhiber de façon irréversible sa fluorescence (la photo-blanchir). Ceci crée deux populations de molécules (une fluorescente l'autre pas) spatialement distinctes. Si les molécules sont capables de se déplacer dans le milieu, les deux populations se redistribuent et la zone blanchie redevient progressivement fluorescente. L'analyse de la cinétique de récupération de fluorescence permet de déduire le coefficient de diffusion

latérale « D », caractéristique de la vitesse de déplacement des molécules dans le milieu (plus la vitesse de diffusion est élevée plus la fluorescence revient rapidement).

De nombreux travaux ont montré par ces techniques que les coefficients de diffusion, des lipides dans des bicouches biomimétiques libres (marqués dans des GUV) et des bicouches supportées, était comparables (Tamm and McConnell 1985; Ratto and Longo 2002; Ratto and Longo 2003; Zhang and Granick 2005). Plus récemment, des études montrent que la diffusion dans les bicouches lipidiques supportées peut être ralentie par rapport aux GUV dans les mêmes conditions (force ionique, pression osmotique), comme mesuré par FCS avec un facteur 2 (Przybylo, Sýkora et al. 2006). Malgré la présence d'un volume d'eau interstitiel entre la bicouche et le substrat qui permet de conserver une certaine fluidité, les conséquences de la proximité du substrat sur la diffusion et la réorganisation des molécules restent assez discutées et difficiles à prévoir quantitativement (Hetzer, Heinz et al. 1998; Yang and Appleyard 2000). Quelques exemples sont fournis dans le tableau de la Figure 32.

La fluidité dépend beaucoup de la composition des membranes et de la température. Une membrane constituée d'un seul type de lipide peut former des phases plus ou moins ordonnées appelées $L\alpha$, $L\beta$ ou $P\beta$ (Lipowsky and Sackmann, 1995). Typiquement, lorsque la température diminue, la membrane passe d'un état liquide bidimensionnel (L) à un état de cristal liquide plus rigide (et plus ordonné) à partir d'une température de transition précise et caractéristique (phase nématique). Cette transition de phase intervient à des températures d'autant plus basses que les lipides sont courts (donc avec moins d'interactions stabilisantes entre eux) et insaturés (donc plus difficile à ordonner dans une phase cristalline). Le coefficient de diffusion des lipides dans des membranes dans l'état de cristal liquide chute de façon drastique jusqu'à des valeurs de $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. En utilisant le DOPC, nous travaillons avec une membrane fluide à l'ambiante.

2. Mesure des coefficients de diffusion d'une bicouche supportée

Dans cette partie, nous présentons l'étude de la dynamique mesurée par FRAP des phospholipides DOPC par ajout d'un marqueur fluorescent bien miscible : le 16:0-12:0 NBD PC (Haldar and Chattopadhyay 2013), à 3% ou 6% en fraction molaire avec le DOPC. Ces expériences ont été réalisées à Angers avec Rodolphe Perrot, responsable du Leica confocal, SP8.

Les expériences FRAP présentées sont réalisées sur des lamelles fines de verre ($170\mu\text{m}$) avec différents états de surface : nues ; avec un film mince de chrome semi-transparent ; fonctionnalisées Cr-Ar-SO₂-Brij58 ; ou Cr-Ar-SO₂-PEO₉-CH₃ ; ou Cr-Ar-SO₂-PEO₂₃-OH. Nous utilisons les chromes les plus défavorables avec environ 30nm de dépôt, pour valider leur

utilisation en fluorescence excitée et mesurée par le substrat en pleine immersion puisque les électrodes sont montées sur une cellule de fluide (NaCl 0,15M).

a. Mesures sur verre nu, mise au point de l'analyse FRAP avec le lipide NBD.

Pour mettre au point le traitement des expériences de FRAP, nous avons étudié en premier lieu une surface de verre nettoyée et mise en contact plusieurs heures avec des vésicules de DOPC contenant le marqueur. Après rinçage, nous obtenons un fond fluorescent homogène, mais qui laisse apparaître sur les bords des zones de différentes épaisseurs de membrane, suite au séchage localisé pendant l'étape de rinçage. Nous tirons profil de ces lieux pour examiner la dynamique de la membrane sur plusieurs niveaux (bicouches, bicouches connectées à une monocouche, etc...).

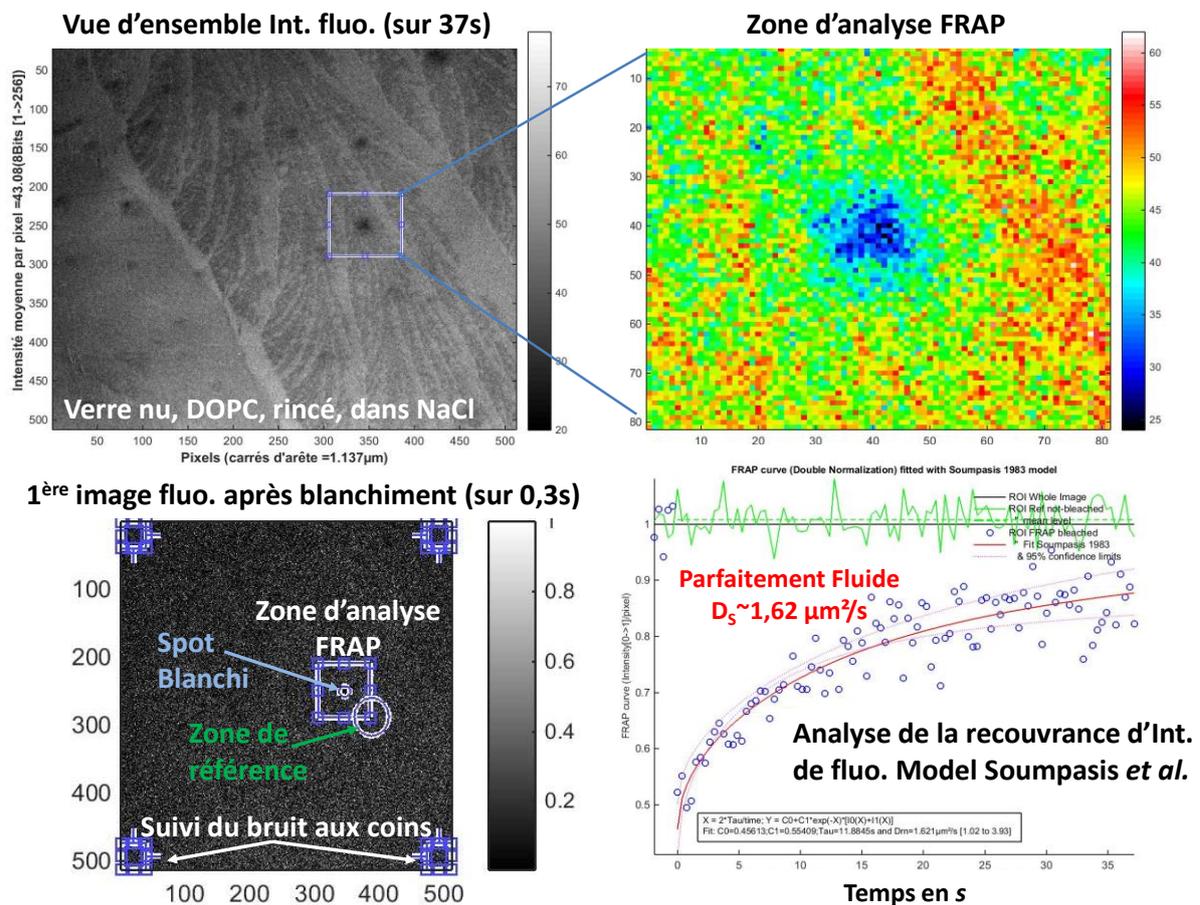


Figure 33 : Expériences FRAP sur lamelle de verre nue mise au contact du DOPC puis rincée dans le NaCl. A) Vue d'ensemble de la fluorescence (37s) ; B) Zone de blanchiment en fausses couleurs ; C) Différentes zones utilisées dans l'analyse pour suivre le recouvrement de fluorescence ; D) Recouvrement de fluorescence analysé par le modèle de Soumpasis et al.

La Figure 33 permet de visualiser de telles zones en sommant l'ensemble des clichés de 0,37s de balayage, pris sur 37 secondes consécutives. Le trou de blanchiment réalisé par

irradiation laser est bien visible, affiché en fausses couleurs, ainsi que la dynamique de recouvrance de la fluorescence (points bleus), normalisée par les dérives d'intensité dues au balayage d'acquisition et par l'intensité avant blanchiment. La courbe verte présente les fluctuations d'intensité de fluorescence du fond non blanchi et l'ajustement des données (courbe rouge), se fait suivant le modèle de Soumpasis *et al.* ((Soumpasis 1983)). Nous obtenons sur des zones de bicouche, un coefficient de diffusion en accord avec les valeurs de la littérature (Figure 32).

b. Couches minces de chrome semi-transparentes pour le FRAP.

Nous avons ensuite testé les lames recouvertes de chrome (30nm), ce qui a nécessité d'augmenter la puissance du Laser en balayage via le substrat de 1 à 20% de puissance. En accumulation longues (inhabituelles pour la technique), nous arrivons à récupérer de l'intensité sur le chrome nu qui ne provient pas de la fluorescence du marqueur puisque sans jamais aucun contact avec celui-ci (Figure 34).

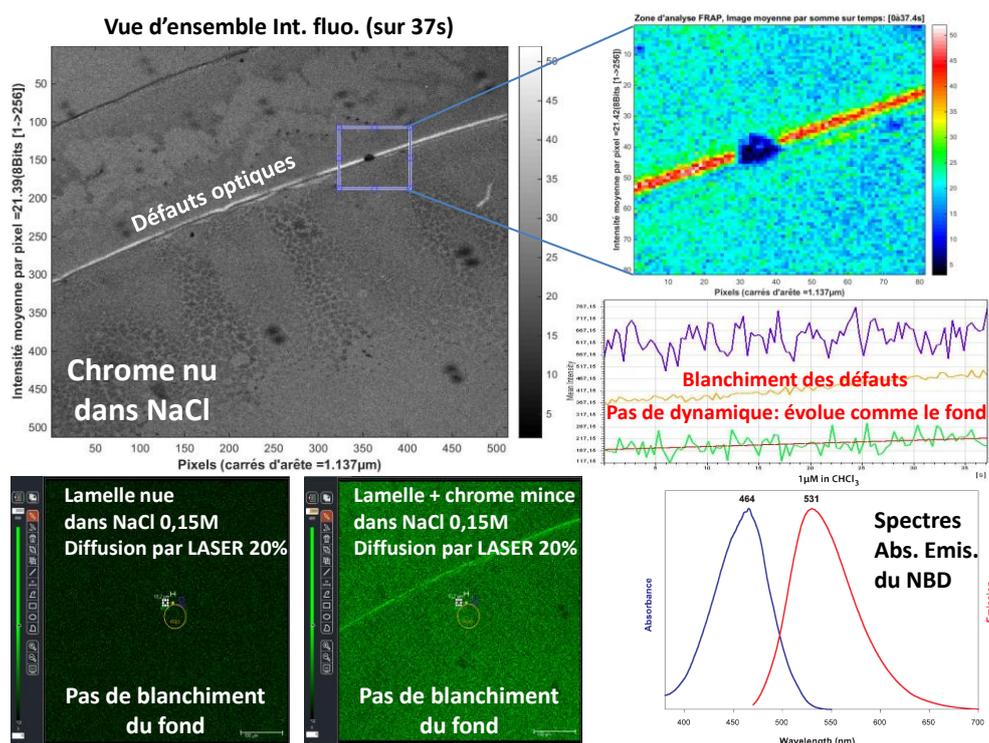


Figure 34 : *Expériences "témoin" de FRAP sur couches minces de chrome dans le NaCl mais sans aucune molécule fluorescente. A) Localisation de quelques défauts optiques rares de la couche mince de chrome ; B) Photo-blanchiment d'un défaut sans aucune dynamique de recouvrance ; C) Comparaison de l'intensité de fuite (excitation à 476nm et réception à 530-600nm) collectée sur lamelles de verre à 1% de puissance Laser et sur couche mince de chrome à 20% ; D) Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du marqueur lipidique utilisé (sauf sur ces clichés seulement dans NaCl).*

A ces fortes illuminations, des défauts optiques rares peuvent se voir et sont affectés par un éclairage intense (spot de blanchiment) mais ne présentent aucune recouvrance de l'intensité, tout comme le fond homogène des lames de chrome. L'utilisation d'une puissance plus élevée n'est donc pas un problème sur le fond, puisque la membrane immergée n'en reçoit qu'une faible proportion, comparable à celle déposée sur verre transparent à puissance plus faible.

Nous avons ensuite enregistré la recouvrance de fluorescence sur les surfaces fonctionnalisées Cr-ArSO₂Cl-Brij58 pur ($x=1$). Hormis la puissance Laser de 20%, l'expérience se déroule comme sur verre et nous constatons un blanchiment du fond homogène et reproductible des surfaces après contact avec les vésicules fluorescentes et rinçage dans NaCl. La Figure 35 compare la dynamique très lente obtenue (courbes de droite), par rapport au ralentissement constaté sur certaines zones des lamelles de verre nu présentant des bicouches très ralenties de même.

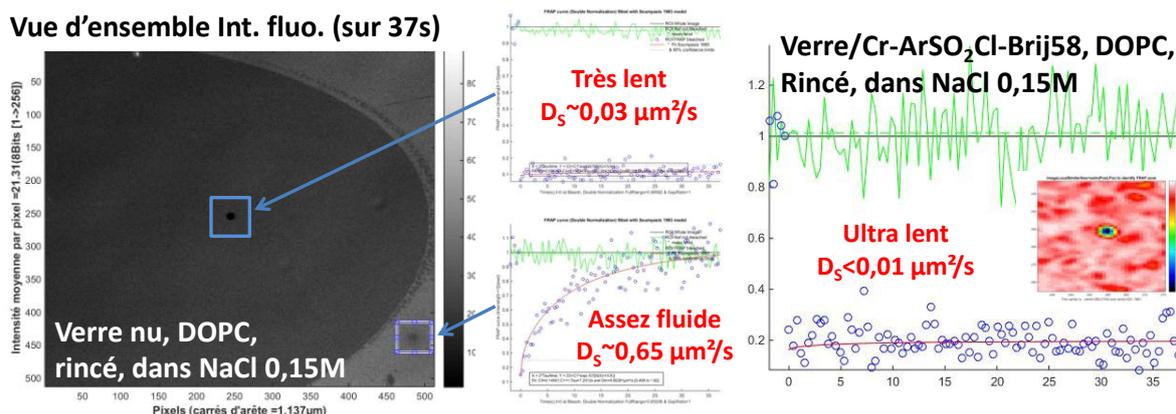
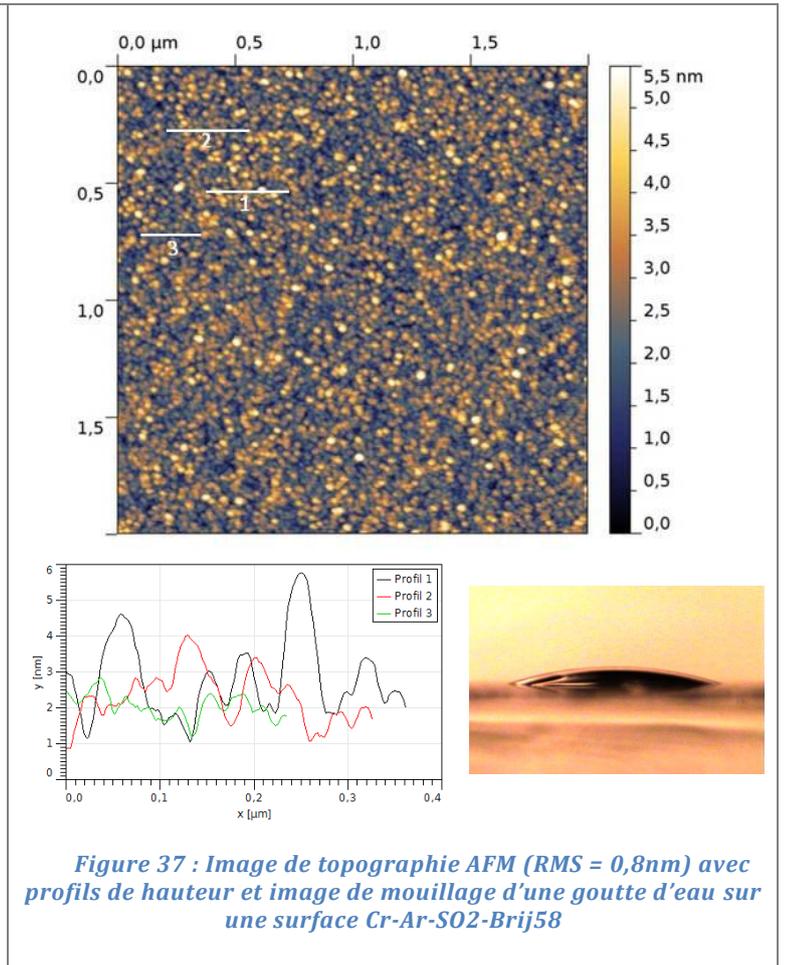
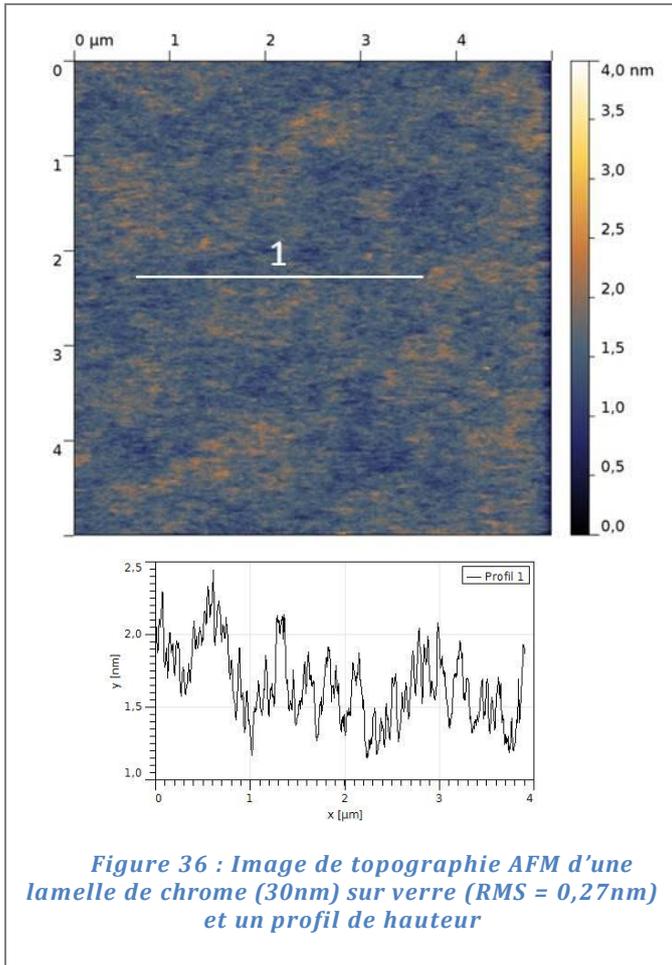


Figure 35 : A) Expériences de FRAP sur verre pour une membrane peu dynamique et figée au centre, mais fluide sur les surépaisseurs visibles sur les bords de l'image ; B) Expérience similaire sur fonctionnalisation Cr-ArSO₂Cl-Brij58 pur ($x=1$) montrant une dynamique encore plus lente.

Les lamelles que nous avons réussi à décoller proprement de la cellule (à ce stade elles sont hermétiques par un adhésif inerte), ont été rincées abondamment à la pissette d'eau milli-Q, séchées et observées en AFM à sec afin de confirmer ou non la trace de membrane sur les surfaces. Dans un premier temps, nous montrons les images topographiques des surfaces chrome nu (Figure 36) et fonctionnalisation Ar-SO₂-Brij58 (Figure 37) avant contact avec une solution de vésicules.



Sur la lamelle de chrome fonctionnalisée Ar-SO₂.Brij58 après contact avec les vésicules de DOPC nous observons bien la présence de membrane séchée de façon plus ou moins homogène. En effet, les Figure 38 et Figure 39 présentent une image topographique caractéristique des figures de membranes ayant démouillées. La membrane qui s'est formée en solution présentait une première monocouche avec les têtes des phospholipides face à la fonctionnalisation Brij et la seconde monocouche en face avec les têtes vers l'eau mais une fois à l'air celle-ci s'est réorganisée. La première monocouche est resté (premier niveau de profil de 1-3nm, le niveau « zéro » étant le chrome et la fonctionnalisation) puis la seconde a démouillé pour former une bicouche inversée de façon à ce que les chaînes des phospholipides soient face à l'air (deuxième niveau de profil de 3-7nm). La zone observée sur Figure 38 montre plus de membrane déposée que sur la Figure 39 et ayant formé des domaines plus larges.

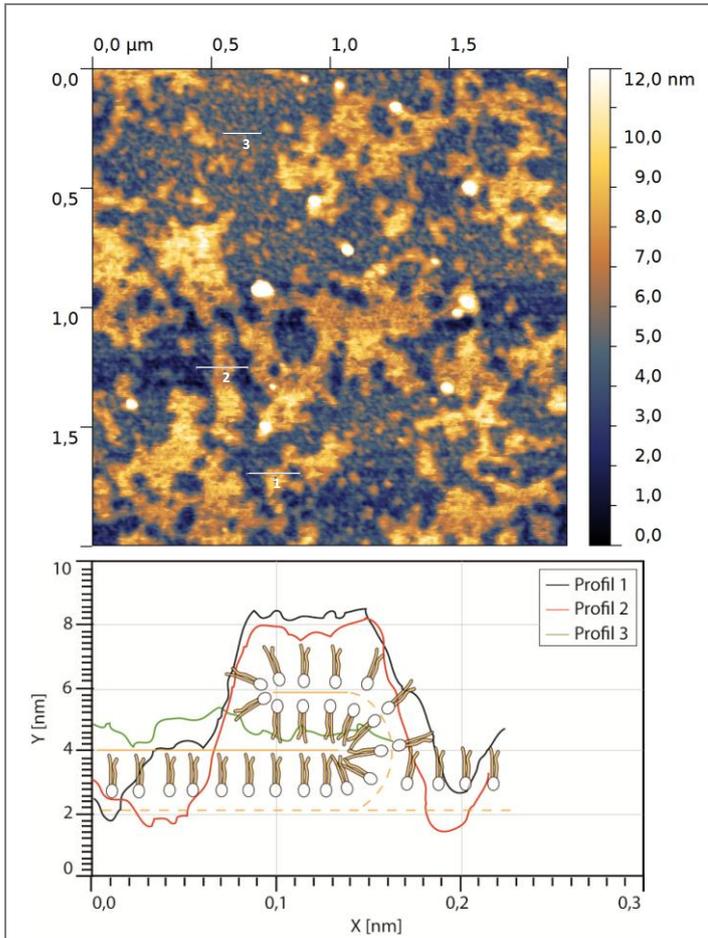


Figure 38 : Image de topographie AFM d'une surface Cr-Ar-SO₂-Brij58 avec DOPC séchée (RMS = 2nm) et profil de hauteur sur trois segments

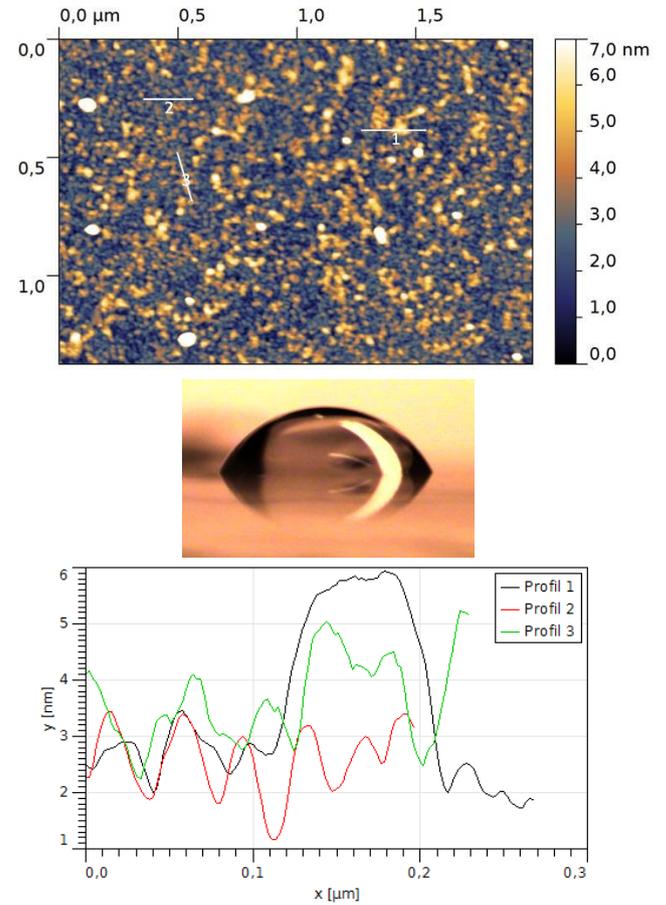


Figure 39 : Image de topographie AFM (RMS = 1,39nm) avec profils de hauteur et image de mouillage d'une goutte d'eau sur une surface Cr-Ar-SO₂-Brij58 avec DOPC séchée

D'autre part, la rugosité de ces surfaces (> 1nm) qui a augmenté par rapport à celle d'une surface fonctionnalisée Brij58 seule (< 1nm) montre qu'un dépôt s'est ajouté. La Figure 40 nous montre également que les formes observées en topographie sont déphasées par rapport au fond, sur l'image de phase, confirmant ainsi qu'il s'agit bien de membrane déposée.

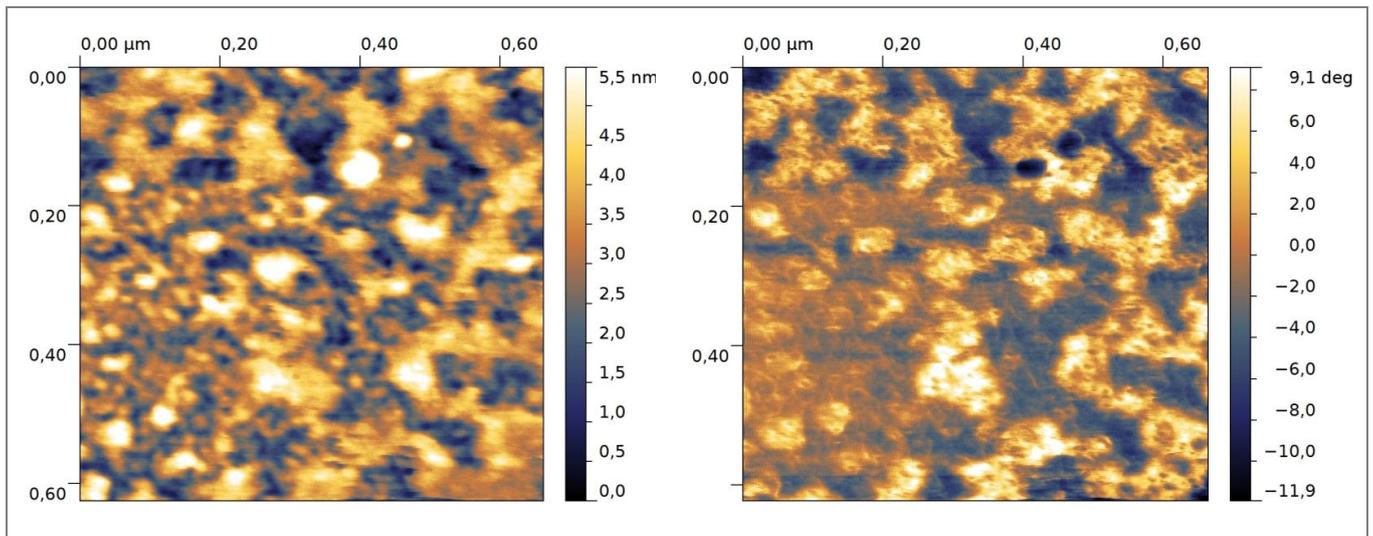


Figure 40 : Image de topographie AFM (à gauche) d'une surface Cr-Ar-SO₂-Brij58 avec DOPC séchée et image de phase correspondante (à droite)

Les quelques zones circulaires plus brillantes et donc plus épaisses (visibles Figure 38, Figure 39 et Figure 41) sont des domaines de multicouches de membrane que nous appelons « pyramides » ou « îlots » d'une dizaine de nanomètres (Mohamad, Noel et al. 2012).

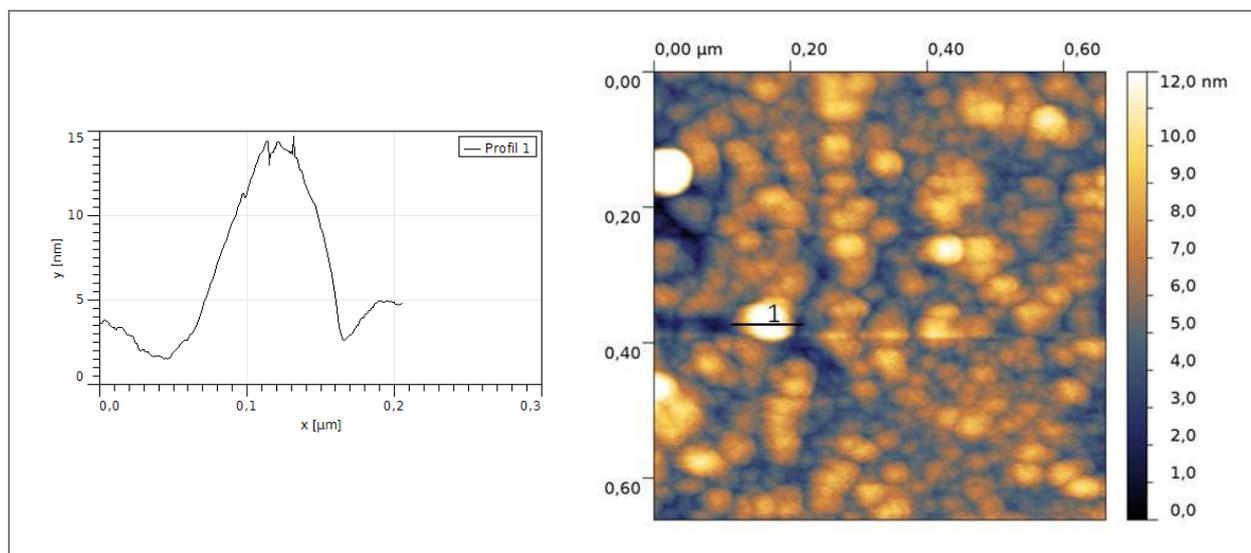


Figure 41 : Image de topographie AFM d'une surface Cr-Ar-SO₂-Brij58 avec DOPC séchée et profil d'une pyramide de membrane

La surface présente aussi des zones apparemment sans membrane ou en quantité très faible (monocouche ou quelques molécules éparses) si bien qu'on ne retrouve que la topographie et la rugosité de la fonctionnalisation Ar-SO₂-Brij58 sans membrane (Figure 42).

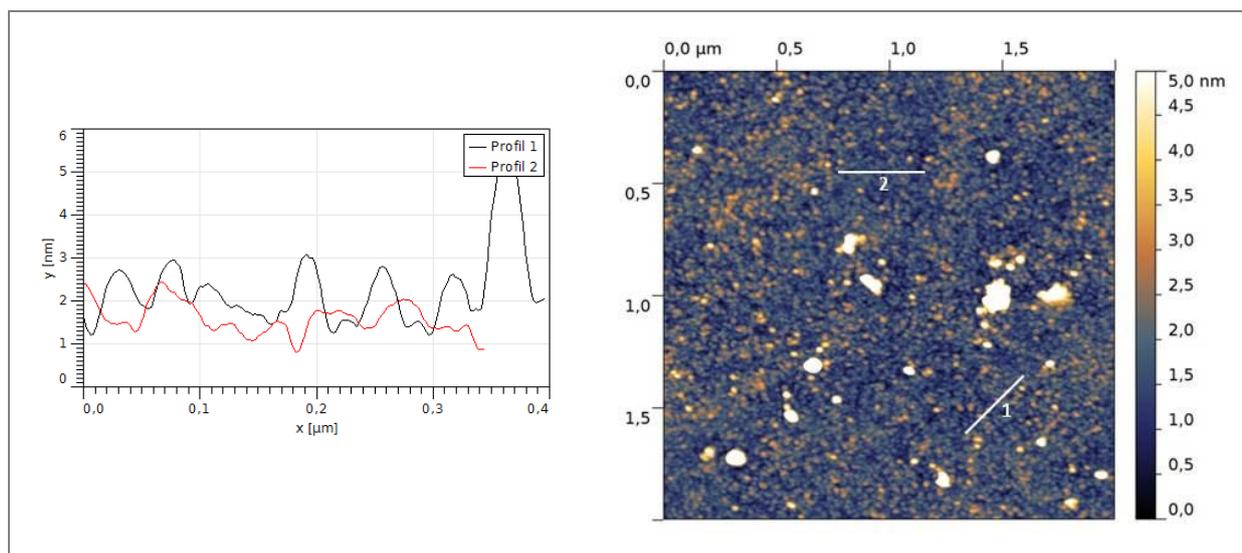


Figure 42 : Image de topographie AFM d'une surface Cr-Ar-SO₂-Brij58 avec DOPC séchée (RMS = 0,61nm) et profils de hauteur sur deux segments

Ceci peut être dû au temps de contact insuffisant de la surface avec la solution de vésicules (de 1 à 2h) durant cette première expérience FRAP. Néanmoins les angles de contact mesurés sur cette surface sont plutôt homogènes ($58,3 \pm 3,9^\circ$). Nous ne remettons pas en cause la concentration de la solution de vésicules puisque l'expérience témoins sur lamelle de verre dans les mêmes conditions (1mg/mL filtré) a montré le dépôt de membrane de façon homogène sur toute la surface et c'est celle utilisée au chapitre III.

c. Couches minces de chrome fonctionnalisées PEO hydrophile

Nous avons ensuite étudié des surfaces fonctionnalisées PEO (Figure 43). La recouvrance est présente mais aussi extrêmement lente, ce qui ne correspond pas à une bicouche fluide stabilisée.

En AFM, sur la lamelle de chrome fonctionnalisée Ar-SO₂-PEO₂₃ ayant été en contact avec les vésicules de DOPC, nous n'observons pas la présence d'îlots de membrane séchée (Figure 44). Les images topographiques présentent les mêmes aspects que celles avec Brij58 et les rugosités sont comparables ($RSM_{\text{Brij58}} = 0,81\text{nm}$ et $RSM_{\text{PEO23}} = 0,89\text{nm}$). Les analyses de FRAP en solution montrent donc la présence de membrane non adsorbée, donnant peu de recouvrance de fluorescence, qui s'en va une fois rincée à l'eau, ce qui est en accord avec les expériences SPR et QCM. Le PEO₂₃ ne permet pas l'ancrage d'une membrane stable ouverte sur la surface et les angles de contact mesurés ($42,3^\circ$) sont, plus hydrophobes que le PEO₂₃ sans membrane ($\sim 25^\circ$), mais moins hydrophobes que la surface Ar-SO₂-Brij58 avec DOPC ($58,3^\circ$).

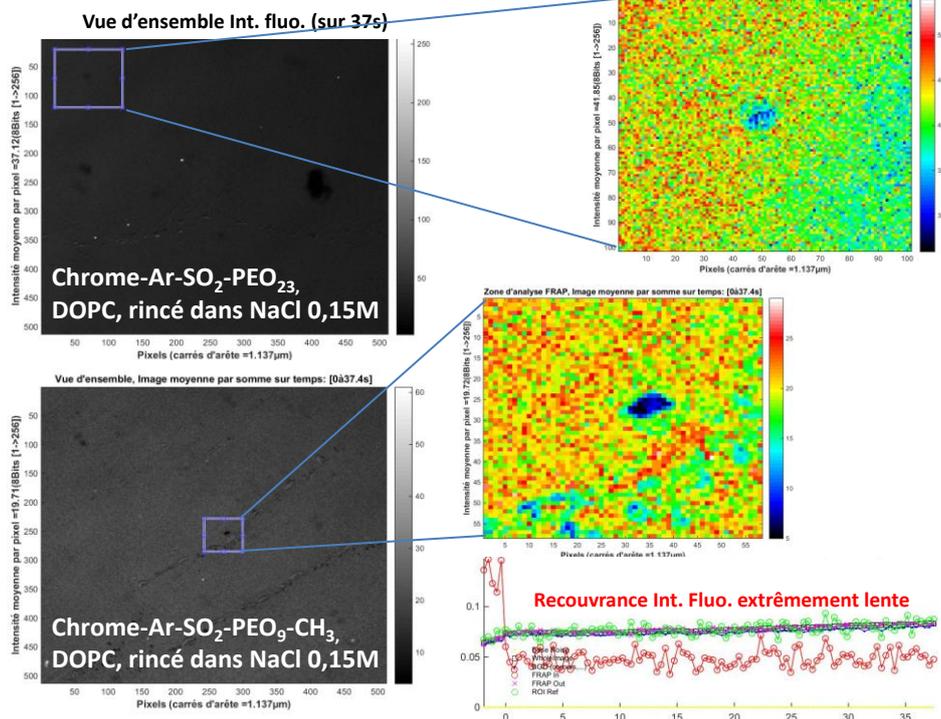


Figure 43 : Expériences "témoin" de FRAP sur couches minces de chrome fonctionnalisées PEO₉ et PEO₂₃.

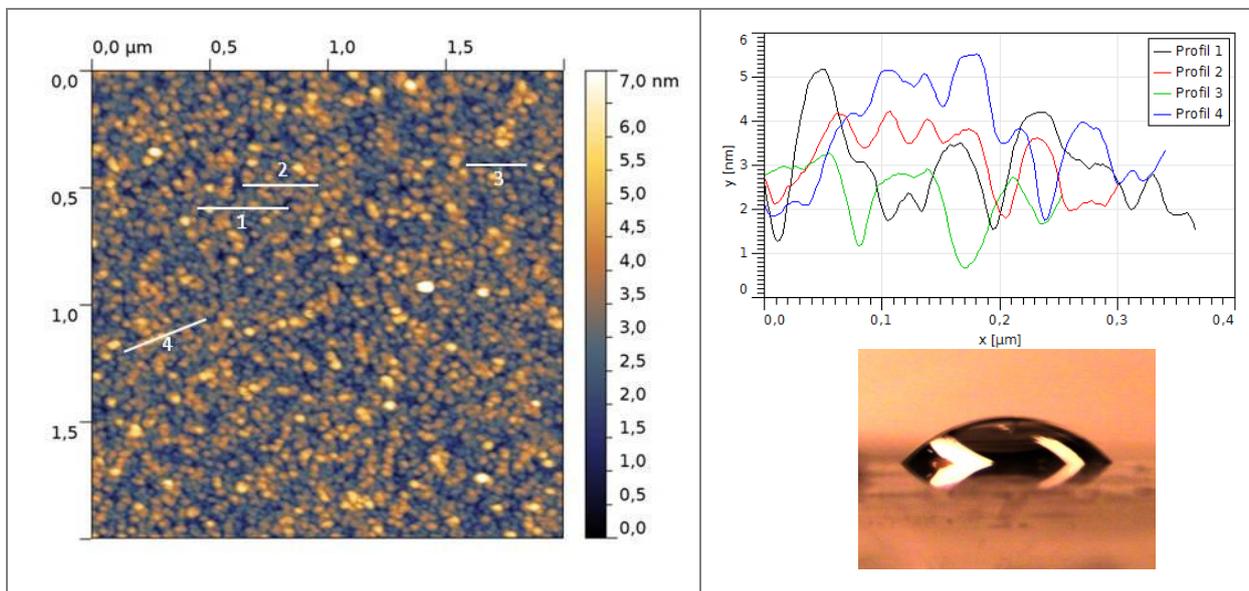


Figure 44 : Images de topographie AFM (à gauche, RMS = 0,89nm) avec profils de hauteur et image de mouillage d'une goutte d'eau (à droite) sur une surface Cr-Ar-SO₂-PEO₂₃ avec DOPC séchée

De ces expériences nous pouvons conclure que les lamelles semi-transparentes recouvertes de chrome et fonctionnalisées permettent le suivi de la fluorescence des membranes biomimétiques marquées. Les surfaces de Brij58 retiennent une quantité de

membrane en solution plus importante ($\theta_{\text{Brij-DOPC}} \sim 58^\circ$ par mesure des angles de contact) que les coussins hydrophiles de PEO ($\theta_{\text{PEO-DOPC}} \sim 42^\circ$), mais n'avons pas pu encore étudier le cas des mélanges Brij58/PEO. Ces toutes premières expériences révèlent par contre pour la fraction de harpon explorée, un ralentissement encore trop important de la dynamique de la bicouche par rapport aux membranes parfaitement fluides.

E. Conclusions du chapitre

Ce chapitre consacré à la formation d'une membrane biomimétique harponnée sur électrode de type couche mince ultra plane a mis en évidence la fonctionnalisation sans apport de rugosité de couches minces de chrome, même oxydées, par les tensio-actifs commerciaux (Brij58) utilisés sur l'or rugueux au chapitre II. Ces caractérisations montrent donc la bonne fonctionnalisation des surfaces et l'immobilisation de membrane présentant des défauts. Ces substrats plans se sont révélés réellement adaptés pour la caractérisation structurale des fonctionnalisations et de la membrane, puisque les mesures EIS ont mis en évidence des différences de comportement selon la densité d'ancrage (molécule ancre-harpon) et les profils de densité se distinguent couche par couche en rayons X (impossible sur or de même épaisseur, de contraste trop important). Les mesures EIS sur les surfaces Brij58/PEO avec membrane ancrée mettent en évidence deux groupes. Les surfaces de PEO pur ($\text{PEO}_9\text{-CH}_3$) ou avec peu de Brij58 ($x=0,25$) supportant une membrane ont un comportement $R_s\text{CPE}$ lié à un régime assez capacitif avec peu de courants de fuite résistifs. Les courbes EIS n'évoluent que peu au cours du temps d'exposition aux SUVs et, après rinçage, redeviennent proches des fonctionnalisations sans membrane. Les membranes formées sur les fonctionnalisations avec plus de Brij58 (75% à 100%) évoluent au cours du temps, vers un comportement $R_s(R_{ct}\text{CPE})$ marqué avec une diminution de la résistivité au passage des ions qui ne s'accumulent pas. Ce comportement est décrit et modélisé dans la littérature. Il dénote d'une certaine densité et taille de pores (ou défauts) qui augmente au cours du temps de contact avec les SUVs. Il semble donc que le groupe de très faible densité de Brij58 et de PEO seul n'immobilise que peu de membrane, à la différence des surfaces présentant plus de molécules ancre-harpon. Ceci est confirmé par les mesures d'angle de contact qui montrent le caractère beaucoup moins hydrophobe de la surface PEO seul exposée aux SUVs que la surface de Brij58. Les mesures EIS sur membrane montrent également que celles-ci ne sont pas ancrées pas une monocouche dense de molécules ancre-harpon mais par une fonctionnalisation plus éparse et cela même à des fractions de Brij58 élevées au trempage de l'électrode dans des solutions à plus de 50% de Brij58. Ceci concorde avec la faible densité d'ancrage qui s'était révélé avec l'analyse de la fonctionnalisation seule, sans membrane, au chapitre II.

Des premières expériences de recouvrance de la fluorescence après photo-blanchiment, montrent que ces électrodes ultra-planes permettent de plus l'utilisation d'autres techniques d'inspection des propriétés structurales et dynamiques de la membrane biomimétique supportée.

Annexes Ch. IV

A. Réflectivité spéculaire des rayons X et des neutrons

Le formalisme théorique et la méthodologie de mesure sont décrits sur le site d'enseignement pour ingénieurs (<http://www.optique-ingenieur.org/>) en suivant lien permanent (Cours G.Brotons) :

http://www.optique-ingenieur.org/fr/cours/OPI_fr_M08_C01/co/OPI_fr_M08_C01_web.html

Le principe de base consiste à faire réfléchir un faisceau de rayons X sur une surface et à mesurer la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence $\alpha_{in}=\theta$ et de diffusion α_{out} par rapport à la surface. Dans le cas d'une réflectivité spéculaire (figure) l'angle d'incidence α_i et l'angle de sortie α_f sont identiques. Le vecteur de diffusion Q est suivant l'axe z qui est perpendiculaire à la surface. La rugosité d'une surface diminue l'intensité réfléchie spéculairement d'autant plus qu'on la mesure à grands q . L'intensité manquante est dispersée dans des directions non-spéculaires. La réflectivité spéculaire permet de sonder la structure suivant la direction normale, c'est-à-dire le profil de densité électronique perpendiculaire au substrat, tandis que la réflectivité non-spéculaire est sensible aussi à la structure dans le plan de l'interface (avec une composante non-nulle de q dans le plan).

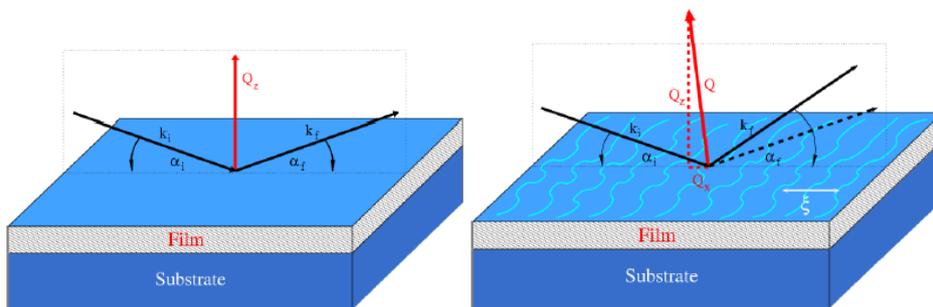


Schéma de réflectivité spéculaire, l'angle d'incidence est égal à l'angle d'émergence (à gauche)

Réflectivité non-spéculaire, le vecteur de diffusion a deux composantes (à droite)

Quand un faisceau de photons X arrive sur une surface, les électrons subissent une force de la part du champ électrique de l'onde incidente. En considérant le modèle phénoménologique de l'électron élastiquement lié, on peut calculer l'indice de réfraction aux rayons X :

$$n = 1 - \delta - i\beta, \quad \text{avec } \delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} r_e \rho_e \quad \text{et} \quad \beta = \frac{\lambda}{4\pi} \mu_X$$

$r_e = 2,818 \cdot 10^{-15}$ est le rayon classique de l'électron, ρ_e est la densité électronique du matériau et μ_X est la longueur d'absorption. Les valeurs caractéristiques pour δ sont de l'ordre 10^{-5} à 10^{-6} et l'angle critique α_c est autour de $0,1^\circ$ à $0,5^\circ$. Sachant que la densité de

longueur de diffusion (SLD) est de la forme $\rho b = r_0 \frac{\text{nombre d'électron}}{\text{volume considéré}}$ on peut réécrire δ et β sous la forme :

$$\delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho_b^{réel} \quad \text{et} \quad \beta = \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho_b^{imag}$$

Ainsi connaissant δ (grandeur liée à la diffusion) et β (grandeur liée à l'absorption) on peut calculer la densité de longueur de diffusion. Par ailleurs, pour un matériau constitué de plusieurs éléments on utilise la forme la plus générale de la SLD.

$$\rho b = r_0 N_a \frac{\rho_\Sigma}{M_\Sigma} \sum_{\ell}^{\text{élément}} N_\ell (Z_\ell + f'_\ell + i f''_\ell)$$

Avec N_ℓ le nombre d'atomes dans Σ ; exemple dans SiO_2 $N_{\text{Si}} = 1$ et $N_{\text{O}} = 2$. La grandeur ρ_Σ est la masse volumique de l'élément en question, M_Σ est sa masse molaire. La distance $r_0 = 2,81791 \cdot 10^{-5} \text{Å}$ est le rayon classique de l'atome de Bohr. Le tableau suivant donne les valeurs de référence utilisées dans la thèse :

i. Surface idéale : réflectivité de Fresnel :

Le coefficient de réflexion complexe d'une onde électromagnétique qui vient se réfléchir sur une surface idéale a été calculé par Fresnel.

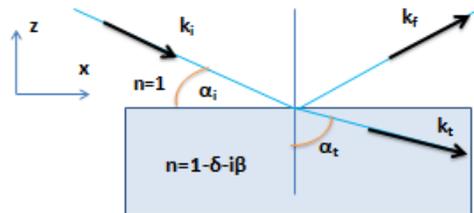
$$r = \frac{k_{i,z} - k_{t,z}}{k_{i,z} + k_{t,z}}$$

$k_{i,z}$ et $k_{t,z}$ sont respectivement les composantes suivant z des ondes incidente et transmise. Ces deux grandeurs peuvent être exprimées en fonction des angles d'incidence et de transmission. L'intensité réfléchie pour un substrat semi-infini vaut $R_F = |r|^2$.

$$\begin{cases} k_{i,z} = -k_0 \sin \alpha_i \\ k_{t,z} = -k_0 n \sin \alpha_t; \quad n \cos \alpha_t = \cos \alpha_i \end{cases}$$

$\alpha_i \ll 1$, on obtient :

$$\begin{cases} \sin \alpha_i \cong \alpha_i \\ \cos \alpha_t \cong 1 - \frac{\alpha_i^2}{2} \\ n^2 = 1 - 2\delta - 2i\beta \end{cases}$$



$$\Rightarrow r = \frac{\alpha_i - \sqrt{\alpha_i^2 - 2\delta - 2i\beta}}{\alpha_i + \sqrt{\alpha_i^2 - 2\delta - 2i\beta}} \quad \text{On peut en déduire}$$

facilement l'expression de:

$$R_F = |r|^2 = \left| \frac{\alpha_i - \sqrt{\alpha_i^2 - 2\delta - 2i\beta}}{\alpha_i + \sqrt{\alpha_i^2 - 2\delta - 2i\beta}} \right|^2$$

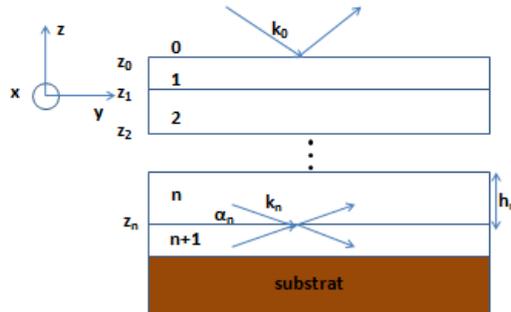
Nous avons deux régimes particuliers :

- $\alpha_i < \alpha_c \Rightarrow R_F = 1$, correspond au plateau de réflexion totale.
- $\alpha_i \gg 3\alpha_c \Rightarrow R_F \approx \frac{q_c^4}{16q_z^4}$, au dessus de l'angle critique l'intensité réfléchi chute très brusquement.

ii. Interfaces multiples : théorie dynamique et formalisme matriciel

Le formalisme matriciel s'applique à un échantillon ayant de multiples interfaces comme dans le cas des films multicouches déposés sur un substrat. La diffusion de toutes les interfaces doit être prise en compte. On utilise les équations de Maxwell et à chaque interface les relations de continuité des champs électriques et magnétiques sont établies en prenant en considération les réflexions multiples à chaque interface. Appliquer cette théorie consiste à considérer la matrice de transfert M qui est un produit des matrices de réflexion et de transmission.

$$M = \prod_{j=0}^N \underbrace{R_{j,j+1}}_{\text{Matrice de réflexion}} * \underbrace{T_j}_{\text{matrice de transmission}}, \quad \text{Avec}$$



$$\begin{cases} R_{j,j+1} = \begin{bmatrix} p_{j,j+1} & m_{j,j+1} \\ m_{j,j+1} & p_{j,j+1} \end{bmatrix} \\ T_j = \begin{bmatrix} e^{-ik_{z,j}H} & 0 \\ 0 & e^{+ik_{z,j}H} \end{bmatrix} \end{cases}$$

$$p_{j,j+1} = \frac{k_{z,j} + k_{z,j+1}}{2k_{z,j}} \quad \text{et} \quad m_{j,j+1} = \frac{k_{z,j} - k_{z,j+1}}{2k_{z,j}}$$

La matrice de transfert est donc une matrice 2*2. On n'observe pas d'onde de retour en provenance du substrat. Ceci nous permet d'accéder aux coefficients de réflexion et de transmission et d'avoir facilement l'expression de la réflectivité.

$$r = \frac{M_{12}}{M_{22}} \quad \text{et} \quad t = \frac{1}{M_{22}}$$

La réflectivité est une méthode très utile pour étudier les couches minces. Elle donne accès à des informations telles que le profil de densité électronique des couches, la rugosité des interfaces et enfin les épaisseurs des couches déposées.

Tableau RX : Caractéristiques principales des éléments chimiques constituant les matériaux étudiés pour la diffusion X ($\lambda_{Cu-K\alpha}=1,54\text{Å}$) pour une source au cuivre) et Neutron ($\lambda_0 = 1,798 \text{Å}$). Données Issues de la référence : Orange and Blue Data books et du site internet du NIST. Pour chaque élément : A est sa masse atomique, ρ la densité et V_{Elem} le volume moléculaire estimé. Le nombre total d'électrons Σz permet de calculer la densité électronique ρ_{elec} et f_1 correspond au nombre effectif d'électrons diffusant donnant la densité efficace à l'énergie choisie ; f_2 est la grandeur associée correspondant à l'absorption de l'élément et permet de calculer le coefficient d'absorption linéaire $\mu [\text{Å}^{-1}]$ ainsi que $\sigma_{ph}=\mu/\rho [\text{cm}^2/\text{g}]$ qui est la section efficace massique de photoabsorption ; $\sigma_{ine} [\text{cm}^2/\text{g}]$ est la section efficace inélastique (effet Compton, cm^2/g) ; les δ et β sont les décréments réels et imaginaires des indices de réfraction complexes ; L'angle critique mesuré en réflectivité est noté $\alpha_c(^{\circ})$ dans le vide (0) et le vecteur de diffusion associé est $Q_c [\text{Å}^{-1}]$. Pour les neutrons, nous donnons les longueurs de diffusion cohérente et incohérente (b_{coh} et b_{inc} en Å) et les section efficaces correspondantes σ en barns avec $1 [bn] = 100 [fm^2] = 10^{-4} [\text{Å}^2]$. Les sections efficaces de diffusion totale et d'absorption (incluant l'incohérent) sont aussi calculées. Les densités de longueur de diffusion complexes (ρb) $[\text{Å}^{-2}]$ peuvent se comparer entre les deux rayonnements avec la partie réelle quantifiant la diffusion du matériau et la partie imaginaire son absorption. Les symboles ? marquent les valeurs non calculées et les symboles - sont inappropriées ou inutiles ici.

			Rayons-X	Rayons-X	Rayons-X	Rayons-X	Neutrons	Neutrons	Neutrons	Neutrons	Neutrons	Neutrons
Éléments purs ou matériaux	Grandeurs physiques	Electrons	Diffusion $\lambda_{Cu-K\alpha}=1,54[\text{Å}]$ or 8,042 keV	Absorption dont effet inélastique	Indice optique complexe, décrément réel et imaginaire.	Mesure par réflectivité sur le matériau pur	Diffusion Cohérente at $\lambda_0 = 1,798 [\text{Å}]$, i.e. 25,3meV or 2200m/s	Diffusion Incohérente	Diffusion totale	Absorption totale (dont incohérent mais sans cohérent)	Indice optique complexe	Mesure sur matériau pur
Éléments = Σ composition isotopique (Spins).	A [g/mol] ; ρ [g/cm ³] et $V_{Elem} [\text{Å}^3]$	$\sum_j^{atomes} Z_j$ et $\rho_{elec} [\text{Å}^{-3}]$	$f_1 \equiv \sum_j^{atomes} z_j^{eff}$; $(\rho b)^{eff} [\text{Å}^{-2}]$ et $\rho_{elec}^{eff} [\text{Å}^{-3}]$	$f_2 \equiv f''$; $\mu [\text{Å}^{-1}]$; $(1/\mu)$; $(\rho b)_{abs} [\text{Å}^{-2}]$ $\sigma_{ph} \equiv \mu/\rho$ [cm ² /g] et $\sigma_{ine} [\text{cm}^2/\text{g}]$	δ_{RX} et β_{RX}	$\alpha_{c,RX} (^{\circ})$ et $Q_{c,N} [\text{Å}^{-1}]$	$(b_{Coh}) [\text{Å}]$; $(\rho b)_{coh} [\text{Å}^{-2}]$ et $\sigma_{Coh} [bn]$	$(b_{Inc}) [\text{Å}]$ et $\sigma_{Inc} [bn]$	$\sigma_{Dif} [bn]$	$\mu [\text{Å}^{-1}]$; $(1/\mu)$; $(\rho b)_{abs} [\text{Å}^{-2}]$ et $\sigma_{Abs} [bn]$	δ_N et β_N	$\alpha_{c,N} (^{\circ})$ et $Q_{c,N} [\text{Å}^{-1}]$
Hydrogène (liq)= 99,985% $_1\text{H}$ (½) +0,015% $_2\text{D}$ (1) +(12,32 a) $_3\text{T}$ (½)	1,008 ; 0,07(liq) ou 0,009 (gaz) et 23,91	1 et 0,0418	1 ; 1,178 10⁻⁶ et 0,0418	1,111 10 ⁻⁶ ; 4,043 10 ⁻¹² ; 24,7 m ; 1,309 10⁻¹² ; 0,0057631(gaz) z) et 0,3492 (gaz)	5,7244 10 ⁻¹⁰ (gaz) et 6,714 10 ⁻¹⁶ (gaz)	0,0542° et 0,0077	-3,739 10 ⁻⁵ ; -1,582 10⁻⁶ et 1,7568	25,27 10 ⁻⁵ et 80,26	82,02	3,412 10 ⁻⁸ ; 0,293 cm ; 10,69 10⁻⁶ et 0,3326	? et ?	? et ?
100% $_1\text{H}$ (½)	1		1 ; ? et ?				-3,7406 10 ⁻⁵ ; - et 1,7583	25,27 10 ⁻⁵ et 80,27	82,03	et 0,3326		
100% $_2\text{D}$ (1)	2		1 ; ? et ?				6,671 10 ⁻⁵ ; - et 5,592	4,04 10 ⁻⁵ et 2,05	7,64	et 0,000519		
100% $_3\text{T}$ (½)	3		1 ; ? et ?				4,792 10 ⁻⁵ ; - et 2,89	-1,04 10 ⁻⁵ et 0,14	3,03	et 0		
Carbone (graphite) = 98,9% $_{12}\text{C}$ (0) + 1,10% $_{13}\text{C}$ (½)	12,011 ; 2,1 à 2,2 et 9,5	6 et 0,6316	6,019 ; 17,86 10⁻⁶ et 0,634	0,0096 ; 8,8 10 ⁻⁸ ; 1,134 mm ; 0,0284 10⁻⁶ ; 4,179 et 0,1255	7,078 10 ⁻⁶ et 0,0108 10 ⁻⁶	0,211° et 0,03	6,64 10 ⁻⁵ ; et 5,551	0 à -0,52 10 ⁻⁵ ($_{13}\text{C}$) et 0,001	5,551	4,73 10 ⁻¹² ; 21,10 m ; 0,094 10⁻⁶ et 0,0035	? et ?	? et ?
Oxygène (gaz) = 99,762% $_{16}\text{O}$ (0)	15,999 ; 0,00143	8 et	8,052 ; 0,012 10⁻⁶	0,03371 ; 1,58 10 ⁻¹⁰ ;	0,004610 10 ⁻⁶ et	0,00552° et	5,803 10 ⁻⁵ ; 3,1245 10⁻⁹	0 à 0,18 10 ⁻⁵ ($_{17}\text{O}$)	4,232	1,02 10 ⁻¹⁶ ; 977.83	? et ?	? et ?

+ 0,038% ¹⁷ O (5/2) + 0,2% ¹⁸ O (0)	et 18579	0,00043	et 0,00043	0,633 m ; 5,113 10⁻¹¹ ; 11,04 et 0,1184	1,94 10 ⁻¹¹	0.00078	et 4,232	et 0,0008		km ; 0 et 0,00019		
Eau légère (H₂O)	18 ; 1 et 29,9 à 30	10 et 0.333 à 0.335	- ; 9.469 à 9,8 10⁻⁶ et -	- ; 9,95 10 ⁻⁸ ; 1,005 mm ; 0.0318 10⁻⁶ ; - et -	3,73 10 ⁻⁶ et 0,0134 10 ⁻⁶	0,1564° et 0,0222	- ; -0,5614 10⁻⁶ et -	-	-	5,37 10 ⁻⁸ , 0,186 cm ; 20,693 10⁻⁶ et -	0,2119 10 ⁻⁶ et 4,49 10 ⁻¹¹	0° et 0
Silicium = 92,23% ²⁸ Si (0) + 4,67 ²⁹ Si (½) +3,10% ³⁰ Si (0)	28,086 ; 2,33 et 20,016	14 et 0.7	14,26 ; 19,92 à 20,737 10⁻⁶ et 0.712	0,3254 ; 1,414 10 ⁻⁶ ; 70.69 µm ; 0,458 10⁻⁶ ; 60.62 et 0,09535	7,617 10 ⁻⁶ et 0,17329 10 ⁻⁶	0,223° et 0,0317	4,149 10 ⁻⁵ ; 2,074 à 2,14 10⁻⁶ et 2,163	0 à 0,001 10 ⁻⁵ (²⁹ Si) et 0,004	2,167	8,5 10 ⁻¹¹ , 1,144 m ; 0,089 10⁻⁶ ; et 0,171	0,808 10 ⁻⁶ et 1,05 10 ⁻¹¹	0,0102° et 0,0715
Oxyde de silicium (SiO₂, verre)	60,1 ; 2,05 à 2,196 et 48,67 à 45,43	30 et 0,616	30,364 ; 17,58 à 18,88 10⁻⁶ et 0.624 à 64	- ; 7,03 10 ⁻⁷ ; 142,1 µm ; 0,228 10⁻⁶ ; - et -	6,81 10 ⁻⁶ et 0,086 10 ⁻⁶	0,2116° et 0,0301	- ; 3,238 à 3,47 10⁻⁶ et -	-	-	3,52 10 ⁻¹¹ , 2,77 à 2,84 m 0,063 10⁻⁶ et -	1,228 10 ⁻⁶ et 0,43 10 ⁻¹¹	0,0895° et 0,0127
Chrome métal = 83,79% ⁵² Cr (0) + 9,5 ⁵³ Cr (3/2) + 4,35 ⁵⁰ Cr (0) +2,36% ⁵⁴ Cr (0)	51,996 ; 7,19 et 12,01	24 et 1,985	23,84 ; 55,942 10⁻⁶ et 1,985	2,442 ; 17,64 10 ⁻⁶ ; 5,668 µm ; 5,732 10⁻⁶ ; 245,8 et 0,07686	21,162 10 ⁻⁶ et 2,1681 10 ⁻⁶	0,373° et 0,053	3,635 10 ⁻⁵ ; 3,027 à 3,07 10⁻⁶ et 1,66	0 à 6,87 10 ⁻⁵ (⁵³ Cr) et 1,83	3,49	4,06 10 ⁻⁹ , 2,461 cm ; 3,178 10⁻⁶ dont Abs : 0,001 10 ⁻⁶ ; et 3,05	? et ?	? et ?
Sesquioxyde de chrome (Cr₂O₃)	151,9904 ; 5,22 et 48,35	72 et 1,489	71,836 ; 41,87 10⁻⁶ et 1,486	4,991 ; 8,98 10 ⁻⁶ ; 11,133 µm ; 2,906 10⁻⁶ ; - et -	15,88 10 ⁻⁶ et 1,104 10 ⁻⁶	0,323° et 0,0459	- ; 5,106 10⁻⁶ Et -	-	-	2,019 10 ⁻⁹ , 4,954 cm ; 2,496 10⁻⁶ dont Abs : 0 ; et -	? et ?	? et ?
Or métal = 100% ⁷⁹ Au (0)	196,967 ; 19,3 et 16,95	79 et 4,662	74,99 ; 124,694 10⁻⁶ et 4,425	7,727 ; 39,59 10 ⁻⁶ ; 2,526 µm ; 12,851 10⁻⁶ ; 205,3 et 0,03893	47,314 10 ⁻⁶ et 4,8527 10 ⁻⁶	0,557° et 0,0792	7,63 10 ⁻⁵ ; 4,662 10⁻⁶ et 7,32	-1,84 10 ⁻⁵ et 0,43	7,75	5,85 10 ⁻⁸ , 0,171 cm ; 1,092 10⁻⁶ dont Abs : 0,016 10 ⁻⁶ ; et 98,65		
Soufre (solide) = 95,02% ³² S (0) +0,75 ³³ S (3/2) +4,21% ³⁴ S (0) +0,02% ³⁶ S (0)	32,066 ; 2,05 et 25,97	16 et 0,616	16,34 ; 17,723 10⁻⁶ et 0,629	0,5513 ; 1,847 10 ⁻⁶ ; 54,17 µm ; 0,598 10⁻⁶ ; 89,95 et 0,094	6,726 10 ⁻⁶ et 0,227 10 ⁻⁶	0,210° et 0,0298	2,847 10 ⁻⁵ ; 1,096 10⁻⁶ et 1,0186	1,5 10 ⁻⁵ (³³ S) et 0,007	1,026	2,07 10 ⁻¹⁰ , 48,367 cm ; 0,091 10⁻⁶ dont Abs : 0 ; et 0,53		

Bibliographie Ch. IV

- Advincula, R. C., W. J. Brittain, et al. (2004). Polymer brushes, Wiley Online Library.
- Anariba, F., S. H. DuVall, et al. (2003). "Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy "Scratching"." Analytical Chemistry **75**(15): 3837-3844.
- Ausserré, D. and M.-P. Valignat (2006). "Wide-field optical imaging of surface nanostructures." Nano letters **6**(7): 1384-1388.
- Axelrod, D., D. E. Koppel, et al. (1976). "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics." Biophysical Journal **16**(9): 1055-1069.
- Badia, A., L. Cuccia, et al. (1997). "Structure and Dynamics in Alkanethiolate Monolayers Self-Assembled on Gold Nanoparticles: A DSC, FT-IR, and Deuterium NMR Study." Journal of the American Chemical Society **119**(11): 2682-2692.
- Budvytyte, R., G. Valincius, et al. (2013). "Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules." Langmuir **29**(27): 8645-8656.
- Haldar, S. and A. Chattopadhyay (2013). Application of NBD-labeled lipids in membrane and cell biology. Fluorescent Methods to Study Biological Membranes, Springer: 37-50.
- Hertrich, S., F. Stetter, et al. (2014). "Highly Hydrated Deformable Polyethylene Glycol-Tethered Lipid Bilayers." Langmuir **30**(31): 9442-9447.
- Hetzer, M., S. Heinz, et al. (1998). "Asymmetric Molecular Friction in Supported Phospholipid Bilayers Revealed by NMR Measurements of Lipid Diffusion." Langmuir **14**(5): 982-984.
- Hinge, M., M. Ceccato, et al. (2009). "Electrochemical modification of chromium surfaces using 4-nitro- and 4-fluorobenzenediazonium salts." New Journal of Chemistry **33**(12): 2405-2408.
- Leroux, Y. R., H. Fei, et al. (2010). "Efficient Covalent Modification of a Carbon Surface: Use of a Silyl Protecting Group To Form an Active Monolayer." Journal of the American Chemical Society **132**(40): 14039-14041.
- McGillivray, D. J., G. Valincius, et al. (2007). "Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes." Biointerphases **2**(1): 21-33.
- Mohamad, S., O. Noel, et al. (2012). "Mechanism of Lipid Nanodrop Spreading in a Case of Asymmetric Wetting." Physical Review Letters **109**(24).
- Oleson, T. A., N. Sahai, et al. (2012). "Neutron reflectivity study of substrate surface chemistry effects on supported phospholipid bilayer formation on sapphire." Journal of Colloid and Interface Science **370**(1): 192-200.

- Przybylo, M., J. Sýkora, et al. (2006). "Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions." Langmuir **22**(22): 9096-9099.
- Ratto, T. V. and M. L. Longo (2002). "Obstructed Diffusion in Phase-Separated Supported Lipid Bilayers: A Combined Atomic Force Microscopy and Fluorescence Recovery after Photobleaching Approach." Biophysical Journal **83**(6): 3380-3392.
- Ratto, T. V. and M. L. Longo (2003). "Anomalous Subdiffusion in Heterogeneous Lipid Bilayers†." Langmuir **19**(5): 1788-1793.
- Soumpasis, D. (1983). "Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments." Biophysical Journal **41**(1): 95-97.
- Tamm, L. K. and H. M. McConnell (1985). "Supported phospholipid bilayers." Biophysical Journal **47**(1): 105-113.
- Valincius, G., T. Meškauskas, et al. (2011). "Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes." Langmuir **28**(1): 977-990.
- Yang, J. and J. Appleyard (2000). "The Main Phase Transition of Mica-Supported Phosphatidylcholine Membranes." The Journal of Physical Chemistry B **104**(34): 8097-8100.
- Zhang, L. and S. Granick (2005). "Lipid diffusion compared in outer and inner leaflets of planar supported bilayers." Journal of Chemical Physics **123**(21): 211104.
- Advincula, R. C., W. J. Brittain, et al. (2004). Polymer brushes, Wiley Online Library.
- Anariba, F., S. H. DuVall, et al. (2003). "Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy "Scratching"." Analytical Chemistry **75**(15): 3837-3844.
- Ausserré, D. and M.-P. Valignat (2006). "Wide-field optical imaging of surface nanostructures." Nano letters **6**(7): 1384-1388.
- Axelrod, D., D. E. Koppel, et al. (1976). "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics." Biophysical Journal **16**(9): 1055-1069.
- Badia, A., L. Cuccia, et al. (1997). "Structure and Dynamics in Alkanethiolate Monolayers Self-Assembled on Gold Nanoparticles: A DSC, FT-IR, and Deuterium NMR Study." Journal of the American Chemical Society **119**(11): 2682-2692.
- Budvytyte, R., G. Valincius, et al. (2013). "Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules." Langmuir **29**(27): 8645-8656.
- Haldar, S. and A. Chattopadhyay (2013). Application of NBD-labeled lipids in membrane and cell biology. Fluorescent Methods to Study Biological Membranes, Springer: 37-50.

- Hertrich, S., F. Stetter, et al. (2014). "Highly Hydrated Deformable Polyethylene Glycol-Tethered Lipid Bilayers." Langmuir **30**(31): 9442-9447.
- Hetzer, M., S. Heinz, et al. (1998). "Asymmetric Molecular Friction in Supported Phospholipid Bilayers Revealed by NMR Measurements of Lipid Diffusion." Langmuir **14**(5): 982-984.
- Hinge, M., M. Ceccato, et al. (2009). "Electrochemical modification of chromium surfaces using 4-nitro- and 4-fluorobenzenediazonium salts." New Journal of Chemistry **33**(12): 2405-2408.
- Leroux, Y. R., H. Fei, et al. (2010). "Efficient Covalent Modification of a Carbon Surface: Use of a Silyl Protecting Group To Form an Active Monolayer." Journal of the American Chemical Society **132**(40): 14039-14041.
- McGillivray, D. J., G. Valincius, et al. (2007). "Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes." Biointerphases **2**(1): 21-33.
- Mohamad, S., O. Noel, et al. (2012). "Mechanism of Lipid Nanodrop Spreading in a Case of Asymmetric Wetting." Physical Review Letters **109**(24).
- Oleson, T. A., N. Sahai, et al. (2012). "Neutron reflectivity study of substrate surface chemistry effects on supported phospholipid bilayer formation on sapphire." Journal of Colloid and Interface Science **370**(1): 192-200.
- Przybylo, M., J. Sýkora, et al. (2006). "Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions." Langmuir **22**(22): 9096-9099.
- Ratto, T. V. and M. L. Longo (2002). "Obstructed Diffusion in Phase-Separated Supported Lipid Bilayers: A Combined Atomic Force Microscopy and Fluorescence Recovery after Photobleaching Approach." Biophysical Journal **83**(6): 3380-3392.
- Ratto, T. V. and M. L. Longo (2003). "Anomalous Subdiffusion in Heterogeneous Lipid Bilayers[†]." Langmuir **19**(5): 1788-1793.
- Soumpasis, D. (1983). "Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments." Biophysical Journal **41**(1): 95-97.
- Tamm, L. K. and H. M. McConnell (1985). "Supported phospholipid bilayers." Biophysical Journal **47**(1): 105-113.
- Valincius, G., T. Meškauskas, et al. (2011). "Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes." Langmuir **28**(1): 977-990.
- Yang, J. and J. Appleyard (2000). "The Main Phase Transition of Mica-Supported Phosphatidylcholine Membranes." The Journal of Physical Chemistry B **104**(34): 8097-8100.
- Zhang, L. and S. Granick (2005). "Lipid diffusion compared in outer and inner leaflets of planar supported bilayers." Journal of Chemical Physics **123**(21): 211104.

- A.k.Kulkarni, L.C.Chang, "Electrical and structural characteristics of chromium thin films deposited on glass and alumina substrates", Thin Solid Films, 1997, **301**, p.17-22.
- G.J.Chassaing, M.L.Sigrist, "Etude de la conductibilite electrique de couche minces de chrome prepares par evaporation thernmique.", Thin Solid Films, 1973, **16**, p.37-47.
- MD.Julkarnain, J.Hossain, K.S.Sharif, K.A.Khan, "Temperature effect on the electrical properties of chromium oxide (Cr_2O_3) thin films", Journal Of Optoelectronics and Advanced Materials, 2011, **13**, p.485-490.

Conclusions et perspectives

Les bicouches lipidiques constituent le squelette des membranes biologiques et l'environnement bidimensionnel de leurs protéines. De par la complexité des membranes naturelles, de nombreux modèles biomimétiques sont développés afin d'étudier les processus d'adhésion et d'interaction cellulaire, de transduction de signal ou encore pour déterminer les mécanismes de régulation des canaux ioniques et autres protéines transmembranaires. Les efforts se tournent vers l'amélioration de ces modèles pour s'approcher toujours plus de l'état naturelle des membranes et pour ouvrir la voie à de nouvelles techniques d'étude. Le modèle de la bicouche ancrée sur une interface solide/liquide semble être très approprié dans ce rôle et réunit science fondamentale et appliquée. Dans ce modèle, la bicouche lipidique est maintenue éloignée du substrat et reste fluide grâce à une fonctionnalisation hydrophile qui permet l'hydratation des deux feuillets. La localisation de la membrane proche de l'interface facilite son étude d'un point de vue technique. L'obtention d'un volume aqueux entre la membrane et le support est particulièrement intéressante pour étudier le transport, autour ou à travers la membrane (ions, présence de défauts, pores, ...), et permet dans certains cas de conserver la fonction des protéines membranaires et transmembranaires intégrées.

Ce travail de thèse s'est axé sur le développement d'une stratégie de fonctionnalisation d'ancrage rapide, peu coûteuse et versatile, permettant la formation d'une membrane biomimétique fluide sur des substrats spécifiquement conçus pour son étude structurale et dynamique (électrode transparente de chrome élaborée). La chimie de surface que nous avons proposée commence par une pré-fonctionnalisation organique possible sur tout conducteur (semi-conducteurs, oxydes, etc), avec peu ou pas d'apport de rugosité. Ce processus se fait par la réduction électrochimique de sels d'aryldiazonium à partir de l'acide sulfanilique, pour obtenir une couche organique de type Métal-Ar-SO₃H, qu'un traitement chimique transforme ensuite en Métal-Ar-SO₂Cl. Les groupements SO₂Cl très réactif vis-à-vis des nucléophiles comme les amines (-NH₂) ou les hydroxyles (-OH), sont pré-requis pour la fonctionnalisation qui se poursuit par la formation du coussin récepteur de la membrane. Pour celui-ci, nous avons utilisé des molécules commerciales amphiphiles (Brij58), en leur attribuant le rôle de système ancre-harpon, associées à du polyéthylène glycol (PEO) pour obtenir une interface hydrophile. La recherche d'un modèle biomimétique sans nécessité de passer par la réalisation en laboratoire d'une nouvelle molécule est l'un des objectifs atteints de ce travail. Les Brij et PEO, ainsi qu'une grande variété de polymères amphiphiles, possèdent un groupement -OH peu réactif en extrémité hydrophile (coté ancre du Brij), que nous avons engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec la première couche organique électrogreffée (Ar-SO₂Cl). Ceci permet de créer une

liaison covalente très forte entre le coussin et le substrat. L'autre extrémité hydrophobe (l'harpon du Brij) peut s'insérer dans la membrane et la stabiliser.

Ce système a été étudié en solution, tout particulièrement, à travers la technique de spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), ainsi que la résonance plasmonique de surface (SPR) et la microbalance à cristal de quartz (QCM). D'autres techniques (RX, AFM, Angle de contact) ont été utilisées en complément mais pour un aspect plus qualitatif puisque le système était cette fois à l'air, donc séché et la membrane déstructurée. Les résultats de ces travaux ont démontré une bonne fonctionnalisation des électrodes (or et chrome) même oxydés et de rugosités différentes, avec une densité élevée de la monocouche de pré-fonctionnalisation, plus épaisse pour les molécules ancre-harpon, mais suffisante pour apporter l'hydratation nécessaire à l'interface et maintenir une membrane.

La modification chimique de l'électrode nue change drastiquement l'angle de contact et les propriétés physiques de l'interface (grande différence entre la capacité de double couche du chrome oxydé et pré-fonctionnalisé ; diminution de sa résistance d'interface, etc...). L'effet sur l'angle de contact des fonctionnalisations en différentes proportions de Brij58 (par rapport au PEO) est aussi très visuel. Ces différences de densités se reflètent également sur les mesures EIS par une nette évolution de la résistance d'interface, à condition que les mesures aient été menées sur une couche métallique très peu rugueuse. Pour les pré-fonctionnalisations Ar-SO₃H et Ar-SO₂Cl des constantes diélectriques ont pu être approchées grâce à la capacité de double couche du métal mesurée et des hypothèses soutenues par les autres techniques d'observation. Il peut en être de même pour les fonctionnalisations avec PEO et Brij58 sur-greffées. Les rayons X (RX) et la microscopie à force atomique (AFM) ont montré le faible apport de rugosité de ces fonctionnalisations, un point important pour pouvoir étudier une bicouche unique de 4 nm par la suite.

Après contact des surfaces fonctionnalisées avec une solution de vésicules de DOPC, la dynamique des ions face à la membrane a démontré que la bicouche formée présente des défauts (pores, domaines de substrat nu,...) puisqu'elle est traversée par des courants de fuite que nous caractérisons. Elle possède une forte capacité et ces résultats EIS sont en bon accord avec le modèle de Valincius intégrant des pores dans une membrane. Nous avons de plus exploré une gamme élargie de fréquences par rapport aux premiers travaux de référence sur membrane unique harponnée mais surtout démontré la complémentarité du mode faradique et non-faradique en utilisant une sonde électrochimique sur les fonctionnalisations de base. Les cinétiques d'adsorption de membrane sur nos différentes surfaces ont montré plusieurs schémas possibles et juxtaposables de sa structure mésoscopique : bicouche lipidique unique, vésicules intactes en interaction avec la surface, zones avec seconde bicouche incomplète et/ou des vésicules stabilisées par la présence du sel sur la première bicouche complète. La complémentarité des techniques QCM (sensible à la masse d'eau

renfermée dans une vésicule) et de la SPR (moins sensible à la différence entre une bicouche et une vésicule) a permis de montrer qu'une bicouche lipidique pouvait être immobilisée seule ou avec des vésicules si une marge d'erreur (pouvant aller jusqu'à 60%) était observée entre les deux techniques. Les angles de contact et la topographie des images AFM ont montré que les surfaces fonctionnalisées ayant été au contact des vésicules sont plus hydrophobes et présentent de la membrane séchée et déstructurée par zones de monocouches, tri-couches, ou d'empilements pyramidaux. Tous ces résultats convergent bien vers l'efficacité de la fonctionnalisation de surface par des Brij58 et PEO pour l'immobilisation de membrane sur un support. Il est aussi possible que des phospholipides isolés ou partiellement associés pénètrent dans la couche de fonctionnalisation sous la bicouche.

La structure fine de la membrane en solution pourra être identifiée de façon plus concrète lors de l'utilisation des rayonnements neutrons en pleine immersion, ce qui est prévu pour un temps de faisceau alloué sur un réflectomètre. C'est dans le cadre du couplage entre techniques de caractérisation structurales et suivi de la dynamique des espèces ioniques (EIS,...) que notre modèle biomimétique s'inscrit. Des couches minces de chrome déposées sur silicium ayant montré une bonne conduction, la bicouche pourra être ancrée sur ces substrats et caractérisée en neutrons, et par d'autres techniques (EIS, SPR ou QCM) sans changer de support.

Nous pouvons retenir d'autres points forts de la stratégie de fonctionnalisation développée sur substrats plans de chrome. Un dépôt de chrome mince, conducteur et transparent allie, possibilités de fonctionnaliser sous champ (cas de notre système) et d'utiliser la microscopie de fluorescence via le substrat, comme le FRAP, pour suivre la fluidité de la membrane formée (comme l'ont montré les premières expériences). D'autre part, l'utilisation du chrome mince est un atout intéressant pour l'étude structurale de notre système. En effet, à épaisseur comparable, une couche d'or apporte un contraste de densité électronique bien plus élevé aux rayons x, masquant bien souvent la structure fine des fonctionnalisations organiques minces ou membranes au contact. En neutronique, l'or peut être utilisé mais très mince et il faut souvent déposer dessous une couche d'ancrage pour qu'il tienne sous champ. Certains avantages et inconvénients sont sommairement présentés dans un tableau à la suite. D'autres métaux, même oxydables, pour élaborer l'électrode pourraient être étudiés. Enfin, notre chimie de surface ouvre des perspectives de fonctionnalisations variées, au vu de la grande diversité des molécules ancre-harpon commerciales pouvant réagir avec la fonction $-SO_2Cl$ (C_iE_j , AKYPO, Pluronic, etc) et de la variété de ces molécules au sein d'une même classe (brins hydrophiles et lipophiles en toutes proportions). Ainsi notre système de membrane ancrée pourrait être étudié avec d'autres Brij pour voir l'effet de la longueur de ces ancres sur la formation, les défauts, la fluidité de la membrane. Ce système de membrane ancrée sur support conducteur avec des liens ancre-harpon covalents bien plus résistants aux champs électrique que les fonctions

thiolates souvent engagées, ouvre également la voie vers des applications biotechnologiques nombreuses et importantes (biocapteurs, etc, ...).

Tableau 1 : Utilisation de divers supports pour l'étude des membranes uniques

Substrat	Electrochimie	Microscopie Optique via le substrat / via solvant	Réflectivité X sur membrane	Réflectivité neutrons sur membrane via substrat	Absence de pollution (largage) ou d' oxydation (stabilité) dans l'eau	Rugosité, Microscopie AFM
Substrat Verre ou Quartz	---	+++ / ++ (R(90°)~20%) / polluant	Lame : ++ Lamelle : +	Lame : - Lamelle : --	++ / +++	++
Verre/ITO	+++	++ / +	-	-	+ / +	+
Substrat Quartz épais	---	+ / ++	++	++	++ / +++	++
Substrat Cr épais	+++	---	--	---	++ / +	--
Couche mince Cr (transparent)	++	+ / +	+	--	++ / -	+
Couche ultra-mince Cr (transparent)	+	++ / +	++	-	++ / --	++
Couche mince Au (semi-transparent)	-- ++ si ancré par 1 à 2 nm Cr ou Ti	+ / + + / - si ancré par 1 à 2 nm Cr ou Ti	-- -- si ancré par 1 à 2 nm Cr ou Ti	---	++ / +++	+
Couche ultra-mince Au (transparent)	--- + si ancré par Cr ou Ti	++ / + ++ / - si ancré par 1 à 2 nm Cr ou Ti	+ - si ancré par 1 à 2 nm Cr ou Ti	- -- si ancré par 1 à 2 nm Cr ou Ti	++ / ++	++
Substrat Si (non dopé)	---	--- / +	+++	+++	+++ / +	+++
Substrat Si (dopé)	-	--- / +	+++	+++ Dopé P (sans Bore ou --- avec)	+++ / +	+++

Thèse de Doctorat

Ophélie SQUILLACE

Membranes biomimétiques fluides ancrées sur électrodes ultra-planes

Fluid biomimetic membranes tethered on ultra plan electrodes

Résumé

Les bicouches lipidiques constituent l'architecture socle des membranes biologiques et l'environnement bidimensionnel de leurs protéines. Supportées et ancrées sur une interface hydrophile hydratée, ces systèmes biomimétiques conservent leur fluidité et sont localisés durablement près d'un substrat. Dans ce domaine, nous avons développé une stratégie de fonctionnalisation rapide, peu coûteuse et versatile, permettant la formation d'une membrane biomimétique fluide, ancrée sur des substrats spécifiquement conçus pour son étude structurale et dynamique. La chimie de surface proposée commence par une pré-fonctionnalisation organique possible sur tout conducteur, sans apport de rugosité et se poursuit par la formation du coussin récepteur de la membrane. Pour celui-ci, nous utilisons des molécules commerciales amphiphiles (Brij, etc), en leur attribuant le rôle de système ancre-harpon. La plupart de ces molécules possèdent un alcool primaire peu réactif en extrémité hydrophile (coté ancre), que nous engageons avec la première couche organique par substitution nucléophile. Ceci permet de créer une liaison covalente forte avec le substrat. L'autre extrémité hydrophobe (l'harpon) peut s'insérer dans la membrane et la stabiliser. Un mélange adapté, de ces molécules ancre-harpon avec des molécules purement hydrophiles (PEG, etc), apporte l'hydratation et la densité d'ancres nécessaire à l'interface pour maintenir la membrane fluide éloignée du substrat. Ces quelques nanomètres de distance permettent l'intégration de protéines et le transport ionique à travers la membrane. Grâce au support conducteur, la dynamique des ions face aux membranes peut être étudiée par spectroscopie d'impédance électrochimique. De faible rugosité et semi-transparent ce support permet l'utilisation de nombreuses autres techniques dont les microscopies optiques, exaltées ou de fluorescence. Localisées sur une électrode, ces bicouches ancrées s'ouvrent également aux applications biotechnologiques.

Mots clés

**Bicouches lipidiques supportées et ancrée;
Fonctionnalisation de surface ; Impédance
électrochimique d'interface ; Couches minces**

Abstract

Lipid bilayers are the structural backbone of biological membranes and provide a two-dimensional environment for proteins. Tethered on a hydrophilic substrate, these biomimetic models are fluid, long-term stable and localized. In this regard, we propose a direct, cheap and versatile strategy of surface functionalization to tether membranes on a substrate adapted to their structural and dynamics study. The process is based on the functionalization of any flat metal thin film by the covalent binding of commercial surfactant molecules (Brij, ...) as "anchor-harpoons"-like systems. Most of these molecules possess unresponsive -OH terminated groups on their hydrophilic moiety (anchor) that can bind a first organic layer by nucleophilic substitution. The opposite hydrophobic tail (harpoon) of the molecule can insert into the membrane and make it stable. An ideal mixing ratio of anchor-harpoons molecules with purely hydrophilic ones (PEG, ...), provides the required hydration and density of anchors to the interface for tethering fluid membranes away from the substrate. A few nanometers distance enable ionic flows through the membrane and protein inclusion. The substrate conductivity enables studying ion dynamics facing the membrane by means of electrochemical impedance spectroscopy. Flatness and semi-transparency of the conductor opens the route to many other techniques' including exalted light microscopy or fluorescence. Localized on electrodes, tethered bilayers further provide a biomimetic model and a support for biotechnology applications.

Key Words

**Tethered lipid bilayers ; Surface functionalization ;
Interfacial electrochemical impedance ; Thin films**