



HAL
open science

Conception, caractérisation et application de glyconanoparticules en (bio)électrochimie

Marie Carrière

► **To cite this version:**

Marie Carrière. Conception, caractérisation et application de glyconanoparticules en (bio)électrochimie. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV005 . tel-03917129

HAL Id: tel-03917129

<https://theses.hal.science/tel-03917129v1>

Submitted on 1 Jan 2023

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Physique Moléculaire et Structurale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Marie CARRIERE

Thèse dirigée par **Karine GORGY, Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes**

codirigée par **Serge COSNIER, Directeur de Recherches, CNRS-Université Grenoble Alpes**

codirigée par **Redouane BORSALI, Directeur de Recherches, CNRS-Université Grenoble Alpes**

préparée au sein du Département de Chimie Moléculaire et au Centre de Recherches sur les MACromécules Végétales

dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV)

Conception, caractérisation et application de glyconanoparticules en (bio)électrochimie

Thèse soutenue le « 25 janvier 2021 », devant le jury composé de :

Mme, Nicole, JAFFREZIC-RENAULT

Directrice de Recherches CNRS, Université Claude Bernard, (Rapporteur)

Mme, Sophie, TINGRY

Directrice de Recherches CNRS, Université de Montpellier, (Rapporteur)

Mme, Frédérique LOISEAU

Professeur, Université Grenoble Alpes, (Présidente du jury)

Mr, Hubert, PERROT

Directeur de Recherches, CNRS Université Sorbonne, (Examinateur)

Mr, Serge, COSNIER

Directeur de Recherches, CNRS, Université Grenoble Alpes, (Membre)

Mr, Redouane, BORSALI Directeur de Recherches CNRS

Université Grenoble Alpes, (Membre)

Mme, Karine, GORGY

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes, (Membre)



Remerciements

Ces travaux de thèse ont été menés dans deux laboratoires, le Département de Chimie Moléculaire (DCM) dans l'équipe Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques (BEA) et au sein du Centre de Recherche sur les MACromolécules Végétales (CERMAV) dans l'équipe Auto-assemblage des Glycopolymères (PCG). Je remercie le Docteur Serge Cosnier et le Docteur Anne Imberty, directeurs des laboratoires respectifs, de m'avoir accueillie et permis de travailler dans d'excellentes conditions pendant ces trois années. Ce doctorat a été financé par le work-package 3 de Glyco@Alps, organisme pluridisciplinaire dont le thème principal est l'utilisation de sucres en sciences, qui m'a également permis de participer à de nombreux événements, telle que la fête de la science, ou encore différents congrès en organisant des séminaires nationaux et internationaux à l'Université Grenoble Alpes.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ces travaux de thèse, et qui ont accepté de se déplacer malgré les circonstances difficiles. Je remercie le professeur Frédérique Loiseau, d'avoir accepté d'examiner et de juger ces travaux, mais également d'avoir présidé mon jury de thèse. Je remercie également mes deux rapporteurs, les docteurs Nicole Jaffrezic-Renault et Sophie Tingry, d'avoir accepté d'étudier mon manuscrit et pour les échanges constructifs lors de la soutenance. Je tiens également à remercier le docteur Hubert Perrot d'avoir examiné mes recherches et pour les remarques pertinentes soulevées. Je remercie mes directeurs de thèse, Serge Cosnier, Karine Gorgy et Redouane Borsali pour toute l'aide apportée lors de ces trois années (et trois mois...), autant sur le plan scientifique que personnel. Je tiens par ailleurs à remercier Laurent Dessemond et Elodie Bidal, pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner à l'IUT de mesures physiques, pour la confiance et le soutien apporté pendant deux ans.

Je tiens maintenant à remercier tous les membres du CERMAV avec qui j'ai pu interagir, notamment l'équipe PCG, en particulier, Rubal (ma petite perruche), Olivia, Sophie, Charlène, Cornélia, Enriquer, Yoko, Patricia, Robin, Hong Li, Shun, Noémie, Monica, Mumtaz et Christophe. Un merci particulier pour Justine avec qui j'ai passé deux mois confinés, et on ne s'est pas disputés ! (on oublie l'histoire de la pizza...). Merci aux autres membres non permanents du labo, Juliette, Fabien, Maeva, François, Vanina (merci pour les bons gâteaux !!), Simon (la fraîcheur), Raphaël, Maxime, Mouss et Aude. Enfin je remercie Christine pour sa disponibilité et son aide, et avec qui j'ai passé de bons moments (bien drôles) dans la salle du MEB.

J'ai eu l'opportunité de commencer les stages très tôt lors de mes études, et de poursuivre en thèse dans mon labo favori. Le DCM est un peu devenu ma deuxième maison, et l'équipe BEA ma deuxième famille. Cela a été un immense privilège de travailler avec vous, dans une ambiance chaleureuse, avec des personnes motivées et scientifiquement très compétentes. Je

remercie en particulier Karine et Serge pour leur soutien sans faille dans les moments difficiles que j'ai pu traverser, et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Vous avez été présents pour moi quand il fallait, su trouver les mots pour m'aider et m'avez soutenue jusqu'au bout pour finir cette thèse en beauté. Merci infiniment pour tout le temps et le travail que vous avez dû investir pour moi.

Je remercie également Alan, avec qui j'ai pu commencer l'aventure il y a plusieurs années, et avec qui je continue encore un petit moment ! Merci à Chantal, pour ta bonne humeur, ton sourire et ton accent chantant. Merci Arielle et Yannig, d'être toujours disponible pour aider (et pour discuter !). Enfin, merci à Michael, Fabien et Andrew, pour toutes les discussions (professionnelles ou non) que l'on a pu avoir.

Je remercie Solène Gentil, pour m'avoir fait rejoindre ce labo lors d'un stage en L2, pour m'avoir fait découvrir le domaine de la recherche et notamment l'électrochimie. On en a passé des bons moments (et des moins bons ^^), que ce soit à la musique, au lac de Grésy, au labo... Tu t'es toujours occupée de moi, soucieuse de moi et je ne t'ai jamais assez remercié. Merci également à Bertrand Reuillard, avec qui j'ai pu travailler lors de mon arrivée au DCM, et qui m'a aidé par la suite notamment pour mes recherches de stages à l'étranger. Merci également à Caro, ce fut un très grand plaisir de faire ta connaissance, d'aller acheter des tests d'ovulation avec toi, de bricoler et faire la cuisine. Merci au reste de la troupe, avec qui on a pu partager de nombreux repas et de nombreuses mousses, Quentin, Marie B, Jules, Pierre-Yves et Chen. J'exprime toute ma gratitude à Deborah et Ana, vous m'avez tant aidé... J'ai eu tellement de chance de vous rencontrer et de vous avoir à mes côtés en toutes circonstances. Je vous aime énormément, vous avez su m'aider à remonter la pente, me redonner le sourire, me faire rire... Merci infiniment ! Merci à Paulo, pour ton aide avec les papiers, je te souhaite bon courage pour la suite de ce sujet pas du tout prise de tête... Merci à Umberto (le voleur de potentiostat), Monica, et à la relève des thésards Isaac et Bastien, bon courage à vous ! J'espère n'avoir oublié personne dans cette liste, mais merci à tous pour ces trois ans, la thèse aurait été beaucoup moins fun (voir même invivable) sans vous !

Je tiens maintenant à remercier mes amis et ma famille. Un grand merci à Aurélien, notre relation est particulière mais je sais que je pourrai toujours compter sur toi. Tu m'as énormément aidé malgré tout ce qu'on a pu traverser, tu ne m'as jamais abandonnée et je t'en serai toujours reconnaissante. Tu es la personne qui me comprend le mieux, et tu as toujours cru en moi, merci =)

Merci à Nico, une belle rencontre, merci pour ta bonne humeur toujours au rendez-vous, tes conseils d'experts et ton humour incroyable ^^.

Merci à Olivia, Loulou, Enrique et Alberto, pour tous les moments passés ensemble, pour nos petites sorties et nos petites vacances sous les palmiers de Grignon city.

Je tenais à remercier mon frère et ma sœur, mes plus fidèles protecteurs, de m'avoir toujours soutenue. Je suis la plus chanceuse d'avoir un frère et une sœur comme vous, on partage tellement de choses, et je vous aime tellement. Enfin, merci à mes parents. On a eu des hauts et des bas, mais c'est sur une belle note harmonieuse que finit la thèse. Je suis contente et fière que vous soyez mes vrais parents, je vous aime de tout mon cœur.

Sommaire général

Liste des abréviations	1
Introduction générale.....	6
Chapitre I – Etude bibliographique	10
Chapitre II – Assemblage, fonctionnalisation et caractérisations physico-chimique et électrochimique de glyconanoparticules à base de polystyrène- <i>bloc</i> - β -cyclodextrine (PSCD) et d’anthraquinone	64
Chapitre III – Assemblage, fonctionnalisation et caractérisations physico-chimique et électrochimique de glyconanoparticules à base de polystyrène- <i>bloc</i> - β -cyclodextrine et de polystyrène- <i>bloc</i> -maltoheptaose (PSMH) suivie de la fonctionnalisation par l’anthraquinone sulfonate	94
Chapitre IV – Composés rédox à base de viologène : électrochimie en solution et par immobilisation sur support conducteur. Vers la conception de glyconanoparticules à base de viologène	120
Chapitre V – Utilisation des glyconanoparticules pour la réalisation de biocapteurs et de biopiles	150
Conclusion Générale - Perspectives	172
Experimental section	176
Résumé – Abstract	197

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)
Ad	Adamantane
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ad-V ²⁺	Adamantane-viologène
AFM	Microscopie à force atomique
AQ	Anthraquinone
AQS	Anthraquinone sulfonate
ATRP	polymérisation radicalaire par transfert d'atomes
BCP	copolymère à blocs
BOD	Bilirubine oxydase
C	Concentration
CD	Cyclodextrine
CDP	film de polymères de cyclodextrines
CV	Voltampérométrie cyclique
D	coefficient de diffusion
DCM	dichloromethane
DET	Transfert d'électron direct
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMF	N,N-Diméthylformamide
e ⁻	électron
E _{1/2}	Potentiel de demi-pic
ECS	Electrode au calomel saturée
EDT	Electrode à disque tournant
EIS	spectroscopie d'impédance électrochimique
E _p	Potentiel de pic
E _{pa}	Potentiel de pic anodique
E _{pc}	Potentiel de pic cathodique
F	Constante de Faraday
FAD	flavine adénine dinucléotide
FAD-GDH	glucose déhydrogénase dépendante de la flavine adénine dinucléotide
FET	Transistor à effet de champ
FT-IR	infrarouge à transformée de Fourier
GCE	Electrode de carbone vitreux
GNP	Glyconanoparticule
GNP _{PSCD}	Glyconanoparticules à base de PSCD
GNP _{PSCD10}	Glyconanoparticules à base de 10 % de PSCD
GNP _{PSCD50}	Glyconanoparticules à base de 50 % de PSCD
GNP _{PSMH}	Glyconanoparticules à base de PSMH
GOx	Glucose oxydase
GPC	chromatographie à perméation de gel
I	Intensité diffusée
i _p	Courant de pic
i _{pa}	Courant de pic anodique
i _{pc}	Courant de pic cathodique

ISE	Eléctrode sélective à ions
J_{\max}	Densité de courant maximale
K	Constante de complexation
K_B	constante de Boltzmann
L	Ligand
Lac	Laccase
MCO	Multi-copper oxidase
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Transfert d'électron indirect
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MH	Maltoheptaose
Mn	Masse molaire moyenne en nombre
MWCNT	Nanotubes de carbone multi-parois
n	indice de réfraction de l'eau
NHS	N-hydroxysuccinimide
NTA	Analyse du suivi individuel des particules
NTA	Acide nitrilotriacétique
NTC	nanotubes de carbone
Ox	Oxydant
PAL	marquage par photoaffinité
PPy	poly-pyrrole
PQ	phénanthrènequinone
PS	Polystyrène
PSCD	Polystyrène- <i>bloc</i> - β -cyclodextrine
PSMH	Polystyrène- <i>bloc</i> -maltoheptaose
PV ²⁺	Pyrène-Viologène
q	vecteur d'onde
Q	Charge
Q_a	Charge anodique
Q_c	Charge cathodique
QDs	quantums dots
r.t.	room temperature
RA	Rugosité
RAFT	polymérisation par l'utilisation d'agents de fragmentation réversible
Red	Réducteur
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROP	polymérisation par ouverture de cycle
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
S	Substrat
S	surface de l'électrode
SEC	size exclusion chromatography
SEM	Microscope électronique à balayage
SLS	Diffusion statique de la lumière
SWCNT	Nanotubes de carbone mono-parois
T	Température
TEA	triméthylamine
TEM	Microscope électronique à transmission

THF	Tétrahydrofurane
Tz	tétrazines
US	Ultra-sons
ΔE_p	Différence de potentiel entre les pics anodique et cathodique
η	viscosité du milieu d'étude
θ	Angle d'observation en diffusion
λ	Longueur d'onde
ν	Vitesse de balayage en potentiel
τ	temps de relaxation
Γ	Concentration surfacique

Introduction générale

L'électrochimie et la bioélectrochimie sont des domaines de recherche qui continuent de se développer rapidement, du fait de leur utilisation dans des secteurs variés tels que l'énergie, l'environnement et le médical. La pérennité des sociétés savantes telles que la BES « BioElectrochemical Society » ou le GFB « Groupe Français de Bioélectrochimie » créées respectivement en 1979 et 1986, reflètent bien le vif intérêt de la communauté scientifique porté à la bioélectrochimie. Les recherches développées, se situant à l'interface entre la chimie, la biologie et la physique permettent de mieux comprendre les interactions physico-chimiques entre différents partenaires biologiques, les mécanismes de transferts d'électrons mis en jeu entre eux et/ou avec l'électrode. De nombreux travaux portent sur l'ingénierie de surface avec l'assemblage de molécules sur des électrodes, la conception de nouvelles méthodes d'immobilisation et d'orientation de protéines rédox à la surface de l'électrode, l'utilisation de microélectrodes ou de surfaces structurées ou encore la synthèse de modèles biomimétiques d'enzymes ou de mutants d'enzymes. Parmi les domaines d'application variés, deux d'entre eux se dégagent avec, notamment le développement de biopiles utilisant des catalyseurs de nature biologique et la conception de biocapteurs pour le diagnostic rapide de molécules d'intérêt. Ces deux exemples sont mis en exergue par l'actualité ; il est en effet primordial de développer des dispositifs analytiques efficaces et rapides pour la détection à grande échelle de virus ou d'anticorps par exemple, ou encore de mettre au point des alternatives de production d'énergie en remplaçant les catalyseurs rares et coûteux, comme le platine, utilisés actuellement dans les piles à combustibles. De plus, afin d'augmenter les performances analytiques des biopiles et des biocapteurs, des nano-objets choisis en fonction de l'application visée, peuvent être intégrés dans la conception de ces dispositifs électrochimiques. Les nanotubes de carbone, le graphène ou encore les particules métalliques comme les particules d'or ont déjà montré leur efficacité. Ce n'est que récemment, que des particules à base de cyclodextrine et de polystyrène ont été intégrées avec succès dans la conception de biopiles enzymatiques. C'est dans ce contexte que ma thèse, réalisée conjointement au Département de Chimie Moléculaire (DCM) et au Centre de Recherches sur les MACromolécules Végétales (CERMAV) s'inscrit. Ma thèse s'insère dans le projet IDEX Glyco@alps de l'université Grenoble Alpes qui met, quant à lui, en valeur les sucres pour une utilisation dans divers domaines comme la conception de matériaux ou le diagnostic médical par exemple.

L'objectif de ma thèse est donc de concevoir différentes glyconanoparticules modifiées ou non par des groupements rédox, de déterminer leur morphologie, leur taille, d'évaluer leurs propriétés rédox et leurs capacités à être utilisées en bioélectrochimie.

Ainsi, afin de mieux positionner le sujet de thèse, le premier chapitre bibliographique traite de façon générale les différents aspects abordés dans ce travail expérimental avec notamment quelques rappels sur les biocapteurs, les biopiles, les copolymères à bloc amphiphiles, la

description de leur méthode d'assemblage en solution ainsi que la présentation de différentes méthodes de caractérisation des nanomatériaux en solution ou en phase supportée.

La suite du manuscrit est articulée autour de deux axes principaux qui concernent tout d'abord l'auto-assemblage de glyconanoparticules (GNPs) rédox obtenues par précipitation à partir de deux copolymères amphiphiles ou de mélange de copolymères : le polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine (PSCD) et le polystyrène-*bloc*-maltoheptaose (PSMH), la cyclodextrine ayant des propriétés d'inclusion, ainsi que la détermination de leur morphologie, de leur dimension et la présentation de leurs propriétés électrochimiques tant en solution qu'immobilisées sur support conducteur. Les GNPs obtenues successivement avec l'antraquinone, l'antraquinone sulfonate et des dérivés du viologène possédant des groupements adamantane et pyrène constituent les chapitres II, III et IV de ce manuscrit, les méthodes d'obtention des GNPs pouvant différer selon la nature des molécules rédox.

Le deuxième axe de la thèse exploré, qui est présenté dans le chapitre V, est l'utilisation des glyconanoparticules en bioélectrochimie pour la réalisation de biocathodes enzymatiques pour la réduction électrocatalytique du dioxygène et pour la conception de biocapteurs enzymatiques à glucose, ce dernier étant choisi comme preuve de concept.

Enfin, le dernier chapitre est consacré à la partie expérimentale.

Chapitre I

Etude bibliographique

Sommaire

I. Introduction.....	13
II. Les biopiles : quelques généralités	13
II.1. Les biopiles microbiennes	14
II.2. Les biopiles à mitochondrie.....	14
II.3. Les biopiles enzymatiques.....	14
II.4. Les biopiles hybrides	16
III. Les biocapteurs : quelques généralités	17
III. 1. Biocapteurs métaboliques	18
III.2. Biocapteurs d'affinité.....	19
III.3. Les biocapteurs électrochimiques	19
III.3.1. Les biocapteurs ampérométriques	19
III.3.2. Les biocapteurs potentiométriques.....	21
III.3.3. Biocapteurs impédancemétriques.....	21
IV. Immobilisation des entités biologiques sur électrode	22
IV.1. Physisorption ou adsorption.....	22
IV.2. La réticulation	22
IV.3. Le piégeage	23
IV.4. Par liaison covalente	23
IV.5. Assemblages supramoléculaires	25
V. Les cyclodextrines.....	26
V.1. Généralités.....	26
V.2. Propriétés physico-chimiques.....	28
V.3. Immobilisation de cyclodextrines à la surface d'électrodes.....	30
V.4. Utilisation des complexes hôtes-invités à base de cyclodextrines dans les biocapteurs à glucose	31
VI. Les nanomatériaux et leurs insertions dans des dispositifs électrochimiques.....	34
VI.1. Généralités sur les nanomatériaux	34
VI.2. L'intégration des nanomatériaux dans les biocapteurs et les biopiles	36

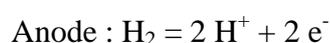
VI.3. Cas particulier des nanotubes de carbone	38
V.3.1. Généralités	38
V.3.2. Fonctionnalisations covalentes	39
V.3.3. Fonctionnalisations non covalentes	40
VII. Les polymères	41
VI.1. Généralités	41
VI.2. Les copolymères à blocs	41
VI.3. Auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles	43
VI.3.1. Fonctionnalisation de micelles à base de BCPs de PSCD	45
VI.3.2. Utilisation des glyconanoparticules à base de BCPs de PSCD en électrochimie et bioélectrochimie	45
VIII. Les différentes techniques de caractérisation des nanomatériaux	46
VIII.1. Microscopie électronique à balayage	46
VIII.2. Microscopie électronique à transmission	47
VIII.3. Techniques de diffusion de la lumière	48
VII.3.1. Diffusion statique de la lumière (SLS)	49
VII.3.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	50
VII.3.3. Suivi individuel de particules (Nanoparticle tracking analysis : NTA).....	52
IX. Conclusion	53
Références	53

I. Introduction

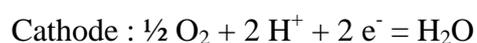
Cette étude bibliographique a été réalisée en fonction des chapitres expérimentaux et des perspectives de ce travail de thèse. Elle s'articule autour de 7 parties. Après avoir rappelé quelques notions sur les biopiles et les biocapteurs, différentes méthodes d'immobilisation d'entités biologiques à la surface d'électrodes seront présentées dans la conception de ces deux dispositifs. La partie suivante est dédiée à la présentation des cyclodextrines en introduisant tout d'abord quelques généralités puis en donnant quelques exemples de matériaux d'électrodes mettant en jeu les cyclodextrines. Après avoir introduit de façon sommaire les nanomatériaux, une description de ceux-ci dans la réalisation de biocapteurs et de biopiles a été réalisée. Puis, quelques définitions sur les copolymères à blocs seront données, suivies des techniques d'auto-assemblage de ces copolymères pour former différents types de structures. Quelques exemples concernant l'utilisation des copolymères à blocs à base de sucre comme bloc hydrophile et de polystyrène comme bloc hydrophobe en électrochimie et en bioélectrochimie seront décrits. Pour finir, la dernière partie est consacrée à la description de différentes techniques de caractérisation permettant l'étude des nanomatériaux, dont notamment les nano-objets formés par l'auto-assemblage des copolymères à blocs.

II. Les biopiles : quelques généralités

Les biopiles sont des dispositifs électrochimiques qui produisent de l'énergie électrique à partir de l'énergie chimique produites par des entités biologiques ¹. Elles sont composées d'une anode où se produit l'oxydation d'un combustible et d'une cathode où se réduit le comburant. Les électrons libérés par l'anode sont consommés par la cathode produisant ainsi un courant électrique. Le combustible peut-être de nature différente tel que le glucose, le dihydrogène, les alcools alors que le comburant utilisé est essentiellement le dioxygène. Les réactions aux électrodes sont catalysées par des entités biologiques, contrairement aux piles à combustibles classiques pour lesquelles les réactions sont catalysées par des métaux. Le mode de fonctionnement des piles à combustibles a été premièrement décrit en 1839 par Schönbein et Grove ^{2,3}. Elles sont composées de deux électrodes catalytiques avec une anode qui oxyde le combustible, comme le dihydrogène ou des alcools, et la cathode qui catalyse la réduction du dioxygène généralement. Le système initialement décrit concernait les piles à combustible dihydrogène-dioxygène (H₂/O₂), avec les demi-réactions à chaque électrode sont présentées ci-dessous :



$$E^0(\text{H}^+/\text{H}_2) = 0 \text{ V/ESH}$$



$$E^0(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 1,229 \text{ V/ESH}$$

Les biopiles à combustible sont caractérisées par :

- La différence de potentiel entre les deux électrodes, soit le voltage de la pile.
- La densité de courant générée par l'électrode limitante.
- La densité de puissance qui est le produit de la tension et de la densité de courant pour une tension donnée

Ces paramètres permettent de caractériser la pile. Les puissances atteintes actuellement avec les biopiles ne permettent pas d'alimenter des dispositifs à haute demande énergétique. Celles-ci sont destinées à remplacer les piles « classiques » et les batteries alimentant des appareils à faible consommation. Les biopiles pourraient être utilisées pour alimenter des dispositifs à faible consommation tels que les dispositifs électroniques portatifs (téléphone portable, lecteur de musique portable), des biocapteurs ou encore des dispositifs médicaux implantables (capteurs à glucose, stimulateur cardiaque consommant en continu 10 à 40 μW ⁴). En fonction des entités biologiques, les biopiles peuvent être séparées en plusieurs catégories.

II.1. Les biopiles microbiennes

Découvertes en 1911 par Potter⁵, les biopiles microbiennes sont des dispositifs produisant de l'électricité suite à la dégradation de molécules organiques et à la réduction du dioxygène par des levures ou des bactéries fixées sur les électrodes grâce à la génération d'un biofilm. Ces biopiles ont une durée de vie assez longue mais la taille des électrodes est importante et les puissances récoltées sont relativement faibles⁶.

II.2. Les biopiles à mitochondrie

Les biopiles à mitochondrie utilisent un organe entier comme catalyseur^{7,8}. Les mitochondries proviennent des cellules eucaryotes et contiennent de nombreuses enzymes et coenzymes capables d'oxyder de nombreux substrats organiques. La stabilité de ces biopiles est plus faible que celle des biopiles microbiennes. En effet, les mitochondries ne peuvent pas se reproduire, contrairement aux bactéries.

II.3. Les biopiles enzymatiques

Les biopiles enzymatiques sont composées d'enzymes de la classe des oxydoréductases, capables de réaliser les réactions de réduction à la biocathode ou d'oxydation à la bioanode pour convertir l'énergie chimique en énergie électrique^{9,10}. En fonction de l'application désirée, différents substrats et différentes enzymes sont utilisés. Dans une majorité des

biopiles, le glucose ou le dihydrogène sont utilisés à la bioanode, et le dioxygène à la biocathode. En pratique, les biopiles enzymatiques à glucose/O₂ pourraient être intégrées dans des dispositifs médicaux implantables tels que les pacemakers, tandis que les biopiles H₂/O₂ seraient destinées à remplacer les piles à combustible classiques pour alimenter des petits dispositifs nomades. Les transferts d'électrons entre les électrodes et les enzymes sont facilités, les enzymes étant beaucoup plus petites que les bactéries ou les mitochondries, ne nécessitant pas la création d'un biofilm et n'ayant pas de membrane cellulaire. De plus, les enzymes sont spécifiques de leur substrat, ce qui permet l'abolition de la membrane séparatrice entre les deux bioélectrodes. La Figure 1 présente le principe d'une biopile enzymatique avec l'immobilisation d'enzymes à l'anode et à la cathode.

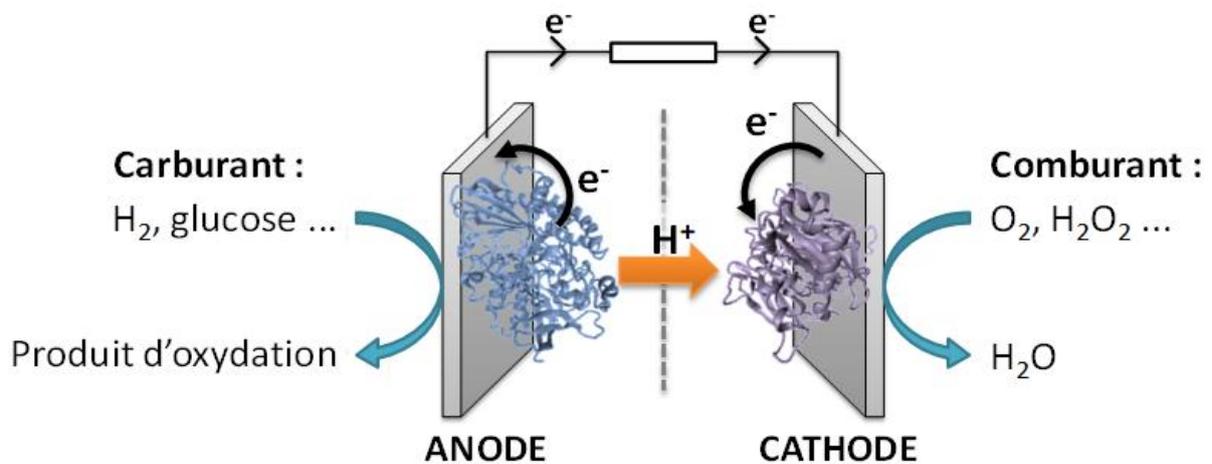


Figure 1 : Principe de fonctionnement d'une biopile enzymatique.

Deux types de transfert d'électrons existent entre les enzymes et les électrodes : le transfert d'électrons direct (direct electron transfert, DET) et le transfert d'électrons médié (mediated electron transfert, MET), Figure 2. Dans le premier cas (Figure 2A), les électrons sont directement transférés du site actif de l'enzyme à l'électrode, alors que pour le MET (Figure 2B), il existe des relais d'électrons entre le site actif et l'électrode. Ce processus de relais est très fréquent, notamment dans la famille des enzymes à plusieurs centres de cuivre (multi-copper oxidase, MCO) comme la laccase (Lac) ou la bilirubine oxydase (BOD) qui sont des enzymes très utilisées à la cathode pour la réduction du dioxygène¹¹⁻¹³.

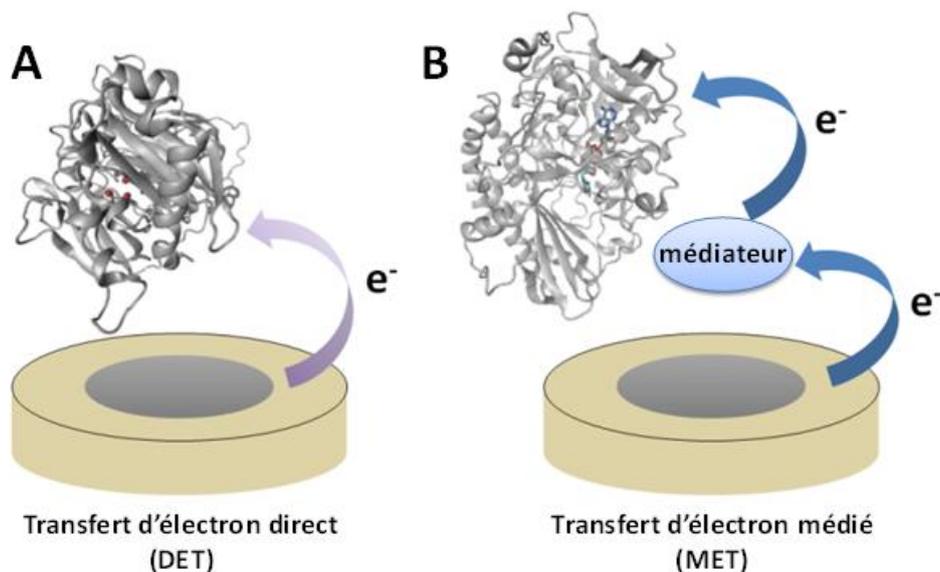


Figure 2 : Représentation schématique (A) d'un transfert d'électron direct (DET) et (B) d'un transfert d'électron indirect ou médié (MET) entre une enzyme et la surface d'une électrode.

Les transferts d'électrons directs peuvent être favorisés par l'orientation du site actif des enzymes le plus proche possible des électrodes ¹⁴. Pour cela, des stratégies d'immobilisation des enzymes ont été décrites avec notamment l'utilisation de molécules chargées en surface, comme des groupements naphthoate ^{15,16}, la modification covalente d'un site spécifique de l'enzyme ¹⁷, ou encore par interaction entre la poche hydrophobe de l'enzyme et une surface modifiée par des molécules hydrophobes. Lorsque le site actif est situé trop loin de l'électrode, l'utilisation de médiateurs, peut être nécessaire. Un des médiateurs le plus utilisé à la cathode est le 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) ou ABTS, que ce soit pour connecter la laccase ¹⁸ ou la BOD ¹⁹. Grâce à ces stratégies d'immobilisation et connexion d'enzymes, les biopiles enzymatiques ont ainsi des densités de puissances qui peuvent attendre quelques $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ^{11,20}.

II.4. Les biopiles hybrides

Les biopiles hybrides sont constituées de l'association d'une demi-pile utilisant un système abiotique, tels qu'un catalyseur métallique ou bio-inspiré, et d'une autre demi-pile utilisant une enzyme. La durée de vie et la stabilité de ces biopiles est augmentée comparé aux biopiles enzymatiques, car il va être possible de travailler dans les conditions de pH ou température optimum de l'enzyme. Ainsi, Gentil *et al.* présentent une pile hybride H₂/air utilisant une enzyme, la bilirubine oxydase (BOD), à la biocathode et un catalyseur biomimétique de nickel à la bioanode ²¹. Cette pile a permis la génération d'une densité de puissance de l'ordre de 2 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$.

III. Les biocapteurs : quelques généralités

De nos jours, les biocapteurs sont utilisés dans de nombreux domaines tels que l'environnement^{22,23}, le domaine agroalimentaire²⁴, ou pour des applications biomédicales avec la détection de cellules cancéreuses par exemple²⁵ ou encore la détection d'anticorps ou d'antigènes²⁶. Les biocapteurs sont des dispositifs d'analyse comportant un transducteur sur lequel sont immobilisées des molécules biologiques (Figure 3). Les molécules biologiques, qui vont reconnaître une molécule d'intérêt (analyte) dans le milieu d'analyse jouent le rôle de biorécepteur²⁷. Le transducteur, quant à lui, convertit le signal de reconnaissance entre le biorécepteur et l'analyte en un signal électrique mesurable et quantifiable.

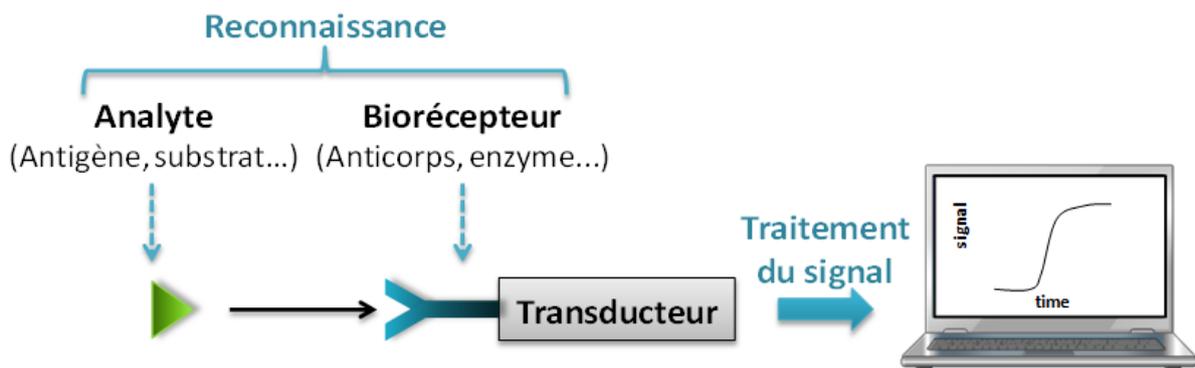


Figure 3 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Les caractéristiques d'un biocapteur concernent différents paramètres :

- La sélectivité, c'est-à-dire la capacité d'une molécule à reconnaître spécifiquement sa cible pour éviter les interactions non spécifiques et avoir un résultat fiable.
- Le seuil de détection, qui correspond à la concentration minimale d'analyte qui peut être décelée par le capteur. Cette valeur est déterminée lorsque le signal mesuré est trois fois supérieur au bruit de fond.
- Le domaine de linéarité, correspondant à la zone où le capteur a une réponse proportionnelle à la concentration d'analyte présent dans l'échantillon analysé. Ainsi, la concentration en analyte peut être déterminée à partir de la réponse du capteur, c'est-à-dire à partir de la courbe d'étalonnage.
- La sensibilité, qui est la valeur de la pente de la courbe d'étalonnage du domaine de linéarité.
- Le temps de réponse, ou le temps qu'il faut au capteur pour afficher une mesure après l'avoir mis au contact de l'échantillon à analyser, l'idéal étant d'avoir un temps de réponse rapide pour avoir une mesure en direct.
- Le cout de fabrication du capteur, est à prendre aussi en considération en vue de l'utilisation à grande échelle et dans le but d'une éventuelle commercialisation.

La transduction est dépendante du transducteur utilisé et peut-être optique, électrochimique, thermique ou encore photoélectrochimique mais seuls les biocapteurs électrochimiques seront détaillés dans ce chapitre bibliographique.

Sur le transducteur est immobilisé le biorécepteur qui peut être de nature différente et qui doit être choisi en fonction de l'analyte à détecter. Les biocapteurs peuvent être classés en deux grandes familles : les biocapteurs métaboliques et les biocapteurs d'affinité.

III. 1. Biocapteurs métaboliques

Les biocapteurs enzymatiques, aux côtés des biocapteurs à base de bactéries ou de cellules constituent la part la plus importante dans cette famille de biocapteurs. Historiquement, le premier concept de biocapteur catalytique a été proposé par Clark et Lyons en 1962, qui ont démontré qu'il était possible d'utiliser une électrode à oxygène de Clark comme transducteur sélectif pour la détection de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase ²⁸. Depuis, les capteurs à glucose sont très étudiés et servent souvent de modèle lors de la conception de nouvelles stratégies d'immobilisation de biorécepteurs en utilisant la glucose oxydase comme modèle et comme preuve de concept ²⁹⁻³³. De plus, les biocapteurs à glucose sont les capteurs les plus commercialisés, pour notamment la détection de glucose dans le liquide lacrymal ou dans le sang pour les personnes diabétiques ^{34,35}.

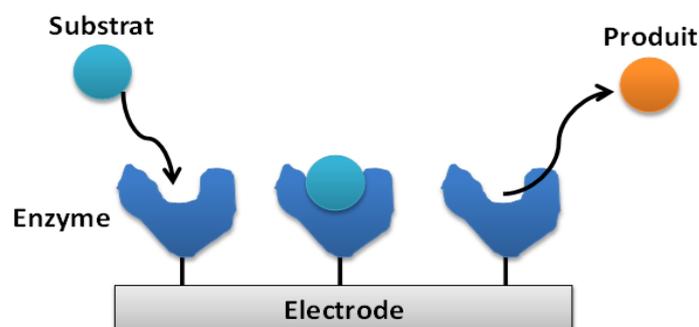


Figure 4 : Principe d'un biocapteur enzymatique de première génération.

Pour réaliser des biocapteurs enzymatiques, une enzyme qui a une activité catalytique est immobilisée à la surface du transducteur. Pendant le processus catalytique, le substrat de l'enzyme se lie de façon transitoire à l'enzyme pour former un complexe enzyme-substrat (Figure 4), ce qui permet sa transformation en produit. Ce phénomène, qui met en jeu une réaction chimique, permet la détection du substrat. A titre illustratif, l'enzyme, la glucose oxydase, en présence de glucose génère de façon équimolaire le peroxyde d'hydrogène qui peut être détecté et quantifié par voie électrochimique, ce qui permet de déterminer la concentration du glucose en solution.

III.2. Biocapteurs d'affinité

L'autre grande famille de biocapteur regroupe des biocapteurs à affinité qui utilisent des biorécepteurs ayant une grande affinité et la spécificité pour leurs ligands. Parmi les biorécepteurs utilisés, nous pouvons citer les anticorps qui vont reconnaître les antigènes, les brins d'ADN sonde immobilisés sur le transducteur qui vont s'associer de façon spécifique à d'autres brins d'ADN complémentaires ou encore les aptamères qui viennent reconnaître des molécules d'intérêt, Figure 5, en changeant de conformation.

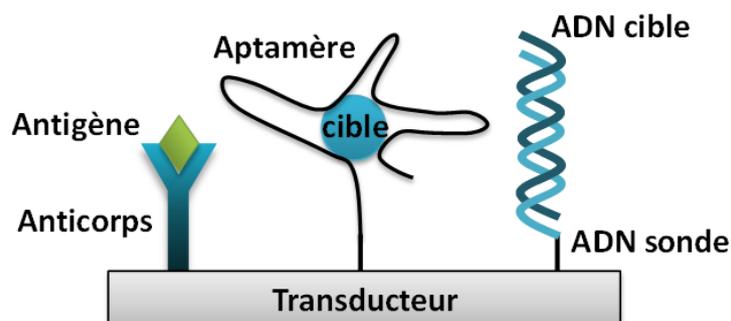


Figure 5 : Représentation schématique de différents systèmes de biocapteurs d'affinité.

Dans cette catégorie de biocapteurs, la reconnaissance biorécepteur-analyte engendre une modification physico-chimique du système qui sera traduite en un signal quantifiable. Le signal mesuré ne met plus en jeu la transformation de l'analyte en produit comme décrit précédemment dans le cas biocapteurs enzymatiques.

III.3. Les biocapteurs électrochimiques

Les biocapteurs électrochimiques, présentent l'avantage d'être faciles à mettre en œuvre et à utiliser, peu coûteux, et d'avoir un temps de réponse faible³⁶⁻³⁸. De plus, une quantité très faible de volume d'analyte, pouvant être de l'ordre du microlitre, peut suffire pour effectuer la mesure³⁹. Les limites de détections avec une transduction électrochimique sont très basses^{40,41}, et nécessitent peu ou pas de préparation de l'échantillon. De plus, les mesures peuvent être réalisées dans des échantillons turbides ou colorés, comme le sang, sans interférence avec les molécules colorées comme l'hémoglobine⁴². Les électrodes peuvent être facilement miniaturisées, notamment par l'utilisation de microélectrodes comme décrit dans la littérature avec des électrodes interdigitées^{43,44}. La fabrication d'instruments portables ou implantables devient alors possible grâce à cette miniaturisation, qui de plus peut se faire à bas coût⁴⁵. Les biocapteurs électrochimiques peuvent être classés en trois grandes familles listées ci-dessous.

III.3.1. Les biocapteurs ampérométriques

Parmi les biocapteurs ampérométriques, les biocapteurs enzymatiques constituent une part importante avec l'immobilisation d'enzymes à la surface d'électrodes ⁴⁶. Par définition, un biocapteur ampérométrique est basé sur la mesure d'un courant entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire en appliquant un potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Les biocapteurs ampérométriques mettent en jeu généralement des enzymes de la classe des oxydoréductases. Les biocapteurs enzymatiques sont très étudiés du fait de la grande sélectivité des enzymes envers leur substrat et de leur réponse rapide. On peut classer les biocapteurs ampérométriques en trois grandes catégories, représentées sur la Figure 6, selon les réactions électro-enzymatiques produites à la surface de l'électrode ^{47,48}.

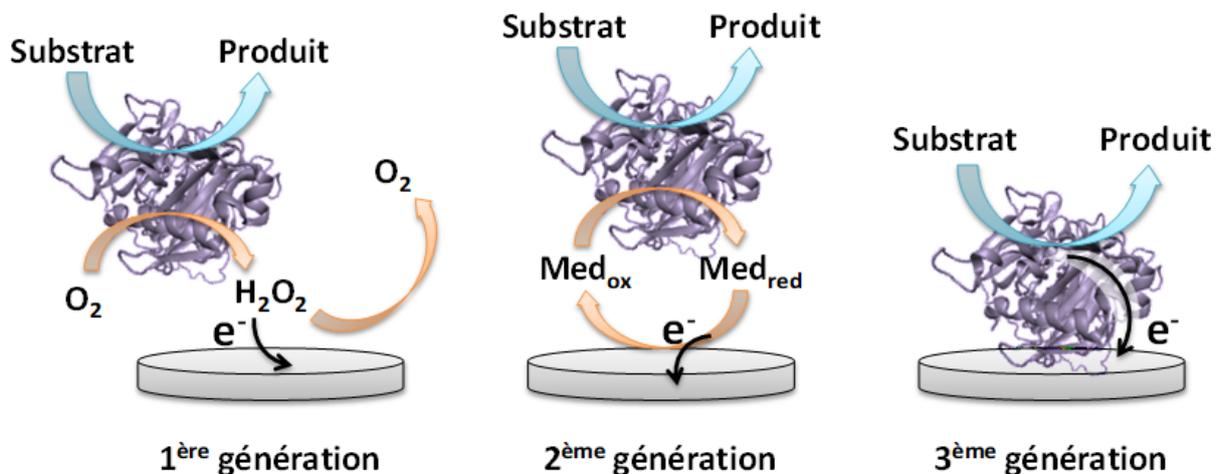


Figure 6 : Principe de fonctionnement des trois catégories de biocapteurs avec les capteurs à transfert électronique direct sans médiateur (1^{ère} et 3^{ème} générations) et indirect avec médiateur (2^{ème} génération).

Dans le premier cas, l'enzyme utilise un cofacteur pour transformer le substrat en produit, tout en générant du peroxyde d'hydrogène à partir de dioxygène en solution. La quantité de substrat consommée peut être déterminée en suivant la disparition d'oxygène ou l'apparition de peroxyde d'hydrogène. Cependant, la concentration en dioxygène est dépendante de la pression partielle en dioxygène, et le suivi de la formation du peroxyde d'hydrogène se faisant à haut potentiel, d'autres espèces sont oxydées en parallèle, faussant les mesures.

La deuxième génération de biocapteur ampérométrique consiste en l'utilisation d'un médiateur redox afin de limiter les problèmes d'interférence et faciliter les transferts d'électrons entre l'enzyme et l'électrode, ce qui permet d'augmenter les courants récoltés. Le potentiel redox de cette molécule doit être plus bas que le potentiel des espèces interférentes, et ses formes oxydées et réduites doivent être stables en solution. Le médiateur peut être libre en solution ou immobilisé sur l'électrode. Quelques inconvénients sont néanmoins relatifs à l'utilisation de médiateurs. En effet, ceux-ci doivent être stables, biocompatibles et avoir une

faible toxicité pour des applications dans le domaine médical ou implantable, de plus leur coût ne doit pas être trop élevé.

Une troisième génération de biocapteur a donc vu le jour, sans médiateur et avec un potentiel bas, plus proche du potentiel rédox de l'enzyme et une très grande sélectivité vis-à-vis du substrat. Ici, les électrons sont directement transférés à l'électrode depuis le site actif de l'enzyme. Le challenge pour ce type de biocapteur est de diminuer au maximum la distance entre le site actif des enzymes et la surface de l'électrode pour permettre un DET. En effet, très peu d'enzymes, telles que la peroxydase et la laccase et la tyrosinase, sont capables de réaliser de DET⁴⁹ avec des matériaux d'électrode convenablement choisis. Par ailleurs, des systèmes mettant en jeu plusieurs enzymes peuvent être utilisés, comme par exemple en couplant la GOx et la peroxydase⁵⁰. Le développement de ces capteurs passe également par l'utilisation de nanomatériaux.

III.3.2. Les biocapteurs potentiométriques

Ils sont basés sur la mesure de différence de potentiel entre l'électrode de travail, sur laquelle est immobilisé le biorécepteur, et l'électrode de référence. Une électrode sélective aux ions ammonium a été la première fois décrite, en immobilisant à la surface de l'électrode de travail l'uréase dans un gel. La présence d'urée dans le milieu d'analyse induit la formation d'ion ammonium⁵¹. Pour réaliser ce type de capteurs potentiométriques, les transducteurs majoritairement utilisés sont des électrodes sélectives à ions (ISE) ou des transistors à effet de champ (FET-Field-Effect Transistor). En utilisant des électrodes sélectives à ions, des biocapteurs potentiométriques ont permis la détection d'ions métalliques, d'ADN, de protéines ou encore de bactéries⁵².

III.3.3. Biocapteurs impédancemétriques

Depuis ces vingt dernières années, les biocapteurs impédancemétriques se sont révélés être des outils performants pour la détection de molécules d'intérêts puisque cette technique ne nécessite pas de marquage de la molécule d'intérêt, ni de la biomolécule immobilisée. La spectroscopie d'impédance électrochimique (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) évalue l'impédance d'un matériau suite à l'exposition de celui-ci à une faible stimulation électrique, de la tension ou du courant en mode alternatif sinusoïdal, sur une gamme de fréquences. La loi d'Ohm permet de mesurer l'impédance grâce au rapport tension/courant. Les propriétés de résistance et capacité des matériaux peuvent alors être déterminées, et permettent de tracer des courbes d'étalonnage⁵³⁻⁵⁵.

IV. Immobilisation des entités biologiques sur électrode

Comme nous avons pu le constater dans les parties précédentes, la réalisation de biocapteurs et de biopiles nécessite généralement l'immobilisation de la biomolécule à la surface de l'électrode. Cette immobilisation qui doit être reproductible est une étape importante dans la construction d'édifices moléculaires puisqu'elle doit permettre de conserver l'activité catalytique de l'enzyme, d'orienter au mieux l'enzyme de façon à favoriser les transferts électroniques ou les propriétés de reconnaissance dans le cas d'immobilisation d'un anticorps ou de protéines par exemple. Depuis l'apparition des biocapteurs et des biopiles, de nombreuses stratégies d'immobilisation ont été développées (Figure 7) avec notamment l'immobilisation par adsorption ou physisorption, par réticulation, par piégeage, par liaison covalente ou encore par interaction affine avec la matrice d'immobilisation.

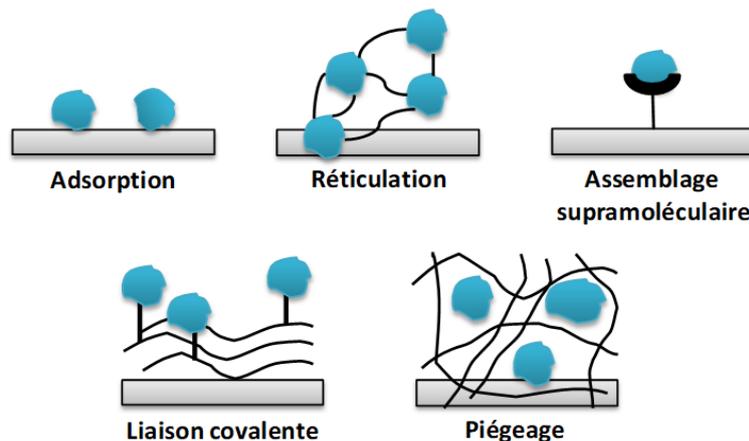


Figure 7 : Représentation des différents types d'immobilisation de biomolécules en surface d'électrodes.

IV.1. Physisorption ou adsorption

Un des avantages principaux de l'adsorption du biorécepteur à la surface du transducteur, qui repose sur des interactions électrostatiques ou hydrophobes avec le matériau, est la simplicité de mise en œuvre. Les inconvénients reportés sont d'une part la difficulté de contrôle de l'orientation du biorécepteur avec par exemple un site catalytique peu accessible pour des enzymes par exemple et d'autre part la stabilité dans le temps du dépôt puisque des phénomènes de désorption sont observés au cours du temps.

IV.2. La réticulation

Après adsorption des biomolécules sur support, la réticulation de biomolécules s'effectue en utilisant un agent de couplage qui réagit avec les fonctions amines des biomolécules et la fonction chimique présente sur l'agent réticulant. Le glutaraldéhyde par exemple ainsi que

d'autres agents de couplage portant des fonctions esters ou époxydes donne lieu à la formation d'agrégats insolubles à la surface du matériau. Le biomatériau ainsi formé est alors beaucoup plus stable dans le temps que celui formé par simple adsorption. En revanche l'utilisation d'agents réticulants peut réduire fortement de l'activité catalytique de l'enzyme par exemple due à la modification structurale de l'enzyme.

IV.3. Le piégeage

Cette stratégie d'immobilisation consiste à piéger la biomolécule au sein d'une structure tridimensionnelle formée par l'utilisation d'une vaste panoplie de matériaux. A titre d'illustration, les biopolymères (tel que le chitosan), des matrices inorganiques biocompatibles (argiles, hydroxydes doubles lamellaires), les polymères de synthèses (tels que le nafion) ou encore les polymères conducteurs (comme le polypyrrole, le polythiophène, polyaniline) se sont montrés efficaces pour l'immobilisation d'entités biologiques. Dans le dernier exemple, les polymères peuvent être générés par voie chimique par l'utilisation d'un oxydant chimique ou par voie électrochimique. Depuis les premiers travaux pionniers reportés dans les années 1960 qui reportent l'immobilisation de la glucose oxydase dans un film de polymère, l'utilisation des polymères est reconnue pour être une méthode efficace et simple à mettre en oeuvre. Elle consiste à mélanger l'entité biologique et le monomère et à réaliser un dépôt de ce mélange à la surface de l'électrode. L'électropolymérisation à potentiel constant permet de piéger la biomolécule à l'intérieur de la matrice polymère insoluble qui vient se déposer à la surface de l'électrode. L'électrochimie est une méthode de choix pour contrôler l'épaisseur du dépôt à la surface de l'électrode. Une épaisseur trop importante de polymère à la surface du transducteur peut entraîner un effet bloquant vis-à-vis du substrat pouvant ainsi diminuer les performances des dispositifs analytiques. La substitution du monomère permet également de moduler les propriétés de celui-ci ainsi que celui du dépôt obtenu par électrogénération.

IV.4. Par liaison covalente

Une autre stratégie d'immobilisation est de créer une liaison covalente de la biomolécule avec le matériau en utilisant la réactivité de certaines fonctions naturelles de l'entité biologique avec la molécule (Figure 8). Cette technique est très avantageuse car elle permet d'élaborer un dispositif simple et ne nécessite pas forcément la modification des molécules biologiques. A titre d'illustration, les groupements amines des molécules biologiques peuvent être utilisés pour réagir avec les fonctions esters activés ou acide pour former un lien acetylhydroxylamine. Les réactions entre les thiols et les groupements maléimide ou les groupements iodoacétyl permettant la formation de liaison thioéther sont mises à profit pour

immobiliser les entités biologiques. Cette méthode présente cependant l'inconvénient de ne pas contrôler la position du greffage covalent ce qui peut induire une orientation non favorable pour le site actif de l'enzyme ou le site de reconnaissance pour un anticorps par exemple. Afin de subvenir à ce problème et selon les applications envisagées, la modification des enzymes par des groupements fonctionnels tels que par des groupements azido pouvant réagir avec un alcyne en présence de cuivre ou encore des réactions de Diels-Alder peuvent constituer une alternative et permettre une meilleure orientation de la biomolécule à la surface de l'électrode.

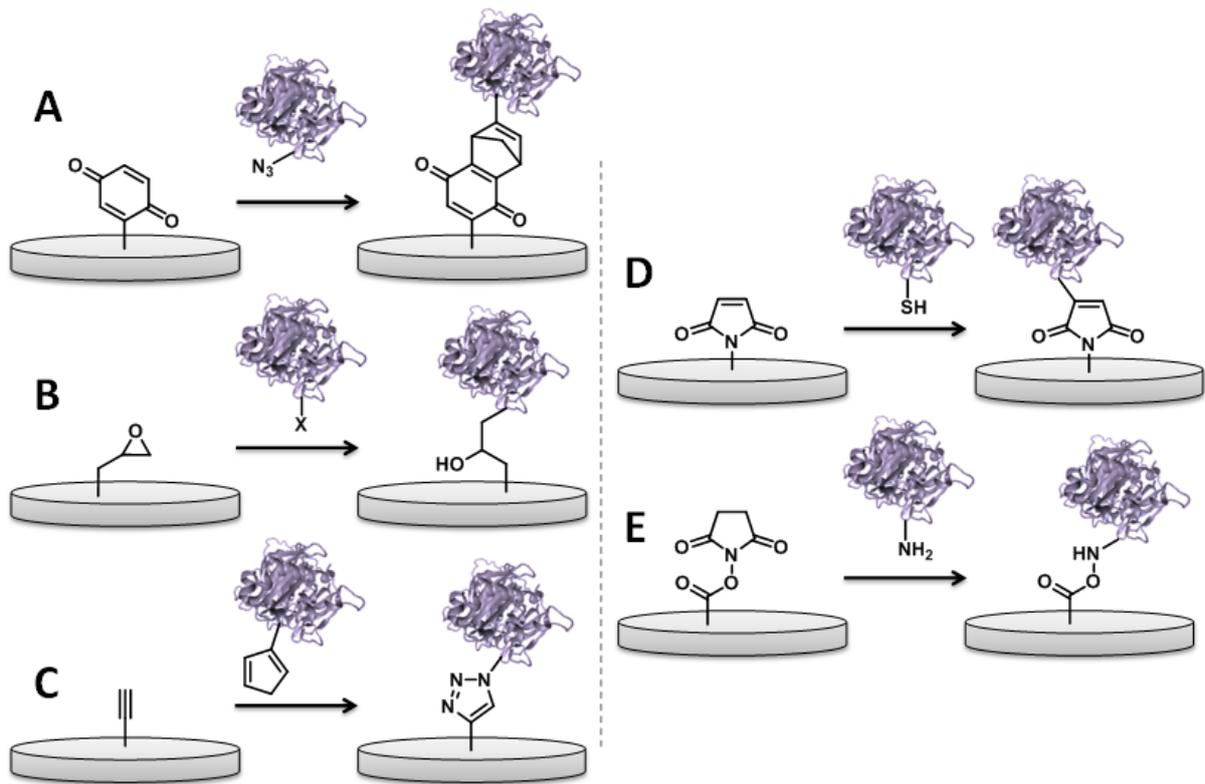


Figure 8 : Représentations schématiques de différents types d'immobilisations covalentes de biomolécules en surfaces d'électrodes. (A) Réaction de Diels-Alder entre un accepteur porté par la surface et un donneur porté par la biomolécule. (B) Réaction entre un groupement époxy porté par la surface et un groupement nucléophile porté par la biomolécule. (C) Cycloaddition de Huisgen catalysée par du cuivre (réaction click) entre une surface présentant un alcyne et une biomolécule portant un groupement azido. (D) Réaction entre un résidu cystéine porté par la protéine et une fonction maléimide en surface. (E) Réaction entre un ester activé N-hydroxysuccinimide (NHS) et un groupement amine présenté par la biomolécule.

A côté de ces greffages covalents induits par une réaction chimique s'ajoute l'immobilisation de l'entité biologique par photogreffage. Cette technique permet d'effectuer une liaison covalente entre le matériau d'électrode et la biomolécule sous irradiation lumineuse⁵⁶. Cette stratégie d'immobilisation s'inspire de la technique de marquage par photoaffinité (Photo

Affinity Labeling, PAL) largement utilisée en biochimie pour étudier les interactions entre un composé de nature biologique et ses substrats. Les principaux groupements photoactivables tels que les fonctions benzophénone ou diazirine rapportés dans la littérature génèrent toutes, sous irradiation lumineuse, des formes très réactives telles que les carbènes, des carbocations. Les radicaux ainsi formés permettent de créer une liaison covalente avec la molécule biologique. A titre d'illustration, les groupements benzophénone et diazirine ont permis le photogreffage de la glucose oxydase ²⁹ ou de la phosphatase alcaline ⁵⁷, ces enzymes étant choisies pour prouver le concept.

IV.5. Assemblages supramoléculaires

Une autre stratégie permettant d'immobiliser les biomolécules de manière efficace est l'utilisation d'assemblages moléculaires pour immobiliser l'entité biologique. Quelques exemples sont présentés sur la Figure 9.

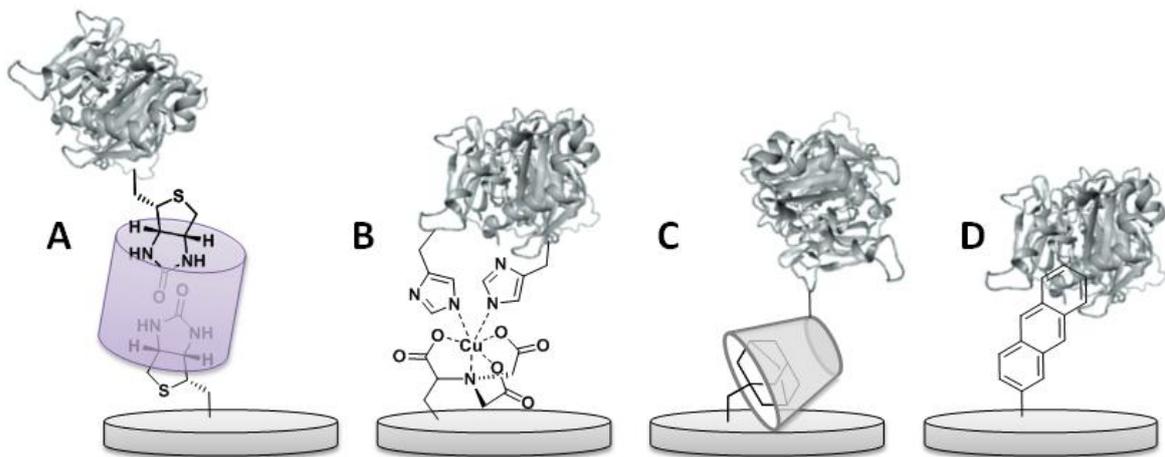


Figure 9 : Représentation schématique de plusieurs méthodes d'immobilisation non-covalentes de biomolécules en surface d'électrodes. (A) Interaction entre une biotine portée par la surface avec une avidine puis une biomolécule modifiée par une biotine. (B) Génération d'un complexe NTA/Cu(II)/histidines portées par une enzyme. (C) Formation d'un complexe hôte-invité adamantane/cyclodextrine. (D) Interaction entre la poche hydrophobe d'une enzyme et une surface modifiée par des groupements anthracène.

A titre d'exemple, nous pouvons citer les interactions fortes du type avidine-biotine avec une constante d'association élevée de l'ordre de 10^{15} ⁵⁸. Une autre méthode largement décrite dans la littérature est l'utilisation de liaisons de coordination entre le matériau d'immobilisation possédant des groupements nitrilotriacétique (NTA), qui après complexation avec des ions Cu^{2+} , permet l'immobilisation de molécules biologiques préalablement modifiées par des groupements biotine ⁵³ ou histidine ⁵⁹. Les interactions présentent l'avantage d'être spécifiques et de s'effectuer souvent à des pH autour de 7, n'altérant ainsi pas ou peu les

propriétés de la protéine. Des études ont également reporté l'utilisation de molécules hydrophobes, telle que des porphyrines ⁶⁰, des groupements naphthalène ⁶¹, des groupements adamantane ou l'anthraquinone ⁶², afin d'immobiliser et orienter des enzymes en interagissant avec leur poche hydrophobe. Une autre stratégie d'immobilisation consiste à utiliser les interactions hôtes-invités entre les cyclodextrines par exemple avec certains types de molécules comme par exemple l'adamantane ou la biotine qui possèdent respectivement des constantes d'association élevées de 10^5 L.mol^{-1} ⁶³ et $3.10^2 \text{ L.mol}^{-1}$ ⁶⁴. L'utilisation de la cyclodextrine pour générer des complexes d'inclusion en solution ou en phase supportée et pour réaliser des biocapteurs sera développée dans la partie suivante de ce chapitre.

V. Les cyclodextrines

V.1. Généralités

Les cyclodextrines ont été découvertes par le chimiste et pharmacien français Antoine Villiers en 1891. En février, il décrit dans les procédés de « l'Académie des Sciences » publié par le Bulletin de la Société Chimique de Paris la transformation de la fécule de pomme de terre en dextrines dans certaines conditions grâce au ferment butyrique produit par la bactérie *Bacillus amylobacter*. Dans ces travaux suivants, publiés en juin, il observe que durant la transformation de la fécule de pomme de terre, il se forme également des sous produits en très faible quantité, ayant une grande structure cristalline avec une composition intermédiaire entre celle de la fécule et celle des dextrines. Ces structures, ayant des similitudes avec la cellulose, sont nommées « cellulosine » par Villiers ⁶⁵. De 1905 à 1911, Schardinger décrit pour la première fois la préparation, séparation et purification des deux cellulosines décrite par Villiers, ainsi que leurs comportements en présence de différentes solutions (alcool, ether...) et leur capacité à former des complexes. Il propose de les nommer α -dextrine cristalline et β -dextrine cristalline. Schardinger fait aussi l'hypothèse que ces substances sont des « polysaccharides » cycliques, ce qui sera confirmé en 1936 par Freudenberg. Les recherches de Schardinger l'ont conduit à isoler le microorganisme responsable de la fabrication de l'enzyme (la cyclodextrine glucosyl transferase) catalysant la dégradation de la fécule en cyclodextrines, soit la bactérie *Bacillus macerans*, qui est encore de nos jours la source d'enzyme la plus fréquente pour la production de CDs. Le terme cyclodextrine est employé pour la première fois par Cramer à la fin des années 40, qui étudie leurs propriétés d'inclusion durant son doctorat sous la supervision de Freudenberg.

Grâce aux méthodes de productions et à leur faible coût de productions, les CDs font l'objet d'un intérêt croissant dans la recherche ou dans l'industrie. Elles sont de nos jours utilisées dans différents domaines tels que la production pharmaceutique, le domaine biomédical,

analytique et thérapeutique, l'agriculture (pesticides), le, alimentaire et cosmétiques, pouvant encapsuler des substances actives ou aromatiques, les protégeant de l'effet de la lumière ou de l'atmosphère, et pouvant être aisément conservées sous forme de poudre ^{66,67}.

Les cyclodextrines sont des macromolécules cycliques constituées de six (α), sept (β) (Figure 10A), huit (γ) ou plus d'unités glucopyranose. Ces unités sont reliées entre elles par des liaisons α -(1,4). La structure géométrique formée dans l'espace par la cyclodextrine de type β est celle d'un cône tronqué, Figure 10C, où les groupements hydroxyles secondaires, C-2-OH et C-3-OH, de chaque unité de glucose sont situés d'un côté de la partie extérieure du cône, les groupements hydroxyles primaires, C-6-OH, sont tous situés de l'autre côté, Figure 10B. Le diamètre de la cavité où sont situés les hydroxyles secondaires est plus large que le côté contenant les hydroxyles primaires, du fait de la libre rotation des liaisons des hydroxyles primaires. Les C-2-OH d'une unité glucopyranose peuvent former des liaisons hydrogène avec les C-3-OH de l'unité glucopyranose adjacente.

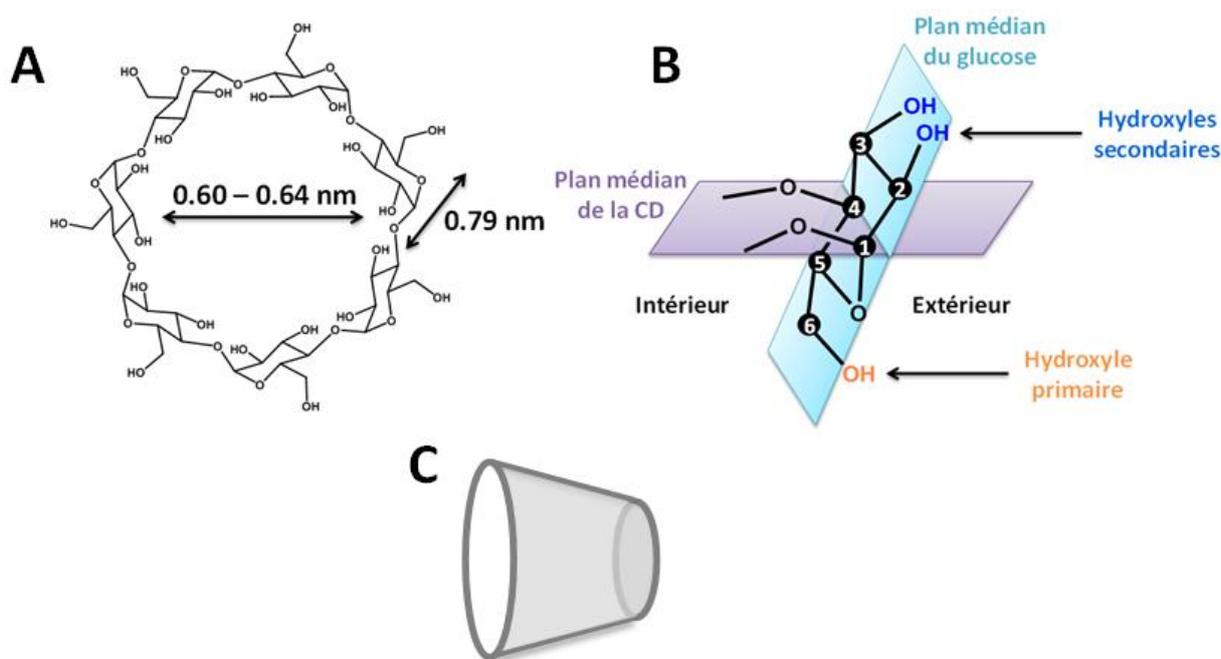


Figure 10 : Représentations schématiques de la cyclodextrine de type β .

Dans le cas de la β -CD, une structure secondaire complète est formée par ces liaisons hydrogène, lui conférant une structure plus rigide que les autres CD, et pouvant expliquer sa faible solubilité dans l'eau. Les cycles carbonés sont dans la partie interne de la cage. Une forte densité électronique à l'intérieur de la cavité est due aux électrons des doublets non liants des oxygènes formant les ponts glycosidiques, lui conférant les caractéristiques des bases de Lewis. Ainsi, les cônes possèdent une surface hydrophile et soluble dans l'eau, et une cavité hydrophobe ^{68,69}.

V.2. Propriétés physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques des CDs α , β et γ sont présentées dans le Tableau 1^{66,68-72}.

Tableau 1 : Principales propriétés physico-chimiques des cyclodextrines α , β et γ .

Propriétés physico-chimiques	α -CD	β -CD	γ -CD
Nombre d'unités de glucose	6	7	8
Masse moléculaire / g.mol ⁻¹	973	1135	1297
Diamètre interne / Å	4,7 - 5,2	6,0 - 6,4	7,5 - 8,3
Diamètre externe / Å	14,6 ± 0,4	15,4 ± 0,4	17,5 ± 0,4
pKa (25 °C)	12,33	12,20	12,08
Solubilité dans l'eau (25 °C) / mol.L ⁻¹	0,1211	0,0163	0,168
Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6	11	17

Du fait de leurs propriétés, les cyclodextrines sont utilisées pour former des assemblages supramoléculaires avec d'autres molécules ayant une taille adaptée et pouvant s'insérer dans la cavité grâce à différents types d'interactions hôte-invités en solution. Ainsi, des molécules peu solubles dans l'eau vont devenir plus solubles en présence de CDs. En solution aqueuse, des molécules d'eau sont contenues à l'intérieur des CDs. Cette situation est énergétiquement défavorable du fait d'interactions polaires-apolaires. De ce fait, la force motrice du processus d'inclusion va dépendre des forces de répulsion entre la cavité apolaire des CDs et les molécules d'eau situées dans celle-ci, et des forces de répulsion entre les invités apolaires et l'eau. Les molécules d'eau peuvent donc être substituées par des molécules moins polaires, comme le montre la Figure 11⁶⁶. La faisabilité et la stabilité du complexe vont dépendre de plusieurs facteurs qui sont listés ci-dessous :

- La libération des molécules d'eau contenues à l'intérieur de la cavité.
- Les interactions hydrophobes.
- Les interactions électrostatiques de type dipôle-dipôle.
- Les liaisons hydrogène.
- Les forces d'induction de type dipôle-dipôle induit.
- Les forces de dispersion de London.

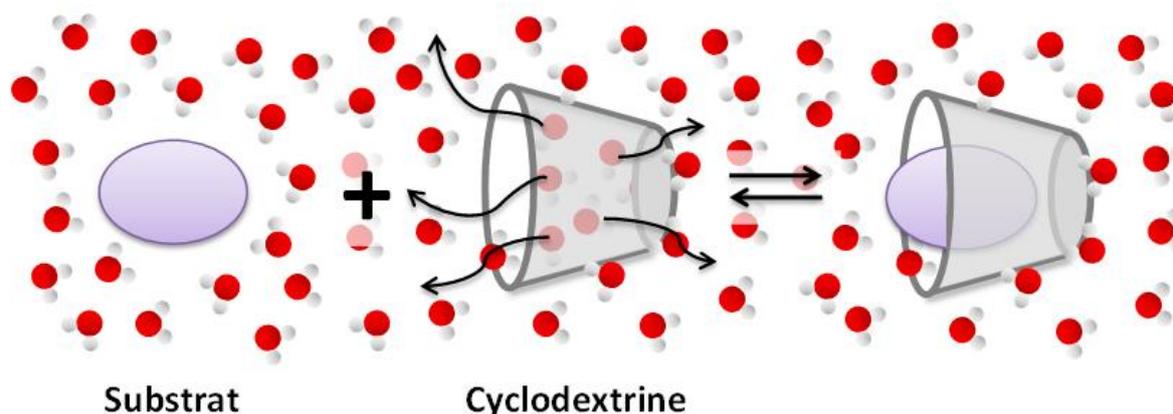


Figure 11 : Représentation schématique de l'interaction hôte-invité en solution entre une cyclodextrine et un substrat.

Les conséquences de l'interaction entre les CDs et un invité peu soluble sont les suivantes ⁶⁸ :

- La concentration de l'invité dissous augmente tandis que la concentration des CDs diminuent (sauf dans le cas où certaines interactions augmentent la solubilité de la CD, avec des liaisons hydrogène ou un invité ionique par exemple).
- Les propriétés spectrales de l'invité peuvent être modifiées.
- La réactivité chimique de l'invité peut être modifiée.
- La diffusion et la volatilité de l'invité diminuent.

Les CDs connues pour leur capacité à former des complexes hôte-invités. Le ratio stœchiométrique le plus commun avec les substrats (S) étant un ratio 1 : 1 ⁶⁸. Les CDs peuvent également former des complexes de ratio 1 : 2 ou encore 2 : 1 et 2 : 2. Les constantes de complexation, K , entre les CDs qui sont les ligands (L) et les hôtes, découlent des équilibres thermodynamiques suivants ⁷⁰ :



La complexation des CDs avec différentes molécules a également été largement étudiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) ^{73,74}, par des méthodes spectroscopiques et par des méthodes électrochimiques ^{75,76} ou encore par diffraction des rayons X avec par exemple les travaux préliminaires de Saenger et Harata qui ont permis d'étudier la structure cristalline des différentes cyclodextrines, en utilisant la diffraction aux rayons X ^{77,78}. La capacité de ces

molécules à former des complexes d'inclusion a été étudiée grâce à cette même méthode par de nombreux groupes, notamment par Hamilton pour l'inclusion des groupements adamantane modifiés tel que l'acide 1-adamantanoïque ⁷⁹ ou le 1-adamantane méthanol ⁸⁰ avec la β -CD. Il montre ainsi que l'adamantane peut occuper deux positions différentes dans la CD, mais qu'un seul des deux sites peut être occupé lors de la formation de dimères de CDs.

V.3. Immobilisation de cyclodextrines à la surface d'électrodes

Du fait de ses propriétés d'inclusion intéressantes, on peut noter un nombre important de publications utilisant les cyclodextrines comme matériau d'accroche ⁸¹. Parmi les différentes cyclodextrines, la β -cyclodextrine est la plus utilisée pour des applications en électrochimie puisque l'intérieur de sa cavité permet l'inclusion d'un nombre important de composés. Dans la plupart des cas, la molécule d'intérêt qui possède des parties hydrophobes et des propriétés rédox peut être détectée par voie électrochimique après inclusion. On peut noter ainsi la détection de différentes sondes électroactives telles que l'antraquinone, l'acide ascorbique, le chloronitrobenzène, le ferrocène, le bleu de méthylène ou les dérivés de viologène en solution ⁸². Pour les molécules solubles telles que la dopamine, l'acide urique ou ascorbique par exemple, l'inclusion dans les cyclodextrines entraîne une diminution du courant de pic de l'espèce électroactive du fait d'un plus faible coefficient de diffusion de l'espèce hôte-invité et on peut noter un déplacement du potentiel électrochimique ⁸³⁻⁸⁵.

Il existe une panoplie de stratégies d'immobilisation des cyclodextrines à la surface d'électrode telle que l'adsorption, la formation de monocouches par interaction électrostatiques ou par liaison covalente, leur inclusion dans des films de polymères, ou leur incorporation dans des membranes plastifiées ainsi que dans des pâtes de carbone ^{86,87}. Dans cette optique, les CDs sont souvent modifiées afin de permettre leur immobilisation. A titre d'illustration, elles peuvent être substituées par des groupements spécifiques tels que des groupements thiols pour leur immobilisation covalente sur électrode d'or, par des groupements amine pour la formation d'un lien amide avec des fonctions acide carboxylique d'électrodes préalablement modifiées, ou par des groupements pyrène pour réaliser des interactions de π -stacking avec les parois de nanotubes de carbones.

Ainsi, García *et al.* ont montré qu'il était possible d'immobiliser des CDs par une approche bottom-up *via* trois types d'interactions différentes sur des surfaces d'or : une adsorption directe de β -cyclodextrine modifiée par des groupements amine (CD-amine), la formation d'un lien amide entre la CD-amine et les fonctions acide carboxylique d'une surface possédant une monocouche auto-organisée d'acide 4-mercaptobenzoïque et enfin l'attache

covalente de nouveau par formation d'un lien amide entre la CD-amine et les groupements acide carboxylique de sel de diazonium d'acide 4-mercaptobenzoïque électrogréffés ⁸⁸.

En 1998, Godinez *et al.* montrent qu'il est possible de réaliser des interactions électrostatiques entre des CDs modifiées par des groupements aminés chargés positivement d'un côté et par de longues chaînes carbonées de l'autre, et des surfaces d'or fonctionnalisées par des acides carboxyliques. Ainsi, les CDs forment des multicouches très désordonnées sur les électrodes nues, tandis qu'elles s'orientent et forment des monocouches ordonnées sur les électrodes modifiées ⁸⁹.

Différents travaux ont reporté la préparation de films de polymères de cyclodextrines (CDPs), pouvant être préparés sur des surfaces d'électrodes métalliques ou de carbone par des processus de polycondensation à base de glutaraldéhyde. Les CDs peuvent également être liées par des interactions covalentes ou à l'intérieur de matrices de polymères tels que le polyéthylèneimine, le poly(N-acétylaniline), le polypyrrole ou le poly-3-méthylthiophène. Les CDPs peuvent ainsi servir à l'immobilisation d'enzymes ou de médiateurs rédox pour l'élaboration de biocapteurs ampérométriques ⁸⁷. De nombreux exemples de CDPs ont été décrit en 2001 par A. Ferancová et J. Labuda, avec de nombreuses applications dont notamment la conception de membranes pour les dispositifs électrochimiques, la détection et quantification de drogues en milieu aqueux, complexe ou dans le sérum ⁸². Les CDPs ont été très étudiés ces dernières années du fait de la bonne stabilité, l'augmentation du nombre de sites actifs, la reproductibilité et la forte adhérence aux électrodes des films réalisés.

V.4. Utilisation des complexes hôtes-invités à base de cyclodextrines dans les biocapteurs à glucose

Grâce aux interactions hôte-invité, les biomolécules peuvent être immobilisées de façon non covalente aux électrodes, permettant de conserver les propriétés physico-chimiques des différents éléments utilisés lors de l'assemblage de dispositifs électrochimiques. Les exemples de biocapteurs utilisant les CD de type β sont nombreux ^{81,92,93}. Ici sont détaillés quelques exemples de biocapteurs à glucose, utilisant la glucose oxydase (GOx) comme modèle.

La glucose oxydase est largement utilisée pour développer des biocapteurs métaboliques à glucose ^{48,94}. Cette enzyme est une glycoprotéine dimérique de 130 à 320 kDa, composée de deux sous-unités peptidiques identiques liées entre elles de façon covalente par des ponts disulfure ⁹⁵. Chaque sous-unité contient un cofacteur organique rédox, la flavine adénine dinucléotide (FAD), responsable de l'oxydation du glucose en gluconolactone et de la réduction de l'oxygène. La représentation schématique d'une sous-unité de cette enzyme est présentée sur la Figure 12.



Figure 12 : Schéma d'une sous-unité de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* avec son cofacteur FAD ⁹⁶.

La Figure 13 montre le fonctionnement de la GOx qui, en mettant en jeu son cofacteur, catalyse l'oxydation du β -D-glucose en présence d'oxygène en β -D-glucono- δ -lactone et H_2O_2 , grâce à un mécanisme à $2 e^-$ et $2 H^+$. Le β -D-glucono- δ -lactone s'hydrolyse ensuite spontanément en acide gluconique.

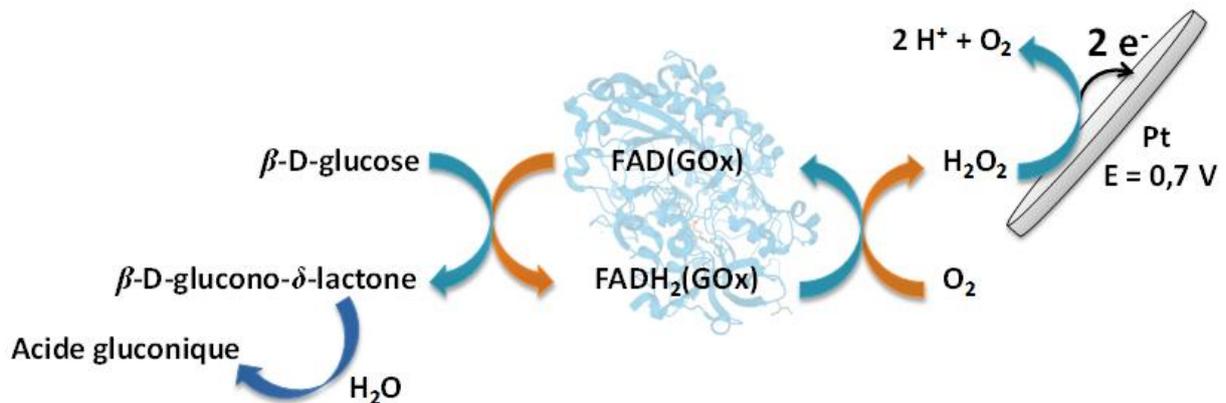


Figure 13 : Schéma du fonctionnement d'un capteur à glucose utilisant la GOx avec la catalyse de la réaction d'oxydation du β -D-glucose en acide gluconique par l'enzyme.

Afin de déterminer la quantité de glucose en solution, le peroxyde d'hydrogène généré par la GOx est oxydé à la surface d'une électrode de platine en appliquant un potentiel de 0,7 V. Deux électrons sont récupérés par mole de glucose consommée, ce qui permet la détermination de sa concentration.

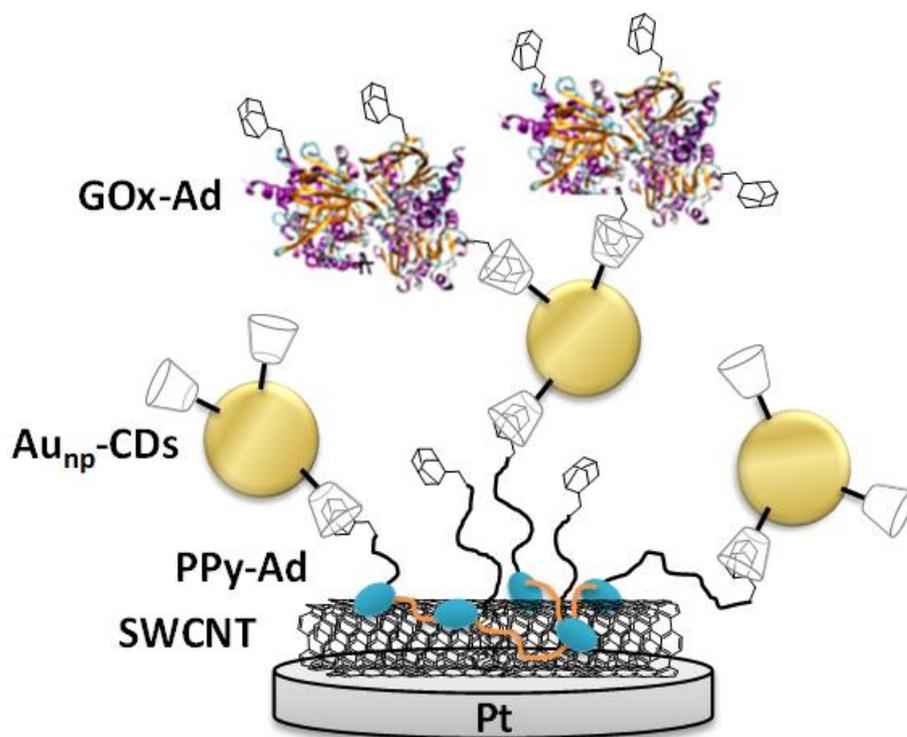


Figure 14 : Représentation schématique de la structure du biocapteur à glucose élaboré par Holzinger *et al.* en 2009 ⁹⁷.

Dans leurs travaux de 2009, Cosnier *et al.* élaborent un biocapteur à glucose en préparant des électrodes biostructurées en trois dimensions. Un monomère de pyrrole-adamantane est électropolymérisé sur des électrodes de platine recouvertes de nanotubes de carbone pour former un film de poly-pyrrole-adamantane (PPy-Ad). Ainsi, le pyrrole est solidement lié aux nanotubes, et le groupement adamantane est utilisé pour immobiliser des nanoparticules d'or portant des CDs en surface (Au_{np}-CDs) par des interactions hôte-invité. Ces mêmes CDs sont ensuite utilisées pour l'immobilisation d'une glucose oxydase modifiée par des groupements adamantane (GOx-Ad). Ce design permet l'obtention d'une densité de courant maximale de $350 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et d'une sensibilité de $31,02 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ⁹⁷.

Un autre exemple de biocapteur à glucose, utilisant également des CDs pour l'ancrage de biomolécules, a été décrit en 2011 par la même équipe ⁹⁸. Après avoir été recouvertes de MWCNTs, les électrodes de platine sont incubées dans une solution de tris[4,4'-bis(4-pyrène-1-ylbutyloxy)bipyridinyl] Fe(II) hexafluorophosphate. Les groupements pyrène interagissent avec les nanotubes par des interactions de π -stacking. Ces groupements ont également une affinité avec la cavité des CDs, et sont donc utilisées pour l'ancrage d'une glucose oxydase modifiée par celles-ci. L'utilisation du complexe comme pont entre les MWCNTs et l'enzyme permet l'immobilisation de celles-ci en nombre. De plus, ce pont permet une bonne diffusion du peroxyde d'hydrogène généré par l'enzyme jusqu'aux électrodes. Les électrodes ainsi

fonctionnalisées présentent une densité de courant maximale de 165 mA.cm^{-2} , une limite de détection de $1,5 \text{ mM}$ et une sensibilité de $13,5 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$.

La même année, Haddad *et al.* élaborent un biocapteur à glucose basé sur l'électropolymérisation d'un pyrène portant un groupement adamantane sur des SWCNTs. Les groupements adamantane permettent l'ancrage de la glucose oxydase modifiée par des CDs. Grâce aux propriétés d'inclusion avec l'adamantane, le biocapteur élaboré est caractérisé par un domaine de linéarité compris entre 2.10^{-7} M et $1,6.10^{-3} \text{ M}$, avec un courant maximal de $154,9 \text{ }\mu\text{A.cm}^{-2}$ et une sensibilité au glucose de $14,4 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ⁹⁹.

En 2016, Fritea *et al.* proposent également un concept de biocapteur à glucose en électrogénérateur un film de poly-pyrrole fonctionnalisé par des β -cyclodextrines. Des groupements tétrazines (Tz) substituées sont utilisées comme « pont » pour former des complexes hôte-invité avec les CDs de la surface et avec des GOx elles-mêmes modifiées par des CDs. Le domaine de linéarité de ce biocapteur se situe entre $8,16 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ et $3,83 \text{ mmol.L}^{-1}$, une sensibilité de $1,484 \text{ mA.L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ et un courant maximal de $38 \text{ }\mu\text{A.cm}^{-2}$ ¹⁰⁰.

VI. Les nanomatériaux et leurs insertions dans des dispositifs électrochimiques

VI.1. Généralités sur les nanomatériaux

Les recherches dans le domaine des nanomatériaux est de nos jours en plein essor du fait de ses nombreuses applications en physique, chimie et en médecine ou encore en électrochimie par exemple¹⁰¹⁻¹⁰³. Le nombre de publications en lien avec les nanomatériaux ne cesse d'augmenter, comme le montre la Figure 15.

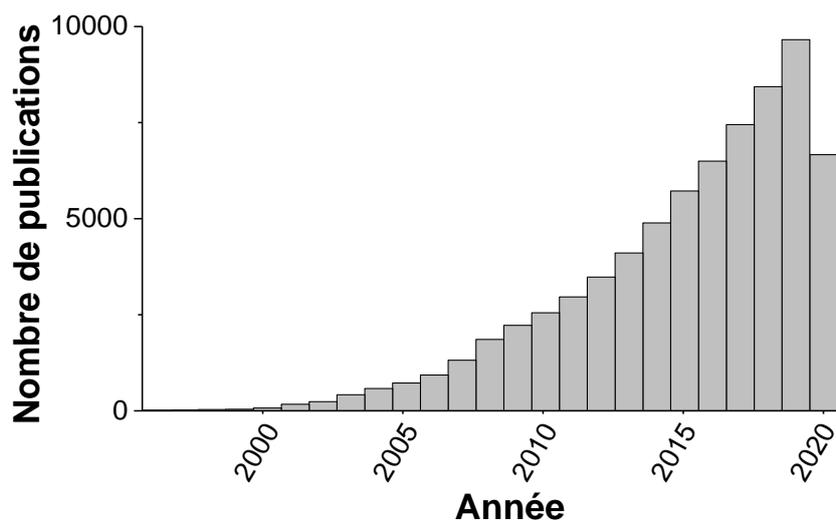


Figure 15 : Evolution du nombre de publications tous domaines confondus en lien avec les nanomatériaux de 1996 à aujourd’hui. (Base de données Web of Sciences, Septembre 2020)

Les nanomatériaux sont définis, d’après la commission européenne du 18 octobre 2011, comme étant « un matériau comportant toute une dimension externe à l’échelle nanométrique ou une structure interne ou en surface à l’échelle nanométrique ». Cette échelle nanométrique étant définie comme « un spectre de dimensions d’environ 1 nm à 100 nm ». Du fait de leur taille nanométrique, les nanomatériaux ont des propriétés physico-chimiques très différentes des objets macroscopiques. Cela leur confère des propriétés exceptionnelles et la possibilité de miniaturiser les dispositifs les utilisant ^{104–106}.

Les nanomatériaux sont classés en 4 grandes familles, en fonction de leurs dimensions ¹⁰⁷. Les nanomatériaux dont toutes les dimensions sont à l’échelle nanométrique sont dits de dimension 0 (0D) et sont composés des nanopoudres et des poudres ultrafines, elles-mêmes composées d’objets de formes sphériques, cubiques ou encore triangulaires. La taille nanométrique dans toutes les directions de ces objets conduit au confinement des électrons dans l’espace 3D, sans possibilité de délocalisation et permettant leur libre mouvement. Les nanomatériaux de dimension 1 (1D) possèdent deux dimensions à l’échelle nanométrique et une dimension à l’échelle macroscopique. Le confinement des électrons se produit dans un espace à 2D, néanmoins ils peuvent être délocalisés le long du grand axe, rendant les objets 1D très sensibles à de petites variations en surface. Ils comprennent les nanofils, nanofibres, nanotiges, nanotubes et tétrapodes. Les nanocouches, tel que le graphène, et les nanofilms font partie des nanomatériaux de dimension 2 (2D), dont une dimension est nanométrique et deux macroscopiques. Les électrons sont ici confinés dans l’épaisseur mais peuvent se délocaliser dans le plan des feuillets. Les nanocomposites, les structures métalliques nanoporeuses ou encore les nanocontaineurs (microsphères nanoporeuses et nanovésicules)

constituent les nanomatériaux de dimension 3 (3D) car toutes les dimensions sont macroscopiques.

A l'échelle nanométrique, de nouveaux comportements de la matière sont observés, conférant de nouvelles propriétés chimiques, physiques ou biologiques aux matériaux. En effet, les forces de la physique quantique sont prépondérantes à cette échelle. Ces propriétés spécifiques sont observées du fait de plusieurs facteurs comme la quasi-absence de défauts du fait de la petite taille de ces objets ou encore l'important rapport surface sur volume. Plus la taille d'une particule diminue, plus leur nombre par gramme de matière augmente. De ce fait, la surface totale du matériau par rapport à l'environnement croît considérablement. De plus, plus une particule a un petit diamètre, plus le nombre d'atomes en surface de celles-ci est grand (soit 5 % d'atomes en surface pour une particule de 30 nm, 50 % pour une particule de 3 nm). Les effets d'interface à cette échelle sont donc importants et vont jouer notamment sur la réactivité des nanomatériaux. Par ailleurs, la légèreté des particules va affecter la stabilité des suspensions colloïdales, où les forces répulsives (électrostatiques) et le mouvement Brownien vont être prépondérants en regard de la gravité. Ces suspensions ont donc la particularité de ne pas sédimenter. Par ailleurs, des suspensions diffusent la lumière dans toutes les directions, d'où l'obtention de solution turbides. Plus les particules sont grosses, plus la solution sera trouble. La couleur des particules peut également évoluer en fonction de leur taille, comme par exemple l'or qui est jaune à l'échelle macroscopique, mais rouge-violet à l'échelle nanométrique¹⁰⁸.

Grâce à ces nouvelles propriétés, de nouveaux matériaux peuvent être élaborés avec des propriétés mécaniques, électriques, magnétiques, optiques et catalytiques différentes, rendant un grand champ d'applications possibles.

VI.2. L'intégration des nanomatériaux dans les biocapteurs et les biopiles

L'intégration de nanomatériaux dans les dispositifs électrochimique, tels que les biocapteurs ou les biopiles, a conduit ces dernières années à l'amélioration des performances de ceux-ci. La surface disponible pour les échanges étant augmentée, la quantité de signal récoltée l'est également. Ainsi, les biopiles ont vu leur densité de puissance augmenter par l'augmentation de la densité de courant, et les limites de détections des biocapteurs ont été abaissées et leurs sensibilités ont été augmentées¹⁰⁵.

L'utilisation des nanomatériaux dans les dispositifs électrochimiques, comme les quelques exemples non exhaustifs proposés sur la Figure 16, repose sur la modification de la surface du transducteur par des objets nanométriques tels que des nanoparticules comme les quantum

dots (QDs) ou les nanoparticules métalliques par exemple, ou encore par des matériaux carbonés tels que des nanotubes de carbone ou encore du graphène¹⁰⁹⁻¹¹². Une autre approche également décrite est la nanostructuration directe du transducteur par lithographie à faisceaux d'électrons ou épitaxie pour former des nanoplots, des nanopores ou des nanotiges¹⁰⁵.

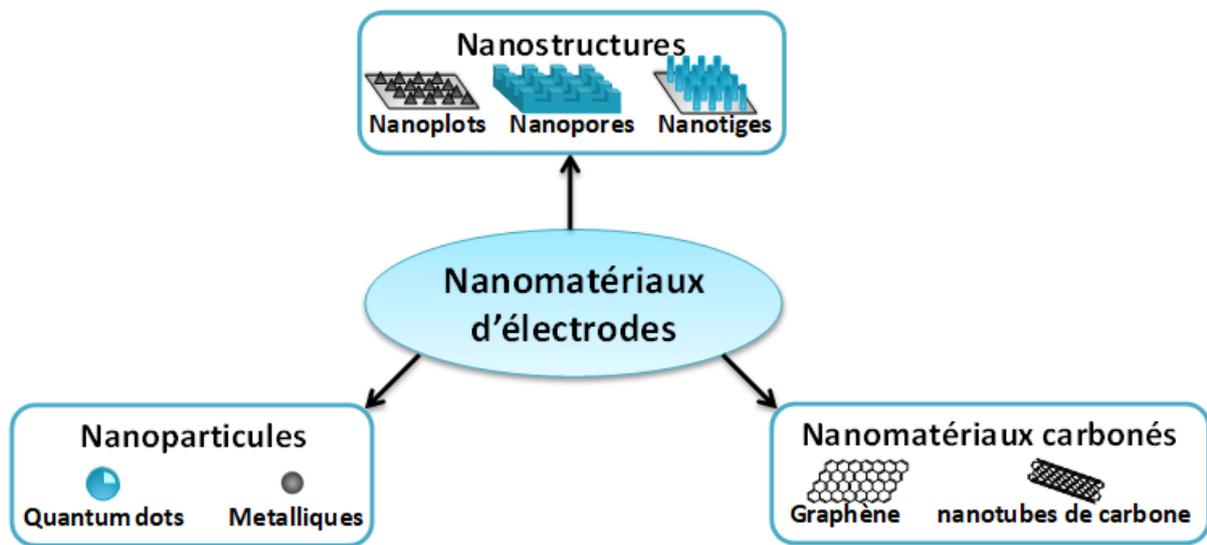


Figure 16 : Quelques exemples de différentes classes de nanomatériaux d'électrodes.

Les nanomatériaux 0D, telles que les nanoparticules, peuvent être fabriqués sous forme de suspension colloïdale ou directement synthétisés sur les électrodes, l'approche bottom-up étant la méthode d'élaboration la plus utilisée. Parmi les éléments utilisés dans les suspensions colloïdales, on trouve les métaux et les matériaux semi-conducteurs tels que les quantum dots. Les QDs les plus utilisés dans les biocapteurs électrochimiques sont composés de CdS, CdSe, ZnS ou encore de PbS, notamment pour la détection d'analytes organiques ou inorganiques, ou pour des dosages électrochimiques d'immuno-analyse ou de complexes ADN/aptamère¹¹³. L'utilisation de QDs permet notamment la détection simultanée de plusieurs analytes différents, comme l'ont reporté Kokkinos *et al.* avec la conception d'un biocapteur électrochimique capable de détecter à la fois la caséine bovine et l'immunoglobuline G bovine dans des échantillons de lait en marquant les anticorps respectifs avec des QDs à base de Pb ou de Cd¹¹⁴, ou encore Zhou *et al.* avec l'élaboration d'un biocapteur en sandwich permettant la détection simultanée de deux protéines impliquées dans le phénomène d'apoptose des cellules tumorales suite à l'administration d'un traitement anticancéreux¹¹⁵.

Les nanoparticules composées de métaux nobles possèdent une conductivité électrique excellente, sont faciles à synthétiser et à modifier en surface, et dans le cas de l'or et du platine, sont biocompatibles¹⁰⁴. La taille et la forme de ces nanoparticules est aisément

contrôlée en solution en fonction des conditions de réaction, tels que la concentration en précurseurs, le ratio des différents éléments, le stabilisateur de surface ou la température ¹¹⁶. Les sels de métaux peuvent également être directement réduits sur les électrodes, permettant un contrôle du processus de nucléation et de la croissance des nanoparticules métalliques à la surface des électrodes. Ainsi, de fortes adhésions sont obtenues entre la surface et les nanoparticules, ainsi qu'une augmentation de l'aire surfacique et de la réactivité des électrodes. Cela permet notamment la production d'effets catalytiques vis-à-vis des analytes d'intérêt, conduisant au développement des capteurs non-enzymatiques ¹¹⁷.

Les nanomatériaux carbonés sont également très utilisés pour la conception d'électrodes et ainsi augmenter les performances des biocapteurs et des biopiles. Dans cette catégorie sont compris notamment les nanodiamants, le graphène et les nanotubes de carbone. Les propriétés particulières de ces derniers sont discutées dans le paragraphe suivant.

VI.3. Cas particulier des nanotubes de carbone

V.3.1. Généralités

Les nanotubes de carbone (NTC) sont composés d'un (single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) ou plusieurs (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) feuillets de graphène enroulés les uns sur les autres. Les SWCNTs ont des diamètres compris entre 0,4 et 3 nm, tandis que les MWCNTs ont des diamètres compris entre 1,4 et plus de 100 nm ¹¹⁸. Ils sont très utilisés comme matériau d'électrodes du fait de leurs propriétés électriques exceptionnelles ¹¹⁹. Grâce à leur réseau de carbone sp², ils sont très conducteurs. De plus, leur surface spécifique élevée et leur biocompatibilité permettent l'immobilisation de nombreuses biomolécules. Dans cette optique, deux grandes classes de fonctionnalisation ont été développées : les fonctionnalisations covalentes, où de nouvelles liaisons sont formées (chimisorption) et les fonctionnalisations non covalentes (physisorption).

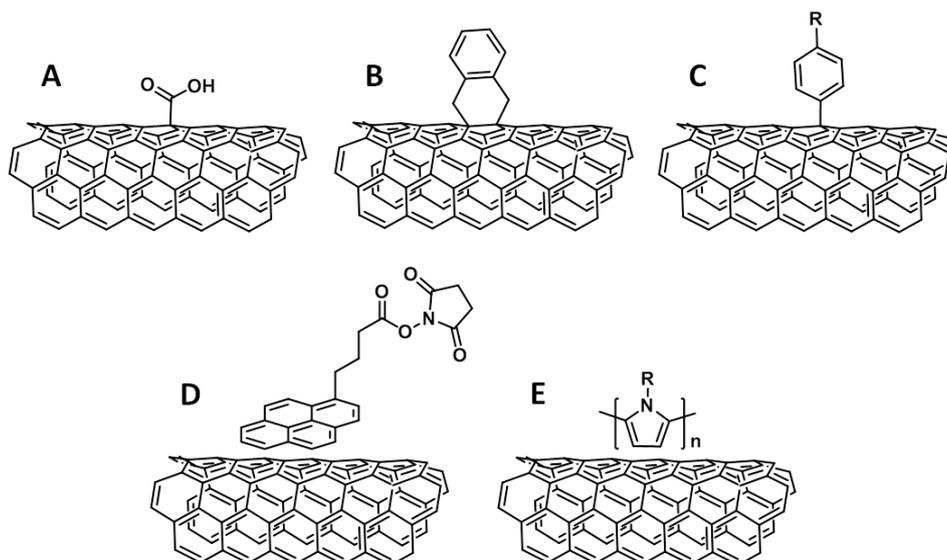


Figure 17 : Fonctionnalisations covalentes (A, B, C) et non covalentes (D, E) des NTCs.

V.3.2. Fonctionnalisations covalentes

Des liaisons covalentes sont formées entre les CNTs et différents groupements dans le but d'immobiliser des enzymes. Deux types de modification sont possibles : les réactions mettant en jeu les groupements oxydés des CNTs pour réagir avec différentes fonctions (ester, azide ou amine ...) et les réactions d'addition ¹²⁰.

Pour oxyder les CNTs, des défauts sont introduits par exposition à des ultrasons. Des conditions acides et oxydantes sont nécessaires pour permettre l'addition de fonctions oxydées telles que des carbonyle, carboxyl ou hydroxyl sur les défauts le long des parois des CNTs et au niveau de leurs extrémités. Des mélanges d'acides nitrique et sulfurique concentrés sont utilisés comme réactifs. Les fonctions oxydées résultantes sont activées puis remplacées par des groupements amide, amine, ester ou azide. Lorsque les CNTs sont fonctionnalisés par des fonctions azide, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen peut être utilisée pour immobiliser des molécules. Cette technique nommée « chimie click » est une réaction de cycloaddition où un azide réagit avec un alkyl situé sur l'autre molécule ¹²¹.

Parmi les réactions d'addition, il existe les cycloadditions, les additions électrophile, nucléophiles et radicalaires. Des espèces très réactives sont nécessaires ici pour réagir directement avec les parois des CNTs. Le premier exemple de cycloaddition Diels-Alder sur les parois de SWCNTs a été décrit par Langa *et al.* en 2004 ¹²². Ils décrivent l'addition 4 + 2 d'un ortho-quinodiméthane généré *in situ* sur des SWCNTs fonctionnalisés par des ester et irradiés par des ultra-sons.

Les sels d'aryldiazonium sont utilisés pour générer des couches de polyphénylènes de par leur réduction sur des surfaces d'électrodes ¹²³. Une fois le sel de diazonium réduit, un radical aryl est généré. Celui-ci réagit avec les surfaces de CNTs en formant une liaison covalente. Différents sels de diazonium peuvent être utilisés, le cycle phényl pouvant être substitué par de nombreux groupements permettant ainsi de moduler les propriétés physicochimiques des électrodes. L'inconvénient de la chimisorption est l'ajout de défauts dans le réseau aromatique de carbone, diminuant la conductivité et les propriétés mécaniques des nanotubes.

V.3.3. Fonctionnalisations non covalentes

Ce type d'immobilisation permet de préserver la conductivité des CNTs. Leurs propriétés hydrophobes et aromatiques sont utilisées pour immobiliser des molécules, sans formation de liaisons et donc en conservant le réseau π conjugué. Les enzymes sont de grosses molécules, souvent composées de plusieurs sous-unités. Elles peuvent posséder des domaines hydrophobes formés par les chaînes aromatiques latérales des acides aminés. En 1999, l'équipe de Balavoine met en évidence les interactions hydrophobes entre la streptavidine et les parois de MWCNTs ¹²⁴. En 2001, Dai *et al.* rapportent pour la première fois la fonctionnalisation de SWCNTs avec des pyrène et ester succinimide afin d'immobiliser des enzymes ¹²⁵. De par les propriétés aromatiques des pyrènes, ceux-ci peuvent fortement interagir avec les parois des nanotubes par π -stacking. Ce type d'interaction est très stable et évite les phénomènes de désorption en milieu aqueux. L'ester succinimide est un groupement très réactif vis-à-vis des substitutions nucléophiles par des amines primaires et secondaires. La plupart des enzymes possèdent des groupements amines en surface, elles peuvent de ce fait réagir facilement avec l'ester succinimide pour créer une liaison covalente stable, et être liées aux CNTs. Depuis, de nombreuses études utilisent le phénomène de π -stacking pour la fonctionnalisation de nanotubes de carbone par des groupements pyrène ou des porphyrines ^{29,126,127}.

Une autre méthode d'immobilisation non covalente d'enzymes sur des MWCNTs a été décrite par Cosnier *et al.* en 2013 ¹²⁸. Elle consiste en l'électrogénération d'un film de poly(pyrrole) portant des ester succinimide pour l'immobilisation covalente d'une laccase ou d'un film portant des groupements pyrène pour une approche non covalente. Les monomères de pyrrole sont oxydés à la surface des électrodes pour générer un film de polymère lié aux nanotubes.

VII. Les polymères

VI.1. Généralités

Les polymères sont de grandes molécules constituées d'un assemblage de plusieurs sous-unités appelées monomères liés entre eux par des liaisons covalentes. Les polymères sont présents dans de très nombreux objets de la vie quotidienne et les recherches ne cessent d'augmenter, avec plus de 58 000 publications en 2019 d'après Web of Science. Les domaines d'application sont très variés, avec leur utilisation par exemple pour fabriquer des membranes capables de capturer le CO₂ pour lutter contre le réchauffement climatique ¹²⁹, pour élaborer des textiles intelligents ¹³⁰, ou encore pour leur utilisation dans le domaine biomédical pour notamment la vectorisation de médicaments, l'imagerie médicale ou l'élaboration de biocapteurs ^{131,132}.

Dans la catégorie des polymères, on peut distinguer les homopolymères des copolymères. Par définition, un homopolymère est constitué d'un seul motif qui se répète plusieurs fois, à l'opposition d'un copolymère constitué de plusieurs motifs qui se répètent le long de la chaîne.

VI.2. Les copolymères à blocs

Par définition, un copolymère à blocs (BCP, block copolymer) est constitué de deux homopolymères notés A et B liés entre eux par des liaisons covalentes est un dibloc noté AB ^{133,134}. Les sous-unités formant le copolymère peuvent être arrangées de différentes façons dans l'espace. On peut classer les copolymères en 4 principales catégories, comme indiqué sur la Figure 18 avec les copolymères alternés, où les monomères s'enchaînent selon un motif régulier, les copolymères statistiques, où les monomères sont répartis le long de la chaîne de façon aléatoire, les copolymères greffés, dans lesquels une chaîne principale est constituée d'un monomère et des chaînes latérales sont greffées sur celle-ci et constituées d'un autre monomère, et les copolymères à blocs, où plusieurs longues séquences constituées d'un seul monomère s'enchaînent.

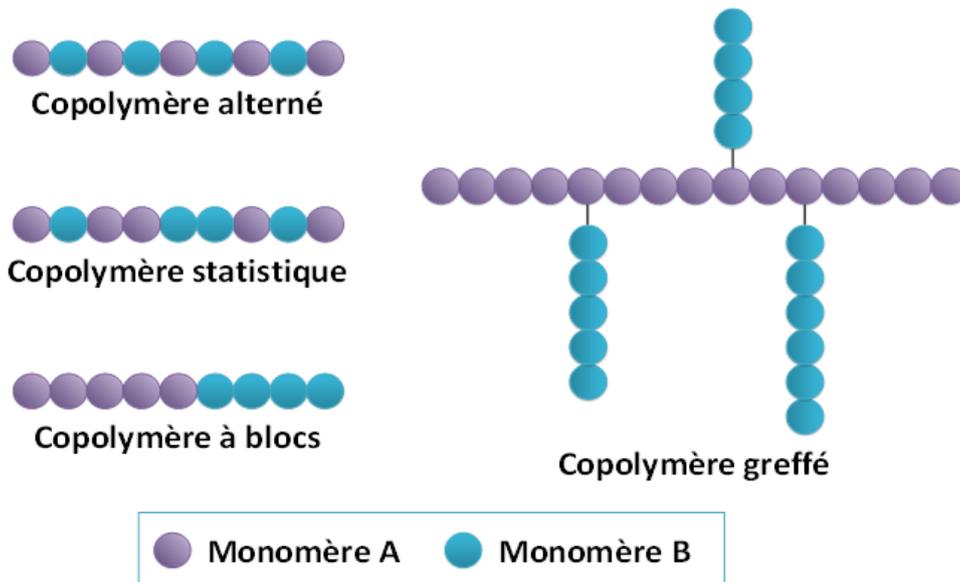


Figure 18 : Représentation schématique des 4 types de copolymères.

Les BCPs sont principalement synthétisés en utilisant des méthodes de polymérisation vivantes, telles que la polymérisation par ouverture de cycle (Ring-Opening Polymerization en anglais, ROP)¹³⁵, la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (Atom-Transfer Radical Polymerization, ATRP)¹³⁶, ou par l'utilisation d'agents de fragmentation réversible (Reversible-Addition-Fragmentation chain-Transfer polymerization, RAFT polymerization)¹³⁷. L'assemblage de deux blocs peut également se faire en post-polymérisation par chimie click, réaction de Diels-Alder ou encore par réactions mettant en jeu des groupements thiols¹³⁸. La formation de BCPs est ensuite confirmée par des techniques d'analyses classiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FT-IR spectroscopy), ou encore la chromatographie à perméation de gel (Gel Permeation Chromatography, GPC).

Parmi les copolymères à blocs, les BCPs amphiphiles sont particulièrement intéressants. Ils sont constitués d'un bloc hydrophile A et d'un bloc hydrophobe B. La synthèse de glycopolymères amphiphiles et leur auto-assemblage (par exemple en micelles ou vésicules biocompatibles) suscite un grand intérêt de recherche, notamment dans le domaine médical et analytique avec des applications dans la vectorisation de médicaments ou le diagnostic de cancers¹³⁹⁻¹⁴⁴. Les BCPs amphiphiles s'auto-organisent en différentes architectures qu'ils soient en solution ou sous forme de film mince dû au phénomène de micro-séparation de phase.

VI.3. Auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles

L'auto-assemblage en solution aqueuse de copolymères à blocs amphiphiles permet d'obtenir des nano-objets avec des structures variées¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Les fonctionnalités de ces nano-objets peuvent être adaptées en fonction des applications visées qui sont très vastes, telles que par exemple la libération de médicaments ou la stabilisation des interfaces. De plus, la structure chimique de chacun des blocs permet d'obtenir des matériaux modulables en fonction de l'application visée. Les différentes morphologies obtenues sont fortement dépendantes des concentrations et de la fraction volumique/composition des copolymères (notamment de la longueur de chaque bloc), des solvants utilisés (qualité de solvation) ainsi que de la présence d'additifs en solution tels que des ions pour réaliser les assemblages. Ainsi, des morphologies telles que des sphères (vésicules ou micelles), des cylindres (micelles vermiculaires), des structures lamellaires ou encore des structures creuses hexagonales peuvent être obtenues¹⁴⁹.

La possibilité de former des structures micellaires ou vésiculaires en utilisant les copolymères à blocs amphiphiles a déjà été reportée dans la littérature^{150,151}. L'orientation de chacun des blocs à l'intérieur ou en surface des structures formées dépend également fortement de la méthode d'élaboration des nano-objets utilisée. Plusieurs méthodes d'assemblage peuvent être mises au point afin de former des nanoparticules ayant soit un cœur hydrophobe et une surface hydrophile, soit l'inverse. Quelques exemples sont reportés ci-dessous, présentant l'élaboration de glyconanoparticules constituées d'un cœur de polystyrène et de polysaccharides en surface.

En 2009, Giacomelli *et al.* (Equipe R. Borsali) proposent un mode opératoire pour la préparation de nanoparticules micellaires reposant sur l'auto-assemblage en solution aqueuse de copolymères à blocs composés de chaînes de polystyrène (PS) fonctionnalisées en leur extrémité par des cyclodextrines de type β (Figure 19). C'est le premier travail publié pour ce système.

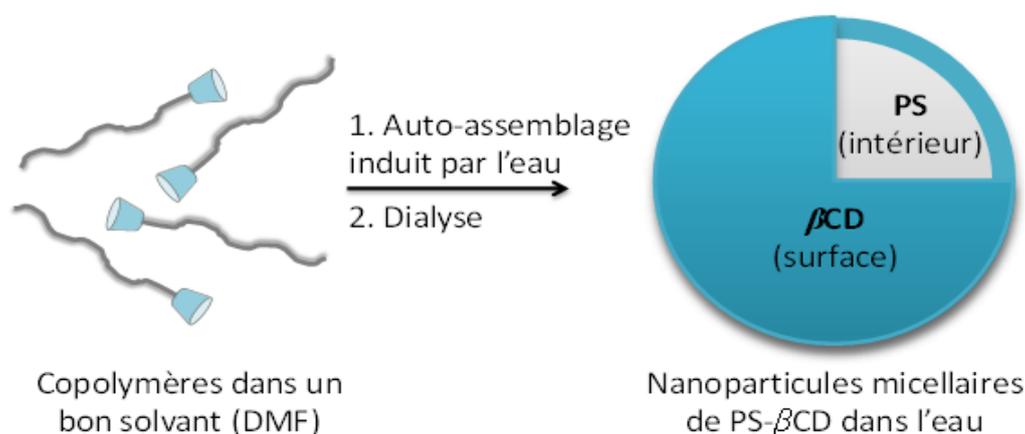


Figure 19 : Auto-assemblage des chaînes de copolymère selon Giacomelli *et al*¹⁵².

Après solubilisation du copolymère en milieu organique, la micellisation est provoquée par l'addition lente d'eau. Les nanoparticules obtenues comportent un cœur hydrophobe de PS, les CD se retrouvant en surface et stabilisant ces assemblages. La taille nanométrique de ces nanoparticules a été confirmée par microscopie électronique à transmission et par diffusion de la lumière ¹⁵².

En 2013, deux nouvelles méthodes d'assemblage sont décrites par Otsuka *et al.* (Equipe R. Borsali) pour un copolymère similaire, avec une chaîne de PS de 4,5 kDa comme bloc hydrophobe et le maltoheptaose comme bloc hydrophile. Comme montré sur la Figure 20, le copolymère est tout d'abord solubilisé sous agitation dans un solvant composé de tétrahydrofurane (THF) seul ou mélangé à de l'eau. Puis, dans le cas de la méthode appelée nanoprécipitation standard, cette solution est ajoutée goutte à goutte dans un grand volume d'eau sous agitation pour permettre l'auto-assemblage des chaînes de copolymère. En revanche, lors de la nanoprécipitation inverse, c'est la phase aqueuse qui est ajoutée goutte à goutte au mélange contenant le copolymère sous agitation pour obtenir la suspension de nanoparticules. Les suspensions obtenues par les deux méthodes, après avoir été laissées sous agitation pendant 1h30, sont filtrées et le THF est éliminé par évaporation sous vide. Dans les deux cas, des solutions laiteuses sont obtenues ¹⁵³.

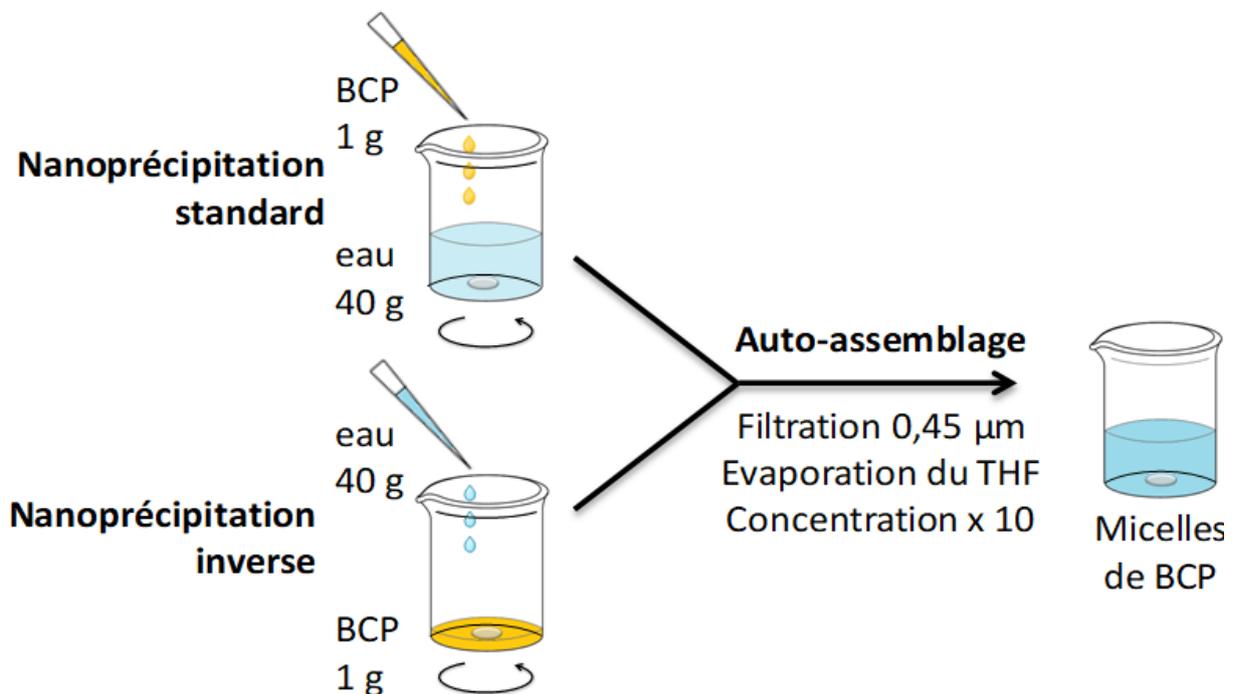


Figure 20 : Méthode de préparation des GNPs selon Otsuka *et al* ¹⁵³ avec un BCP de PS_{4,5}-CD_{1,2}.

L'équipe, en caractérisant les systèmes obtenus par DLS, MET et NTA, met en évidence que des diamètres plus petits sont obtenus en utilisant la méthode de nanoprécipitation standard.

VI.3.1. Fonctionnalisation de micelles à base de BCPs de PSCD

En 2016, la collaboration entre les équipes de S. Cosnier (DCM) et de R. Borsali (CERMAV) a permis d'utiliser pour la première fois ce système PSCD conjugué avec la tétrazine ainsi que la naphthalimide. En effet ces nanoparticules à base de cyclodextrine ont été mises à profit par Gross *et al.* selon les deux méthodes de nanoprecipitation précédemment décrites, en additionnant la Tz substituée par un groupement naphthalimide pour obtenir des particules électroactives et fluorescentes. Cette molécule a été ajoutée au mélange initial contenant le copolymère de PSCD et le mélange de solvant THF/eau (80 : 20 % volume/volume). La Tz ainsi que la naphthalimide peuvent s'insérer dans les CDs grâce à des interactions hôte-invité. Des tailles élevées des GNPs de 138 nm et de 654 nm confirmées par DLS, NTA et AFM sont obtenues puisque les deux groupements de la molécule peuvent s'insérer dans la cavité des CDs, et sert ainsi de réticulant pour former des clusters de GNPs. Les différentes analyses physico-chimiques confirment la présence des groupements Tz en surface des GNPs.

VI.3.2. Utilisation des glyconanoparticules à base de BCPs de PSCD en électrochimie et bioélectrochimie

Très récemment, la collaboration entre les équipes de S. Cosnier (DCM) et de R. Borsali (CERMAV) a aussi permis d'utiliser pour la première fois ce système en électrochimie. En effet, les GNPs ont été mises à profit pour la réalisation de biopiles en solution. Ainsi, les GNPs ont été fonctionnalisées par une molécule possédant une fonction pyrène, le pyrène pouvant s'insérer dans les CDs et une fonction ABTS, qui est un médiateur connu de la bilirubine oxydase. L'efficacité de leur système est prouvé en réalisant une biocathode catalysant la réduction du dioxygène par transfert indirect en utilisant comme enzyme la bilirubine oxydase et comme médiateur l'ABTS, le tout en solution. L'utilisation de GNPs permet à la fois de mieux solubiliser le bis-pyrène-ABTS en solution, et ainsi d'augmenter les courants catalytiques. De plus, une étude de stabilité montre que les électrodes possédant les GNPs sont plus stables dans le temps que lors de leur absence¹⁵⁴.

Enfin, en 2019, Hammond *et al.* mettent au point une biopile enzymatique entière en utilisant des GNPs dans chacun des compartiments anodique et cathodique de la pile. Le système précédemment décrit est utilisé à la biocathode avec des GNPs, le bis-pyrène-ABTS comme médiateur et la bilirubine oxydase pour réduire le dioxygène. Du côté de la bioanode, les GNPs sont fonctionnalisées par des molécules de phénanthrènequinone (PQ) pour médier la catalyse de l'oxydation du glucose par la glucose déhydrogénase dépendante de la flavine adénine dinucléotide (FAD-GDH). L'utilisation de GNPs dans ce système permet d'augmenter la durée de vie de la biopile et sa stabilité, en se servant des GNPs comme réservoir de médiateur. La puissance délivrée par cette biopile atteint 116,2 μW ¹⁵⁵.

VIII. Les différentes techniques de caractérisation des nanomatériaux

Du fait de leurs dimensions nanométriques, les nanomatériaux nécessitent des techniques de caractérisation bien spécifiques ¹⁵⁶. Cette partie présente une description sommaire du fonctionnement de quelques techniques de caractérisations utilisées pendant ma thèse pour étudier les nano-objets et permettre ainsi la détermination de leur forme et de leur taille.

VIII.1. Microscopie électronique à balayage

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB) a été développée grâce aux travaux du laboratoire de Charles Oatley à l'université de Cambridge, le but étant de réaliser des images en trois dimensions de surface d'échantillons en haute résolution ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Pour réaliser une image en microscopie électronique à balayage, l'appareil est mis sous vide. Un faisceau d'électrons est généré par un canon à électrons grâce à l'échauffement d'un filament de tungstène et est focalisé et condensé sur un échantillon en un faisceau de l'ordre de quelques nanomètres grâce à une colonne électronique comportant plusieurs lentilles électromagnétiques. La surface est balayée en tout point par le faisceau. L'image résulte de l'analyse des particules issues des interactions entre le faisceau d'électrons et les atomes en surface de l'échantillon. Certains échantillons peuvent subir un traitement comme une métallisation.

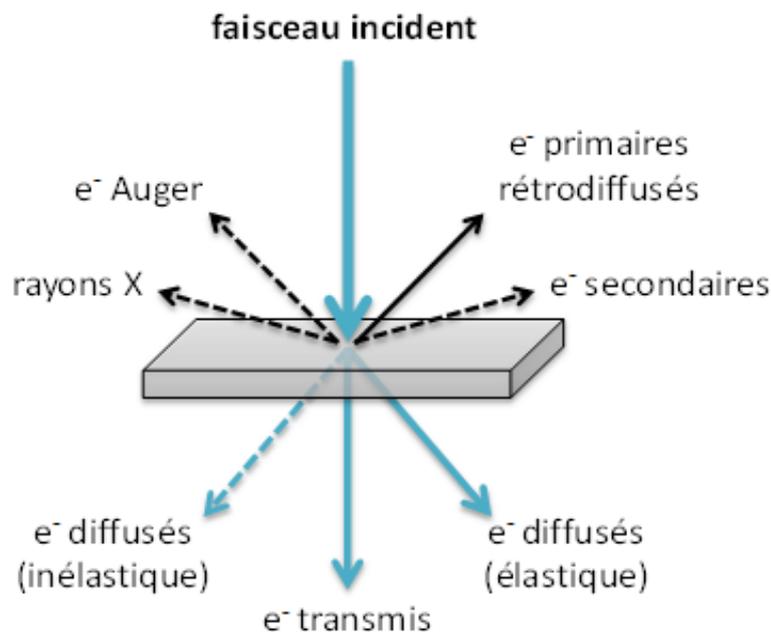


Figure 21 : Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons incidents et une surface permettant une étude en microscopie électronique.

Tout d'abord, les électrons du faisceau peuvent être déviés par le matériau suite à une interaction élastique. Ces électrons sont dit primaires car ils proviennent directement du faisceau, et rétrodiffusés car leur trajectoire a été modifiée par le noyau des atomes de la surface ciblée. Ils ont une énergie proche de l'énergie des électrons incidents car celle-ci n'a pas été absorbée par la surface. Le nombre d'électrons déviés dépend du numéro atomique de l'atome de la surface visée par le faisceau. Plus le numéro atomique augmente, plus le nombre d'électrons rétrodiffusés est important. L'image obtenue par analyse de ces électrons peut donc donner des informations qualitatives des atomes de l'échantillon, les éléments lourds apparaissant de façon plus claire que les éléments légers sur l'image.

Les électrons du faisceau peuvent également interagir avec les électrons orbitaux, tels que les électrons de valence, des atomes de l'échantillon de façon inélastique pour former des électrons secondaires. Les électrons secondaires ne sont détectés qu'en surface des échantillons car leur énergie est très faible, de l'ordre de 5 à 10 eV. Cette énergie est amplifiée par l'utilisation d'un détecteur polarisé positivement, permettant le recueil de nombreux électrons, et transformée en signal électrique. Une image de la surface en relief est alors créée suite à la reconstruction typographique de l'ensemble des signaux.

Enfin, l'énergie du faisceau incident peut être absorbée par les atomes. Ceux-ci vont se trouver dans un état excité et peuvent alors se désexciter en éjectant un électron Auger ou par l'émission de rayons X. Les rayons X de la désexcitation peuvent être analysés grâce à un spectre de raies, caractéristique de chaque élément chimique. La composition chimique de la surface des échantillons peut donc être déterminée grâce à cette technique.

VIII.2. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique en transmission (MET) a été mise au point en 1931 par M. Knoll et E. Ruska¹⁵⁹. Ce microscope est constitué des mêmes éléments que le MEB, avec un faisceau d'électrons également généré par un canon à électron et focalisé par des lentilles électromagnétiques. En revanche, cette technique repose sur l'analyse des électrons traversant l'échantillon, qui doit être suffisamment mince (soit environ 50 à 150 nm) pour les laisser passer. Afin d'être analysés, les objets à observer doivent se trouver en dispersion dans un liquide (par exemple des nanoparticules dans de l'eau). Une goutte de ce liquide est déposée sur un support constitué d'une grille en carbone, puis laissée à sécher. Le séchage peut être cependant responsable de l'agrégation ou l'agglomération des objets. Ces artefacts peuvent être évités en adaptant le milieu dispersant ou en rendant le support plus hydrophile. La grille de carbone est enfin placée sur un porte objet puis dans l'appareil qui sera mis sous vide. Lors de l'analyse, les électrons issus du canon peuvent être soit transmis, diffusés de façon élastique ou inélastique par l'échantillon. La résolution de ce microscope est d'environ 1 Å

¹⁶⁰. Ce microscope dispose de plusieurs modes d'observation : le mode image, diffraction et la haute résolution.

Le mode image est obtenu lorsque les électrons traversent l'échantillon et sont collectés sur un détecteur placé dans le plan image. Les électrons traversent plus ou moins le matériau en fonction de sa composition chimique. Ainsi, plus l'échantillon est dense, plus les électrons sont absorbés, ce qui crée des images contrastées.

En mode diffraction, les électrons qui entrent en contact avec un cristal voient leur onde dévier. Un cliché de diffraction peut être obtenu à partir de ces ondes diffractées. L'analyse de celui-ci permet de déterminer la configuration des atomes constituant le cristal, ainsi que leur organisation spatiale.

En haute résolution, un faisceau transmis interfère avec un faisceau diffracté, d'où l'obtention d'une image sur laquelle la position des atomes est visible. Ce mode de cartographie est généralement utilisé pour déterminer l'organisation cristalline et les défauts d'un échantillon.

Afin de déterminer la taille de nano-objets en solution et non immobilisés sur des surfaces, différentes techniques viennent en complément des techniques précédemment décrites.

VIII.3. Techniques de diffusion de la lumière

Pour étudier des particules en suspension, les techniques de diffusion de la lumière peuvent être utilisées ^{161,162}. Lorsqu'un faisceau incident irradie une particule en suspension dans une solution, la lumière peut être soit absorbée et/ou déviée en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente et des propriétés optiques et la taille des particules. Lorsque la longueur d'onde est beaucoup plus petite que les particules, la lumière dévie selon des phénomènes de réflexion, réfraction et diffraction. La lumière étant de nature ondulatoire, elle n'interagit pas de la même façon avec des particules ayant une taille de l'ordre ou plus petite que sa longueur d'onde. Dans ce cas la lumière est dite « diffusée » par les particules ¹⁶³. Si les particules sont petites par rapport à la longueur d'onde du laser (typiquement inférieur à $d = \lambda/10$), les particules diffusent de façon isotrope dans toutes les directions de l'espace. L'approximation de Rayleigh propose que l'intensité diffusée, I , est proportionnelle au diamètre de la particule à la puissance 6, et inversement proportionnelle à la longueur d'onde du laser à la puissance 4. De ce fait, une particule de taille importante diffuse beaucoup plus qu'une petite particule, rendant parfois l'interprétation des analyses difficiles car les petites particules peuvent être masquées par les particules plus volumineuses.

L'intensité de la lumière diffusée peut être étudiée en mode statique (élastique) ou dynamique (quasi-élastique). Pour cela, l'échantillon est placé dans un bain thermostaté pour avoir une

température fixe, puis irradié par un laser monochromatique ayant une longueur d'onde donnée et polarisé verticalement. Un photodétecteur (parfois composé de deux sous-détecteurs) reçoit et comptabilise ensuite les photons diffusés. Un système de goniomètre peut être utilisé pour réaliser des mesures à différents angles (θ). La Figure 22 présente le montage utilisé lors des mesures de diffusion de la lumière par des systèmes en solution ou en suspension.

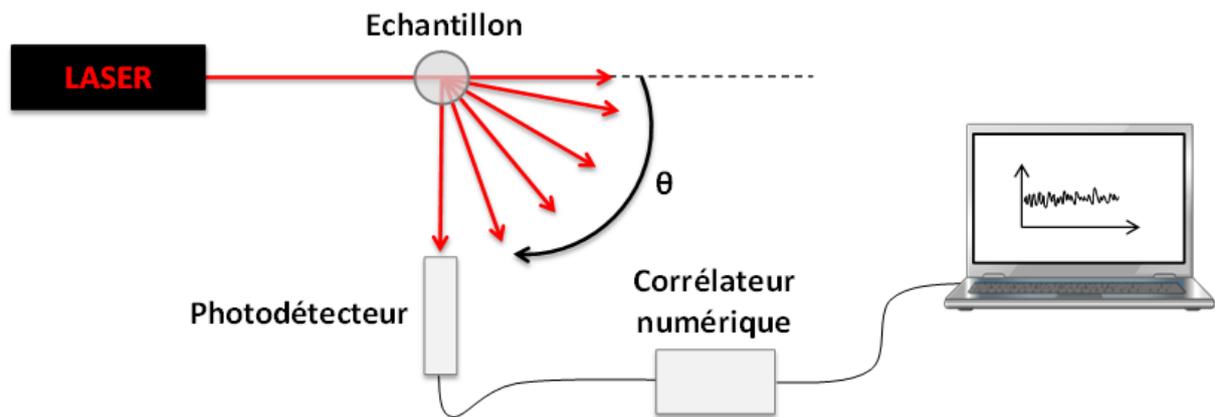


Figure 22 : Représentation schématique du montage utilisé pour les analyses en diffusion de la lumière.

VII.3.1. Diffusion statique de la lumière (SLS)

La diffusion statique de la lumière (SLS pour Static Light Scattering) consiste à mesurer l'intensité moyenne de la lumière diffusée par l'échantillon en fonction du temps à un angle donné. L'intensité diffusée dépend de la taille des objets en solution, de la concentration et de la masse molaire. Cette technique permet de déterminer la taille d'objets en solution.

Dans le cas de copolymères à blocs amphiphiles, décrits dans la partie VI.3. de ce chapitre, cette technique permet de vérifier avant l'auto-assemblage des copolymères que les chaînes de polymères sont bien séparées et permet de trouver les solvants adéquats permettant cela¹⁶⁴. Ainsi, lorsqu'un polymère est dissous dans un solvant, l'intensité diffusée sera minimale s'il est sous forme non agrégée (ou chaîne unique)¹⁵².

Pour calculer l'intensité diffusée totale par les objets en solution sans prendre en compte l'effet du solvant qui peut lui-même diffuser, il faut soustraire cette contribution. Deux sous-détecteurs sont présents pour chaque mesure, l'intensité diffusée réelle moyenne, $i_{réelle}$, est donnée par l'équation (1)¹⁶⁴ :

$$i_{réelle} = \frac{(CH0_{échantillon} + CH1_{échantillon}) \times 2.10^6}{i_{diode,échantillon}} - \frac{(CH0_{solvant} + CH1_{solvant}) \times 2.10^6}{i_{diode,solvant}} \quad (1)$$

Avec CH0 l'intensité récupérée par le premier sous-détecteur et CH1 l'intensité récupérée par le deuxième sous-détecteur en Hertz, et i_{diode} l'intensité émise par la diode du laser en Hertz.

VII.3.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS pour dynamic light scattering) est une technique permettant de déterminer le diamètre hydrodynamique de particules en suspension dans un liquide. Le diamètre hydrodynamique représente le diamètre d'une sphère théorique ayant le même coefficient de diffusion que la particule étudiée. Le coefficient de diffusion dépend de la taille de la particule, mais aussi de sa charge en surface car celle-ci a une influence sur la sphère de solvation de la particule, soit des molécules de solvants mises en mouvement par celle-ci. Dans ce cas, la taille de la particule est donc surestimée.

La détermination du diamètre hydrodynamique nécessite l'utilisation d'un corrélateur numérique afin d'analyser les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par des nanoparticules en suspension dans le liquide en fonction du temps, Les fluctuations de l'intensité proviennent du mouvement brownien des particules et dépendent de la taille des particules ¹⁶¹. En effet, plus une particule possède une taille importante, plus le mouvement brownien est lent. La viscosité du solvant est très importante car elle agit sur le mouvement brownien. De ce fait, la température, qui fait évoluer la viscosité, doit être connue et contrôlée lors des mesures expérimentale en DLS afin d'éviter des mouvements non aléatoires de convection dans l'échantillon. Ainsi, les particules nanométriques ne sont soumises à aucune interaction autre que le choc entre les particules entre elles et les molécules du solvant.

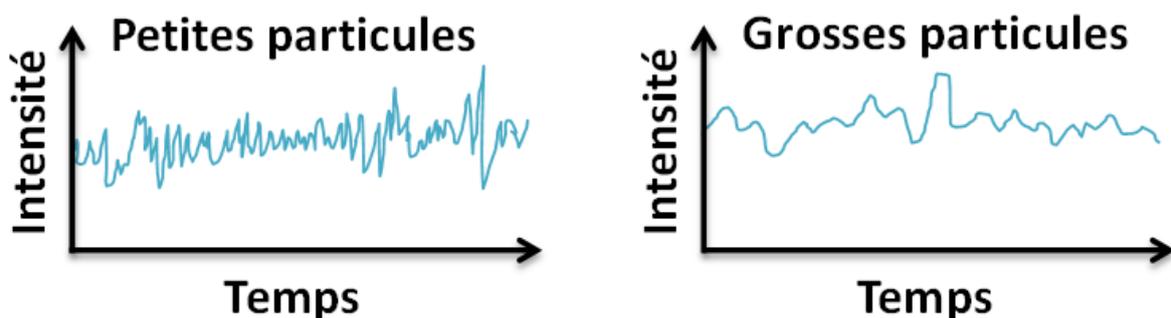


Figure 23 : Fluctuations de l'intensité typiques pour des grandes et petites particules.

Ainsi, la mesure de l'intensité diffusée par le détecteur à un angle donné, permet de calculer une fonction d'autocorrélation entre deux mesures de l'intensité diffusée à des temps successifs δt (Figure 24). C'est cette fonction d'autocorrélation qui permet de remonter à la mesure du rayon hydrodynamique de l'objet étudié.

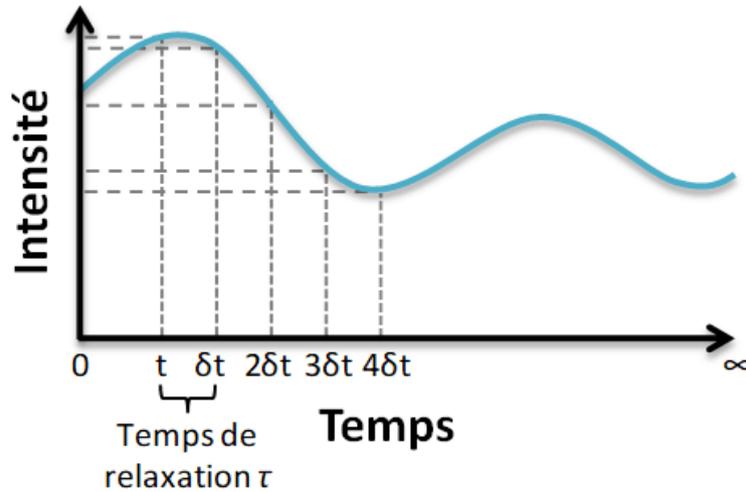


Figure 24 : Fluctuations schématisées de l'intensité d'une lumière diffuse au cours du temps.

Plus spécifiquement, si l'intensité du signal à un temps t est comparée à l'intensité du signal très peu de temps après ($t + \delta t$), une très forte corrélation sera obtenue ¹⁶². Plus le laps de temps entre deux intensités mesurées est court, plus les signaux seront corrélés. De ce fait, la corrélation diminue avec le temps. La période de temps δt est généralement très courte, de l'ordre de quelques nanosecondes (ns). La forme de cette fonction est en général une exponentielle décroissante du temps. Dans la pratique, plus les particules sont larges, plus le signal changera lentement et la corrélation persistera longtemps (Figure 25A). A l'inverse, plus les particules sont petites, plus le signal fluctue rapidement et plus la corrélation diminue rapidement (Figure 25B).

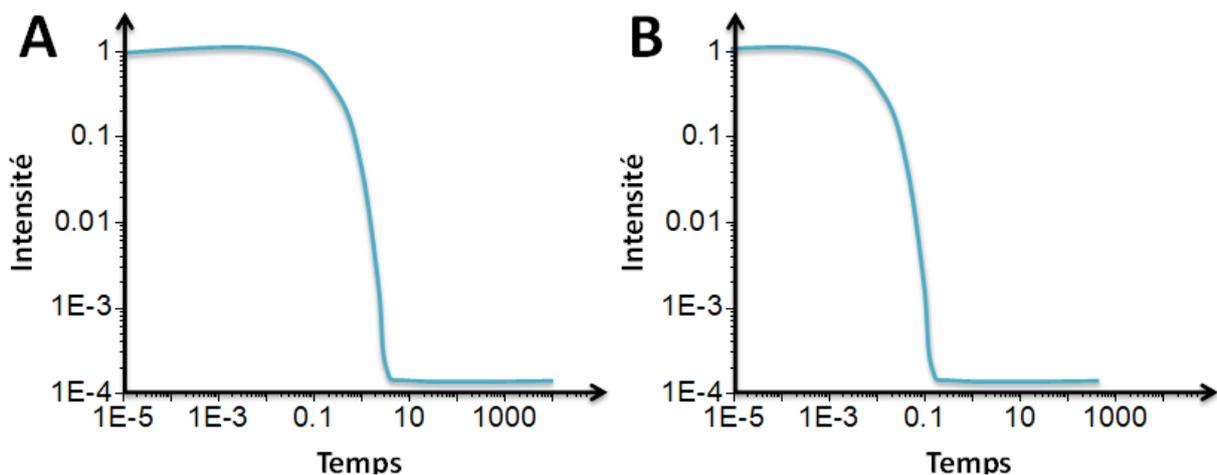


Figure 25 : Corrélogrammes types pour des échantillons contenant des grosses (A) et des petites (B) particules.

L'analyse de cette courbe de corrélation donne donc de nombreux renseignements sur l'échantillon. Le temps à partir duquel la courbe commence à diminuer significativement est

une indication de la taille moyenne des particules de l'échantillon. Par ailleurs, plus la pente est raide, plus l'échantillon est monodisperse ¹⁶².

De nombreux algorithmes sont utilisés pour obtenir une distribution de la taille des particules à partir de la fonction de corrélation. A partir de cette dernière, le coefficient de diffusion, D en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$, qui est défini par la rapidité du mouvement brownien, va être calculé par un traitement numérique. Ce coefficient de diffusion est ensuite relié au diamètre hydrodynamique des particules grâce à la relation de Stokes-Einstein (2) :

$$D_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

Avec K_B la constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T la température (K) et η la viscosité du milieu d'étude (Pa.s).

Pour les échantillons monodisperses, le diamètre hydrodynamique obtenu est précis. En revanche, lorsque les suspensions contiennent plusieurs tailles de particules, l'analyse est plus difficile. En effet, l'intensité diffusée totale évolue fortement avec la taille (soit à la puissance 6 du diamètre). De ce fait, la présence même en très faible quantité d'agrégats ou de grosses particules peut masquer le signal des petites. Il est alors parfois opportun de faire une analyse multi-angulaire de la diffusion de la lumière pour avoir un résultat plus précis. La DLS donne finalement une distribution en poids du diamètre des nanoparticules.

VII.3.3. Suivi individuel de particules (Nanoparticle tracking analysis : NTA)

Afin d'avoir une distribution en nombre de nanoparticules en suspension dans un liquide, une analyse du suivi individuel de particules peut être réalisée (nanoparticle tracking analysis, NTA) ¹⁶⁴. Ici, un microscope optique est utilisé. Un laser monochromatique illumine les nanoparticules en suspension sur une lame dont la température est réglée à 25 °C. Une caméra filme en direct l'échantillon. Un logiciel permet ensuite de suivre le mouvement brownien de chaque particule de la vidéo. Des algorithmes permettent ensuite de calculer la taille des nanoparticules en fonction de ce mouvement, et une distribution en nombre du diamètre des particules est alors obtenue. Néanmoins cette technique n'est pas appropriée pour des particules ayant des diamètres trop faibles (au-dessous de 30 nm) du fait des limitations de résolution de l'appareillage. En revanche elle donne des résultats très précis lorsque le système est monodisperse et dont les tailles sont dans le domaine 30 nm à quelques centaines de nanomètres.

IX. Conclusion

Cette partie présentait de façon très générale les dispositifs électrochimiques, en particulier les biopiles et les biocapteurs. L'utilisation de biomolécules et leur immobilisation sur supports ont été décrites. Une attention particulière a été portée sur l'utilisation de cyclodextrines pour la génération de complexes hôtes-invités en vue d'immobiliser les biomolécules. L'intégration de nanomatériaux, en particulier des nanotubes de carbones, pour la conception d'électrodes plus performantes a été discutée. Différents types de copolymères et d'auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles ont été présentés, ainsi que leur utilisation récente dans des dispositifs électrochimiques. Pour finir, les techniques courantes de caractérisation de nanomatériaux qui ont été utilisées pendant mon travail de thèse ont été présentées.

Références

1. Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B. & Walsh, F. C. Biofuel cells and their development. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 2015–2045 (2006).
2. Schœnbein, C. F. X. *On the voltaic polarization of certain solid and fluid substances:* To the editors of the Philosophical Magazine and Journal. *Philos. Mag. Ser. 3* **14**, 43–45 (1839).
3. Grove, W. R. XXIV. *On voltaic series and the combination of gases by platinum.* *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **14**, 127–130 (1839).
4. Cosnier, S., Le Goff, A. & Holzinger, M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. *Electrochem. Commun.* **38**, 19–23 (2014).
5. Potter, M. C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* **84**, 260–276 (1911).
6. Choi, S. Microscale microbial fuel cells: Advances and challenges. *Biosens. Bioelectron.* **69**, 8–25 (2015).
7. Bhatnagar, D., Xu, S., Fischer, C., Arechederra, R. L. & Minteer, S. D. Mitochondrial biofuel cells: expanding fuel diversity to amino acids. *Phys Chem Chem Phys* **13**, 86–92 (2011).
8. Arechederra, R. & Minteer, S. D. Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes. *Electrochimica Acta* **53**, 6698–6703 (2008).
9. Xiao, X. *et al.* Tackling the Challenges of Enzymatic (Bio)Fuel Cells. *Chem. Rev.* **119**, 9509–9558 (2019).
10. Zebda, A. *et al.* Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nat. Commun.* **2**, 370 (2011).
11. Huang, X. *et al.* Wearable biofuel cells based on the classification of enzyme for high power outputs and lifetimes. *Biosens. Bioelectron.* **124–125**, 40–52 (2019).

12. Pankratov, D. V. *et al.* A Comparative Study of Biocathodes Based on Multiwall Carbon Nanotube Buckypapers Modified with Three Different Multicopper Oxidases. *Electroanalysis* **25**, 1143–1149 (2013).
13. Le Goff, A., Holzinger, M. & Cosnier, S. Recent progress in oxygen-reducing laccase biocathodes for enzymatic biofuel cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 941–952 (2015).
14. Cosnier, S., J. Gross, A., Le Goff, A. & Holzinger, M. Recent advances on enzymatic glucose/oxygen and hydrogen/oxygen biofuel cells: Achievements and limitations. *J. Power Sources* **325**, 252–263 (2016).
15. Gentil, S. *et al.* Direct Electrochemistry of Bilirubin Oxidase from *Magnaporthe oryzae* on Covalently-Functionalized MWCNT for the Design of High-Performance Oxygen-Reducing Biocathodes. *Chem. - Eur. J.* **24**, 8404–8408 (2018).
16. Lalaoui, N., Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, S. Diazonium Functionalisation of Carbon Nanotubes for Specific Orientation of Multicopper Oxidases: Controlling Electron Entry Points and Oxygen Diffusion to the Enzyme. *Chem. - Eur. J.* **22**, 10494–10500 (2016).
17. Lalaoui, N. *et al.* Direct Electron Transfer between a Site-Specific Pyrene-Modified Laccase and Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Supramolecular Assemblies for Bioelectrocatalytic Dioxygen Reduction. *ACS Catal.* **6**, 1894–1900 (2016).
18. Jamshidinia, Z. *et al.* Investigation of Direct and Mediated Electron Transfer of Laccase-Based Biocathode. *J. Electrochem. Sci. Technol.* **8**, 87–95 (2017).
19. Tsujimura, S. *et al.* Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator. *J. Electroanal. Chem.* **496**, 69–75 (2001).
20. Nasar, A. & Perveen, R. Applications of enzymatic biofuel cells in bioelectronic devices – A review. *Int. J. Hydrog. Energy* **44**, 15287–15312 (2019).
21. Gentil, S. *et al.* Carbon-Nanotube-Supported Bio-Inspired Nickel Catalyst and Its Integration in Hybrid Hydrogen/Air Fuel Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 1845–1849 (2017).
22. Švitel, J. Development of Tyrosinase-Based Biosensor and Its Application for Monitoring of Bioremediation of Phenol and Phenolic Compounds. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 828–832 (1998).
23. Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M. J. & Barceló, D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 1025–1041 (2006).
24. Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I. & Palleschi, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1405–1423 (2006).
25. Seven, B. *et al.* Impedimetric biosensor for cancer cell detection. *Electrochem. Commun.* **37**, 36–39 (2013).
26. de la Escosura-Muñiz, A., Parolo, C. & Merkoçi, A. Immunosensing using nanoparticles. *Mater. Today* **13**, 24–34 (2010).
27. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1747 (2010).

28. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
29. Hosu, O. *et al.* Nanostructured photoactivatable electrode surface based on pyrene diazirine. *Electrochem. Commun.* **80**, 5–8 (2017).
30. Márquez, A., Jiménez-Jorquera, C., Domínguez, C. & Muñoz-Berbel, X. Electrodepositable alginate membranes for enzymatic sensors: An amperometric glucose biosensor for whole blood analysis. *Biosens. Bioelectron.* **97**, 136–142 (2017).
31. Goff, A. L. *et al.* Facile and tunable functionalization of carbon nanotube electrodes with ferrocene by covalent coupling and π -stacking interactions and their relevance to glucose bio-sensing. *J. Electroanal. Chem.* **641**, 57–63 (2010).
32. MacAodha, D., Ferrer, M. L., Conghaile, P. Ó., Kavanagh, P. & Leech, D. Crosslinked redox polymer enzyme electrodes containing carbon nanotubes for high and stable glucose oxidation current. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 14667 (2012).
33. Bennett, R. & Leech, D. Improved operational stability of mediated glucose enzyme electrodes for operation in human physiological solutions. *Bioelectrochemistry* **133**, 107460 (2020).
34. Sempionatto, J. R. *et al.* Eyeglasses-based tear biosensing system: Non-invasive detection of alcohol, vitamins and glucose. *Biosens. Bioelectron.* **137**, 161–170 (2019).
35. Zhang, J., Hodge, W., Hutnick, C. & Wang, X. Noninvasive Diagnostic Devices for Diabetes through Measuring Tear Glucose. *J. Diabetes Sci. Technol.* **5**, 166–172 (2011).
36. Cesewski, E. & Johnson, B. N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.* **159**, 112214 (2020).
37. Lu, L. Recent advances in synthesis of three-dimensional porous graphene and its applications in construction of electrochemical (bio)sensors for small biomolecules detection. *Biosens. Bioelectron.* **110**, 180–192 (2018).
38. Gui, R., Jin, H., Guo, H. & Wang, Z. Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **100**, 56–70 (2018).
39. Halsall, H. B., Heineman, W. R., Farrell, S. & Ronkainen-Matsuno, N. J. Bead-based immunoassays with microelectrode detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 358–367 (2004).
40. Lawal, A. T. Progress in utilisation of graphene for electrochemical biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **106**, 149–178 (2018).
41. Pundir, C. S., Malik, A. & Preety. Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review. *Biosens. Bioelectron.* **140**, 111348 (2019).
42. Yao, H., Jenkins, S. H., Pesce, A. J., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Electrochemical homogeneous enzyme immunoassay of theophylline in hemolyzed, icteric, and lipemic samples. *Clin. Chem.* **39**, 1432–1434 (1993).
43. Tsouti, V., Boutopoulos, C., Zergioti, I. & Chatzandroulis, S. Capacitive microsystems for biological sensing. *Biosens. Bioelectron.* **27**, 1–11 (2011).
44. Chu, Z., Peng, J. & Jin, W. Advanced nanomaterial inks for screen-printed chemical sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **243**, 919–926 (2017).
45. Pan, C., Wei, H., Han, Z., Wu, F. & Mao, L. Enzymatic electrochemical biosensors for in situ neurochemical measurement. *Curr. Opin. Electrochem.* **19**, 162–167 (2020).

46. Bollella, P. & Gorton, L. Enzyme based amperometric biosensors. *Curr. Opin. Electrochem.* **10**, 157–173 (2018).
47. Sabu, C., Henna, T. K., Raphey, V. R., Nivitha, K. P. & Pramod, K. Advanced biosensors for glucose and insulin. *Biosens. Bioelectron.* **141**, 111201 (2019).
48. Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.* **108**, 814–825 (2008).
49. Ghindilis, A. L., Atanasov, P. & Wilkins, E. Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis* **9**, 661–674 (1997).
50. Zhang, Y., Tsitkov, S. & Hess, H. Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase–horseradish peroxidase cascade. *Nat. Commun.* **7**, 13982 (2016).
51. Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. Urea-specific enzyme electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2164–2165 (1969).
52. Ding, J. & Qin, W. Recent advances in potentiometric biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **124**, 115803 (2020).
53. Palomar, Q., Gondran, C., Holzinger, M., Marks, R. & Cosnier, S. Controlled carbon nanotube layers for impedimetric immunosensors: High performance label free detection and quantification of anti-cholera toxin antibody. *Biosens. Bioelectron.* **97**, 177–183 (2017).
54. Palomar, Q., Gondran, C., Marks, R., Cosnier, S. & Holzinger, M. Impedimetric quantification of anti-dengue antibodies using functional carbon nanotube deposits validated with blood plasma assays. *Electrochimica Acta* **274**, 84–90 (2018).
55. Kazane, I. *et al.* Highly Sensitive Bisphenol-A Electrochemical Aptasensor Based on Poly(Pyrrole-Nitrilotriacetic Acid)-Aptamer Film. *Anal. Chem.* **88**, 7268–7273 (2016).
56. Brunner, J. New Photolabeling and Crosslinking Methods. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 483–514 (1993).
57. Herzog, G., Gorgy, K., Gulon, T. & Cosnier, S. Electrogenation and characterization of photoactivable films and their application for enzyme grafting. *Electrochem. Commun.* **7**, 808–814 (2005).
58. Holmberg, A. *et al.* The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *ELECTROPHORESIS* **26**, 501–510 (2005).
59. Haddour, N., Cosnier, S. & Gondran, C. Electrogenation of a Poly(pyrrole)-NTA Chelator Film for a Reversible Oriented Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5752–5753 (2005).
60. Lalaoui, N., Le Goff, A., Holzinger, M. & Cosnier, S. Fully Oriented Bilirubin Oxidase on Porphyrin-Functionalized Carbon Nanotube Electrodes for Electrocatalytic Oxygen Reduction. *Chem. - Eur. J.* **21**, 16868–16873 (2015).
61. Ben Tahar, A. *et al.* High catalytic performance of laccase wired to naphthylated multiwall carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* **151**, 111961 (2020).
62. Lalaoui, N. *et al.* Hosting Adamantane in the Substrate Pocket of Laccase: Direct Bioelectrocatalytic Reduction of O₂ on Functionalized Carbon Nanotubes. *ACS Catal.* **6**, 4259–4264 (2016).

63. Charbonnier, F. & Penadés, S. A Straightforward Synthesis of 1-Adamantylmethyl Glycosides, and Their Binding to Cyclodextrins. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3650–3656 (2004).
64. Holzinger, M., Singh, M. & Cosnier, S. Biotin- β -Cyclodextrin: A New Host-Guest System for the Immobilization of Biomolecules. *Langmuir* **28**, 12569–12574 (2012).
65. Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **114**, 10940–10975 (2014).
66. Saenger, W. Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19**, 344–362 (1980).
67. Bakshi, P. R. & Londhe, V. Y. Widespread applications of host-guest interactive cyclodextrin functionalized polymer nanocomposites: Its meta-analysis and review. *Carbohydr. Polym.* **242**, 116430 (2020).
68. Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1743–1754 (1998).
69. Lichtenthaler, F. W. & Immel, S. Molecular Modelling of Saccharides, 9!! On the Hydrophobic Characteristics of Cyclodextrins: Computer-Aided Visualization of Molecular Lipophilicity Patterns. *Liebigs Ann.* **1996**, 27–37 (2006).
70. Connors, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* **97**, 1325–1358 (1997).
71. Zhou, J. & Ritter, H. Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems. *Polym. Chem.* **1**, 1552 (2010).
72. Jozwiakowski, M. J. & Connors, K. A. Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydr. Res.* **143**, 51–59 (1985).
73. Jaime, C., Redondo, J., Sanchez-Ferrando, F. & Virgili, A. Solution geometry of .beta.-cyclodextrin-1-bromoadamantane host-guest complex as determined by $^1\text{H}[^1\text{H}]$ intermolecular NOE and MM2 calculations. *J. Org. Chem.* **55**, 4772–4776 (1990).
74. Schönbeck, C. Charge Determines Guest Orientation: A Combined NMR and Molecular Dynamics Study of β -Cyclodextrins and Adamantane Derivatives. *J. Phys. Chem. B* **122**, 4821–4827 (2018).
75. Dang, X.-J., Nie, M.-Y., Tong, J. & Li, H.-L. Inclusion of the parent molecules of some drugs with β -cyclodextrin studied by electrochemical and spectrometric methods. *J. Electroanal. Chem.* **448**, 61–67 (1998).
76. Dang, X.-J., Tong, R. & Li, H.-L. The electrochemistry of the inclusion complex of anthraquinone with β -Cyclodextrin studied by means of OSWV. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **24**, 275–286 (1996).
77. Lindner, K. & Saenger, W. β -Cyclodextrin Dodecahydrate: Crowding of Water Molecules within a Hydrophobic Cavity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17**, 694–695 (1978).
78. Harata, K. The Structure of the Cyclodextrin Complex. XX. Crystal Structure of Uncomplexed Hydrated γ -Cyclodextrin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 2763–2767 (1987).
79. Hamilton, J. A. & Sabesan, M. N. Structure of a complex of cycloheptaamylose with 1-adamantanecarboxylic acid. *Acta Crystallogr. B* **38**, 3063–3069 (1982).
80. Hamilton, J. A. Structure of inclusion complexes of cyclomaltoheptaose (cycloheptaamylose): Crystal structure of the 1-adamantanemethanol adduct. *Carbohydr. Res.* **142**, 21–37 (1985).

81. Niu, X. *et al.* Advances in the use of functional composites of β -cyclodextrin in electrochemical sensors. *Microchim. Acta* **185**, 328 (2018).
82. Ferancova, A. & Labuda, J. Cyclodextrins as electrode modifiers. *Fresenius J. Anal. Chem.* **370**, 1–10 (2001).
83. Fritea, L., Tertis, M., Cosnier, S., Cristea, C. & Sandulescu, R. A Novel Reduced Graphene Oxide/beta-Cyclodextrin/Tyrosinase Biosensor for Dopamine Detection. *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 7292–7302 (2015).
84. Radi, A.-E. Electrochemistry of Cyclodextrin Inclusion Complexes of Pharmaceutical Compounds. *Open Chem. Biomed. Methods J.* **3**, 74–85 (2010).
85. Fritea, L., Tertis, M., Cristea, C., Cosnier, S. & Săndulescu, R. Simultaneous Determination of Ascorbic and Uric Acids in Urine Using an Innovative Electrochemical Sensor Based on β -Cyclodextrin. *Anal. Lett.* **48**, 89–99 (2015).
86. Casulli, Taurino, Carrara & Hayashita. Integration Methods of Cyclodextrins on Gold and Carbon Electrodes for Electrochemical Sensors. *C — J. Carbon Res.* **5**, 78 (2019).
87. Lenik, J. Cyclodextrins Based Electrochemical Sensors for Biomedical and Pharmaceutical Analysis. *Curr. Med. Chem.* **24**, (2017).
88. García, M., Bollo, S., Rivas, G. A., Ferreyra, N. F. & Yáñez, C. Bottom up approaches for amino β -CD adsorption on gold surfaces. A comparative study. *Electrochimica Acta* **203**, 292–300 (2016).
89. Godínez, L. A. *et al.* Multilayer Self-Assembly of Amphiphilic Cyclodextrin Hosts on Bare and Modified Gold Substrates: Controlling Aggregation via Surface Modification. *Langmuir* **14**, 137–144 (1998).
90. Liu, Y., Wei, M., Hu, Y., Zhu, L. & Du, J. An electrochemical sensor based on a molecularly imprinted polymer for determination of anticancer drug Mitoxantrone. *Sens. Actuators B Chem.* **255**, 544–551 (2018).
91. Wu, T., Wei, X., Ma, X. & Li, J. Amperometric sensing of L-phenylalanine using a gold electrode modified with a metal organic framework, a molecularly imprinted polymer, and β -cyclodextrin-functionalized gold nanoparticles. *Microchim. Acta* **184**, 2901–2907 (2017).
92. Villalonga, R. *et al.* Layer-by-layer supramolecular architecture of cyclodextrin-modified PAMAM dendrimers and adamantane-modified peroxidase on gold surface for electrochemical biosensing. *Electrochimica Acta* **76**, 249–255 (2012).
93. Díez, P., Villalonga, R., Villalonga, M. L. & Pingarrón, J. M. Supramolecular immobilization of redox enzymes on cyclodextrin-coated magnetic nanoparticles for biosensing applications. *J. Colloid Interface Sci.* **386**, 181–188 (2012).
94. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S. & Ananthanarayan, L. Glucose oxidase — An overview. *Biotechnol. Adv.* **27**, 489–501 (2009).
95. Wohlfahrt, G. *et al.* 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 969–977 (1999).
96. Kommoju, P., Chen, Z., Bruckner, R. C., Mathews, F. S. & Jorns, M. S. Crystal structure of glucose oxidase for space group C2221 at 1.2 Å resolution. *Protein Data Bank* https://www ww p d b . o r g / p d b ? i d = p d b _ 0 0 0 0 3 q v p (2011).

97. Holzinger, M., Bouffier, L., Villalonga, R. & Cosnier, S. Adamantane/ β -cyclodextrin affinity biosensors based on single-walled carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1128–1134 (2009).
98. Le Goff, A. *et al.* Tris(bispyrene-bipyridine)iron(II): A Supramolecular Bridge for the Biofunctionalization of Carbon Nanotubes via π -Stacking and Pyrene/ β -Cyclodextrin Host-Guest Interactions. *Chem. - Eur. J.* **17**, 10216–10221 (2011).
99. Haddad, R. *et al.* Pyrene-adamantane- β -cyclodextrin: An efficient host-guest system for the biofunctionalization of SWCNT electrodes. *Carbon* **49**, 2571–2578 (2011).
100. Fritea, L. *et al.* Fluorescent and redox tetrazine films by host-guest immobilization of tetrazine derivatives within poly(pyrrole- β -cyclodextrin) films. *J. Electroanal. Chem.* **781**, 36–40 (2016).
101. Jayathilaka, W. A. D. M. *et al.* Significance of Nanomaterials in Wearables: A Review on Wearable Actuators and Sensors. *Adv. Mater.* **31**, 1805921 (2019).
102. Patra, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* **16**, 71 (2018).
103. Yan, Y. *et al.* Recent Advances on Graphene Quantum Dots: From Chemistry and Physics to Applications. *Adv. Mater.* **31**, 1808283 (2019).
104. Luo, X., Morrin, A., Killard, A. J. & Smyth, M. R. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis* **18**, 319–326 (2006).
105. Wongkaew, N., Simsek, M., Griesche, C. & Baeumner, A. J. Functional Nanomaterials and Nanostructures Enhancing Electrochemical Biosensors and Lab-on-a-Chip Performances: Recent Progress, Applications, and Future Perspective. *Chem. Rev.* **119**, 120–194 (2019).
106. De Crozals, G., Bonnet, R., Farre, C. & Chaix, C. Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide. *Nano Today* **11**, 435–463 (2016).
107. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A. & Danquah, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* **9**, 1050–1074 (2018).
108. Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (Afsset). Les nanomatériaux - Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. (2006).
109. Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front. Chem.* **2**, (2014).
110. Su, S. *et al.* Two-dimensional nanomaterials for biosensing applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **119**, 115610 (2019).
111. Tang, J. *et al.* Development of graphene-based enzymatic biofuel cells: A minireview. *Bioelectrochemistry* **134**, 107537 (2020).
112. Cho, I.-H., Kim, D. H. & Park, S. Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomater. Res.* **24**, 6 (2020).
113. Huang, H. & Zhu, J.-J. The electrochemical applications of quantum dots. *The Analyst* **138**, 5855 (2013).
114. Kokkinos, C. *et al.* Lab-on-a-Membrane Foldable Devices for Duplex Drop-Volume Electrochemical Biosensing Using Quantum Dot Tags. *Anal. Chem.* **88**, 6897–6904 (2016).

115. Zhou, S., Wang, Y. & Zhu, J.-J. Simultaneous Detection of Tumor Cell Apoptosis Regulators Bcl-2 and Bax through a Dual-Signal-Marked Electrochemical Immunosensor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 7674–7682 (2016).
116. An, K. & Somorjai, G. A. Size and Shape Control of Metal Nanoparticles for Reaction Selectivity in Catalysis. *ChemCatChem* **4**, 1512–1524 (2012).
117. Rhouati, A., Majdinasab, M. & Hayat, A. A perspective on non-enzymatic electrochemical nanosensors for direct detection of pesticides. *Curr. Opin. Electrochem.* **11**, 12–18 (2018).
118. Baughman, R. H. Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. *Science* **297**, 787–792 (2002).
119. Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, S. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. *Electrochimica Acta* **82**, 179–190 (2012).
120. Singh, P. *et al.* Organic functionalisation and characterisation of single-walled carbon nanotubes. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2214 (2009).
121. Sánchez-Tirado, E., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J. M. Carbon nanotubes functionalized by click chemistry as scaffolds for the preparation of electrochemical immunosensors. Application to the determination of TGF-beta 1 cytokine. *The Analyst* **141**, 5730–5737 (2016).
122. Delgado, J. L. *et al.* Microwave-assisted sidewall functionalization of single-wall carbon nanotubes by Diels–Alder cycloaddition. *Chem Commun* 1734–1735 (2004) doi:10.1039/B402375G.
123. Bahr, J. L. *et al.* Functionalization of Carbon Nanotubes by Electrochemical Reduction of Aryl Diazonium Salts: A Bucky Paper Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6536–6542 (2001).
124. Balavoine, F. *et al.* Helical Crystallization of Proteins on Carbon Nanotubes: A First Step towards the Development of New Biosensors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1912–1915 (1999).
125. Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D. & Dai, H. Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3838–3839 (2001).
126. Elouarzaki, K. *et al.* Synthesis and electrochemical characterization of original “TEMPO” functionalized multiwall carbon nanotube materials: Application to iron (II) detection. *Electrochem. Commun.* **60**, 131–134 (2015).
127. Zhang, X. *et al.* Highly selective and active CO₂ reduction electrocatalysts based on cobalt phthalocyanine/carbon nanotube hybrid structures. *Nat. Commun.* **8**, 14675 (2017).
128. Lalaoui, N., Elouarzaki, K., Goff, A. L., Holzinger, M. & Cosnier, S. Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes. *Chem. Commun.* **49**, 9281 (2013).
129. Han, Y. & Ho, W. S. W. Recent developments on polymeric membranes for CO₂ capture from flue gas. *J. Polym. Eng.* **40**, 529–542 (2020).
130. Dong, K., Peng, X. & Wang, Z. L. Fiber/Fabric-Based Piezoelectric and Triboelectric Nanogenerators for Flexible/Stretchable and Wearable Electronics and Artificial Intelligence. *Adv. Mater.* **32**, 1902549 (2020).

131. Das, S. S. *et al.* Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery, Imaging, and Theragnosis. *Polymers* **12**, 1397 (2020).
132. Cosnier, S. Recent Advances in Biological Sensors Based on Electrogenerated Polymers: A Review. *Anal. Lett.* **40**, 1260–1279 (2007).
133. Loos, K. & Müller, A. H. E. New Routes to the Synthesis of Amylose- *block* - polystyrene Rod–Coil Block Copolymers. *Biomacromolecules* **3**, 368–373 (2002).
134. Epps, III, T. H. & O'Reilly, R. K. Block copolymers: controlling nanostructure to generate functional materials – synthesis, characterization, and engineering. *Chem. Sci.* **7**, 1674–1689 (2016).
135. Gregory, G. L., López-Vidal, E. M. & Buchard, A. Polymers from sugars: cyclic monomer synthesis, ring-opening polymerisation, material properties and applications. *Chem. Commun.* **53**, 2198–2217 (2017).
136. Gonçalves, S. de Á. & Vieira, R. P. Current status of ATRP-based materials for gene therapy. *React. Funct. Polym.* **147**, 104453 (2020).
137. Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Third Update. *Aust. J. Chem.* **65**, 985 (2012).
138. Wang, Z. *et al.* Functional Glycopolypeptides: Synthesis and Biomedical Applications. *Adv. Polym. Technol.* **2020**, 1–16 (2020).
139. Kakuchi, T. *et al.* Glycoconjugated Polymer. 4. Synthesis and Aggregation Property of Well-Defined End-Functionalized Polystyrene with β -Cyclodextrin. *Macromolecules* **36**, 3909–3913 (2003).
140. Park, J. H. *et al.* Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 113–137 (2008).
141. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F. & Farokhzad, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2971 (2012).
142. Suriano, F., Coulembier, O., Degée, P. & Dubois, P. Carbohydrate-based amphiphilic diblock copolymers: Synthesis, characterization, and aqueous properties. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **46**, 3662–3672 (2008).
143. Xu, Z. *et al.* Unimolecular micelles of amphiphilic cyclodextrin-core star-like block copolymers for anticancer drug delivery. *Chem. Commun.* **51**, 15768–15771 (2015).
144. He, Q. *et al.* Controlled drug release system based on cyclodextrin-conjugated poly(lactic acid)-*b*-poly(ethylene glycol) micelles. *Int. J. Pharm.* **443**, 110–119 (2013).
145. Cameron, N. S., Corbierre, M. K. & Eisenberg, A. 1998 E.W.R. Steacie Award Lecture Asymmetric amphiphilic block copolymers in solution: a morphological wonderland. *Can. J. Chem.* **77**, 1311–1326 (1999).
146. Mai, Y. & Eisenberg, A. Self-assembly of block copolymers. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5969 (2012).
147. Kramer, J. R., Rodriguez, A. R., Choe, U.-J., Kamei, D. T. & Deming, T. J. Glycopolypeptide conformations in bioactive block copolymer assemblies influence their nanoscale morphology. *Soft Matter* **9**, 3389 (2013).

148. Blanazs, A., Madsen, J., Battaglia, G., Ryan, A. J. & Armes, S. P. Mechanistic Insights for Block Copolymer Morphologies: How Do Worms Form Vesicles? *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16581–16587 (2011).
149. Zhang, W.-J., Hong, C.-Y. & Pan, C.-Y. Formation of Hexagonally Packed Hollow Hoops and Morphology Transition in RAFT Ethanol Dispersion Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **36**, 1428–1436 (2015).
150. Isono, T. *et al.* Self-Assembly of Maltoheptaose- *block* -polycaprolactone Copolymers: Carbohydrate-Decorated Nanoparticles with Tunable Morphology and Size in Aqueous Media. *Macromolecules* **49**, 4178–4194 (2016).
151. Zhang, X., Chen, K., Xie, K. & Long, Y. Self-assembly of monodisperse polymer microspheres from PPQ-b-PEG rod-coil block copolymers in selective solvents. *Sci. China Ser. B Chem.* **48**, 42–48 (2005).
152. Giacomelli, C. *et al.* Aqueous Self-Assembly of Polystyrene Chains End-Functionalized with β -Cyclodextrin. *Biomacromolecules* **10**, 449–453 (2009).
153. Otsuka, I. *et al.* Self-Assembly of Maltoheptaose- *block* -Polystyrene into Micellar Nanoparticles and Encapsulation of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **29**, 15224–15230 (2013).
154. Gross, A. J. *et al.* Redox-Active Glyconanoparticles as Electron Shuttles for Mediated Electron Transfer with Bilirubin Oxidase in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 16076–16079 (2017).
155. Hammond, J. L. *et al.* Solubilized Enzymatic Fuel Cell (SEFC) for Quasi-Continuous Operation Exploiting Carbohydrate Block Copolymer Glyconanoparticle Mediators. *ACS Energy Lett.* **4**, 142–148 (2019).
156. Mourdikoudis, S., Pallares, R. M. & Thanh, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* **10**, 12871–12934 (2018).
157. Oatley, C. W. The scanning electron microscope. *Sci. Prog.* **54**, 483–495 (1966).
158. Reichelt, R. Scanning Electron Microscopy. in *Science of Microscopy* (eds. Hawkes, P. W. & Spence, J. C. H.) 133–272 (Springer New York, 2007). doi:10.1007/978-0-387-49762-4_3.
159. *Electron Microscopy of Polymers*. (Springer Berlin Heidelberg, 2008). doi:10.1007/978-3-540-36352-1.
160. Ruska, E. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Rev. Mod. Phys.* **59**, 627–638 (1987).
161. Abdelbassit Boualem. Estimation de distribution de tailles de particules par techniques d'inférence bayésienne. (Université d'Orléans, 2016).
162. Note technique, Malvern Panalytical, <https://www.malvernpanalytical.com/en/DynamicLightScattering:AnIntroductionin30Minutes>.
163. Jones, A. R. Light scattering for particle characterization. *Prog. Energy Combust. Sci.* **25**, 1–53 (1999).
164. Caldas, B. S. *et al.* Drug carrier systems made from self-assembled glyconanoparticles of maltoheptaose-b-polyisoprene enhanced the distribution and activity of curcumin against cancer cells. *J. Mol. Liq.* **309**, 113022 (2020).

Chapitre II

Assemblage, fonctionnalisation et caractérisations physico-chimique et électrochimique de glyconanoparticules à base de polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine (PSCD) et d'anthraquinone

Sommaire

I. Introduction.....	66
II. Assemblage des glyconanoparticules à base de PSCD	68
II.1. Choix du solvant.....	68
II.2. Description de la méthode d'assemblage	70
III. Caractérisations physico-chimiques des glyconanoparticules GNP_{PSCD} et $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$	71
III.1. Détermination de la morphologie et la taille des particules par microscopie électronique à transmission (MET)	71
III.2. Détermination de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	74
III.3. Caractérisation spectroscopique RAMAN de GNP_{PSCD} et de $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$	77
IV. Propriétés électrochimiques des glyconanoparticules GNP_{PSCD} et $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$	79
IV.1. En solution	79
IV.2. Sur électrodes de carbone	83
IV.3. Sur électrode de carbone recouvertes de nanotubes de carbone	87
V. Conclusion.....	90
Références	90

I. Introduction

Comme rappelé dans le chapitre bibliographique, l'émergence des nanomatériaux ces deux dernières décennies a permis, via leur intégration dans les dispositifs analytiques tels que les biopiles et les biocapteurs, d'améliorer les performances de ceux-ci avec une augmentation importante des sensibilités pour les biocapteurs en association avec des seuils de détection améliorés ainsi qu'à une augmentation des puissances pour les biopiles. Leur utilisation permet d'obtenir une surface spécifique élevée et la nature du matériau est à choisir en fonction de l'application envisagée. Les particules utilisées sont souvent métalliques afin d'augmenter les propriétés de conduction mais l'inconvénient réside dans le fait que celles-ci doivent être fonctionnalisées pour fixer la molécule biologique, ce qui peut être fastidieux et coûteux. Ainsi, nous nous sommes intéressés à concevoir des glyconanoparticules (GNPs) électroactives à base de cyclodextrines qui constituent une plateforme versatile¹ permettant d'insérer, via des interactions hôte-invité, diverses molécules, dont le choix dépendra de la l'application envisagée.

Dans ce chapitre, la préparation des glyconanoparticules micellaires repose sur l'auto-assemblage en solution aqueuse du polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine (PSCD, Schéma 1) en utilisant la méthode de précipitation directe. Comme démontré dans la littérature, cette méthode permet d'obtenir des GNPs de petite taille par rapport à la méthode de nanoprecipitation inverse, qui délivre des particules de taille plus élevée¹. Le copolymère à bloc utilisé, est composé d'une chaîne de polystyrène ($M_n = 4500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) modifiée en son extrémité par une β -cyclodextrine (CD) qui possède des propriétés d'inclusion. La synthèse ainsi que la caractérisation structurale de ce copolymère, est rappelée dans la partie expérimentale.

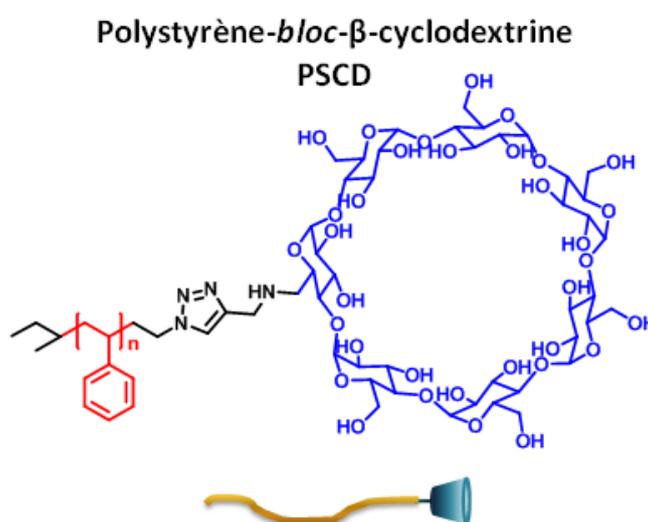


Schéma 1 : Schéma et structure chimique de PSCD.

Afin de rendre électroactives les glyconanoparticules, d'étudier leurs propriétés électrochimiques, et par la suite de les utiliser pour des applications en bioélectrochimie, notamment pour la réalisation de biocathode, l'antraquinone a été choisie comme modèle pour sa très faible solubilité en milieu aqueux ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$)², sa capacité à former des complexes d'inclusion avec la cyclodextrine, et ses propriétés électrochimiques bien établies^{3,4}. Son caractère hydrophobe et sa taille de $5,403 \text{ \AA}$ sur $9,307 \text{ \AA}$ (Schéma 2) lui confèrent des propriétés structurales et physico-chimiques permettant son inclusion dans les cyclodextrines avec un ratio 1 : 1, et une constante d'association K déterminée par différentes méthodes telles que la spectroscopie UV-visible ($K = 222 \text{ L.mol}^{-1}$) et par des méthodes électrochimiques ($K = 286 \text{ L.mol}^{-1}$)^{5,6}. Les études effectuées par Jiang *et al* ont permis de proposer un modèle de la structure résultante de l'interaction entre l'AQ et la CD, l'entité ainsi formé possédant un contact maximal entre parties hydrophobes, avec une inclusion partielle de AQ la structure résultante est stabilisée par des liaisons hydrogène⁷.

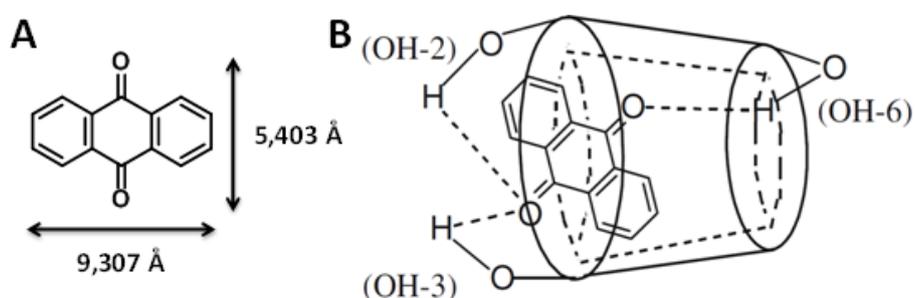


Schéma 2 : Schéma de l'antraquinone (A) et son interaction avec la cyclodextrine (B) d'après⁷.

Dans ce chapitre, les GNPs ont été fonctionnalisées par AQ lors de leur élaboration, ce qu'on appellera par la suite dans ce manuscrit la méthode de « pré-fonctionnalisation ». La morphologie et la taille des GNPs obtenues sont déterminées par microscopie électronique à transmission et par diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering). Les propriétés électrochimiques détaillées des glyconanoparticules ainsi obtenues, notées dans la suite du chapitre $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$, sont étudiées en solution et par immobilisation sur électrodes de carbone et électrodes recouvertes de nanotubes de carbone. Les propriétés de ces glyconanoparticules fonctionnalisées sont comparées tout au long du chapitre aux propriétés des glyconanoparticules non fonctionnalisées par l'antraquinone, qui sont notées GNP_{PSCD} .

II. Assemblage des glyconanoparticules à base de PSCD

II.1. Choix du solvant

Pour réaliser l'auto-assemblage des copolymères, les chaînes de copolymères doivent tout d'abord être solubilisées dans un solvant permettant la solubilisation de chaque composant. Le polystyrène de caractère hydrophobe est soluble dans des solvants organiques tel que le tétrahydrofurane (THF) alors que la β -CD, qui a une surface hydrophile est soluble dans l'eau (concentration massique de $18,5 \text{ g.L}^{-1}$) à 25°C . Ainsi, des mélanges à base de THF et de H_2O en différentes proportions massiques ont été réalisés pour solubiliser respectivement la partie hydrophobe, c'est à dire la chaîne de polystyrène, et la partie hydrophile constituée de sucres. Afin de déterminer le mélange optimal permettant de solubiliser le copolymère, celui-ci a été dissous à une concentration de $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans des solutions contenant différents pourcentages massiques de THF et de H_2O , la solution résultante étant agitée pendant 24 h à 500 rpm. Des photos des différentes solutions obtenues sont présentées sur la Figure 1. De gauche à droite, les mélanges sont constitués de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 % d'eau. Pour les mélanges composés de plus de 70 % d'eau, la solution est légèrement trouble. Pour le mélange composé de 50 % d'eau (tube 50), une solution laiteuse est obtenue alors que pour un mélange composé de 60 % d'eau, la solution est presque opaque (tube 60), suggérant une dissolution partielle du copolymère ou la formation d'agrégats pour ces deux compositions. En revanche, en dessous de 40 % d'eau, les solutions sont transparentes.

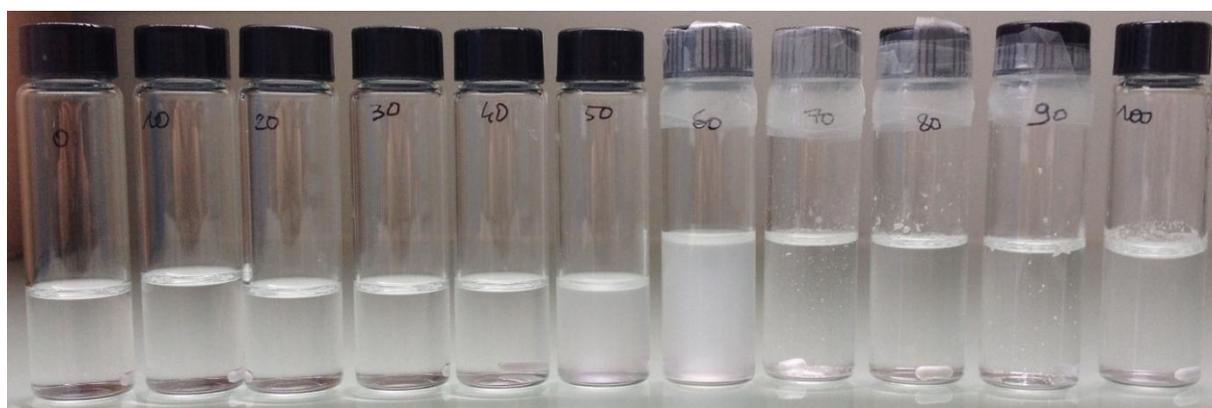


Figure 1 : Photo du polymère PSCD dans différents mélanges de tétrahydrofurane et d'eau. $[\text{PSCD}] = 2 \text{ mg.mL}^{-1}$, De gauche à droite en pourcentages massiques : tube « 0 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 0:100 %, tube « 10 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 10:90 %, tube « 20 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 20:80 %, tube « 30 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 30:70 %, tube « 40 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 40:60 %, tube « 50 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 50:50 %, tube « 60 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 60:40 %, tube « 70 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 70:30 %, tube « 80 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 80:20 %, tube « 90 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 90:10 %, tube « 100 » : $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 100: 0 %.

Les mélanges composés de 0 à 40 % d'eau ont ensuite été étudiées par diffusion statique de la lumière (SLS). Cette technique, comme expliqué dans le chapitre bibliographique, consiste à irradier un échantillon grâce à un laser HeNe monochromatique, de longueur d'onde

$\lambda = 632,8$ nm polarisé linéairement, et mesurer l'intensité diffusée par l'échantillon au cours du temps à un angle donné (90°). Le logarithme décimal de l'intensité diffusée moyenne calculée sur un temps d'irradiation de 60 secondes est reporté sur la Figure 2A en fonction de la fraction massique en THF. On peut constater que pour des mélanges composés entre 70 et 80 % de THF, l'intensité diffusée est faible, ce qui signifie que le copolymère est bien solubilisé. En tenant compte des incertitudes sur les mesures qui sont élevées pour la fraction égale à 70 %, nous avons choisi de conserver le mélange composé de 80 % de THF et 20 % d'eau.

Nous avons ensuite mesuré l'intensité diffusée en choisissant cette composition en solvant de 80 % en THF, et fait varier la concentration en polymère de 1 mg.mL^{-1} à $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Nous pouvons constater sur la Figure 2B que l'intensité diffusée a une valeur moyenne de 22 kHz (moyenne effectuée sur les 3 mesures). On note cependant une incertitude élevée sur la valeur mesurée de I pour une concentration de 1 mg.mL^{-1} ($I = 32 \pm 22 \text{ kHz}$) alors que la valeur de l'incertitude est de 7 kHz pour une intensité de 17 kHz pour une concentration de polymère égale à $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Dans la suite du chapitre, la concentration du copolymère choisie pour réaliser les auto-assemblages est de $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

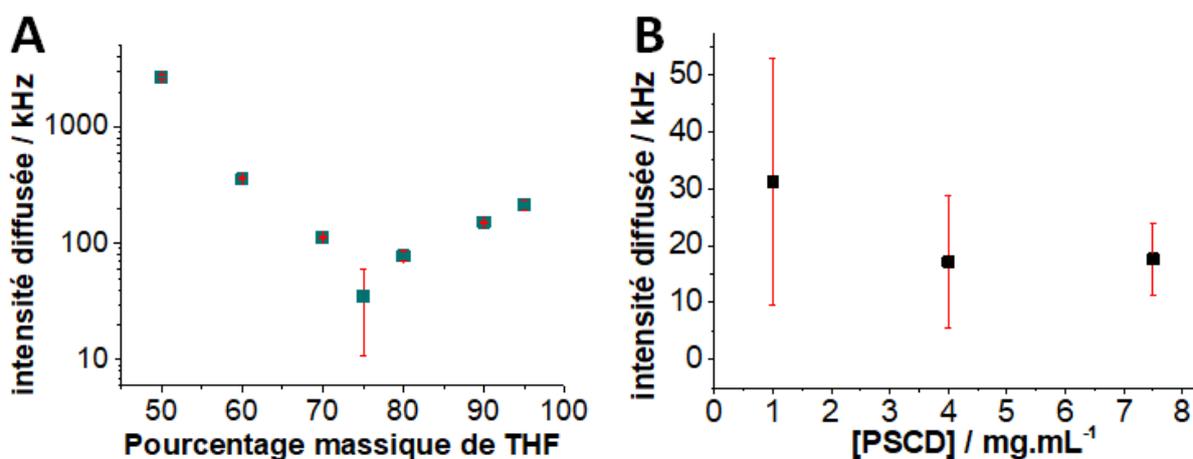


Figure 2 : (A) Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la composition du solvant pour des chaînes de PSCD et (B) évolution de l'intensité diffusée en fonction de la concentration en PSCD. Conditions : (A) $[\text{PSCD}] = 2 \text{ mg.mL}^{-1}$, $\theta = 90^\circ$, $T = 25^\circ\text{C}$, $t_{\text{run}} = 60$ secondes. (B) Evolution de l'intensité diffusée avec une composition de solvant $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 20:80 % en masse, et une concentration en polymère de 1 mg.mL^{-1} ; 4 mg.mL^{-1} et $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

II.2. Description de la méthode d'assemblage

Le Schéma 3 reprend les étapes de l'élaboration des nanoparticules en l'absence ou en présence d'antraquinone.

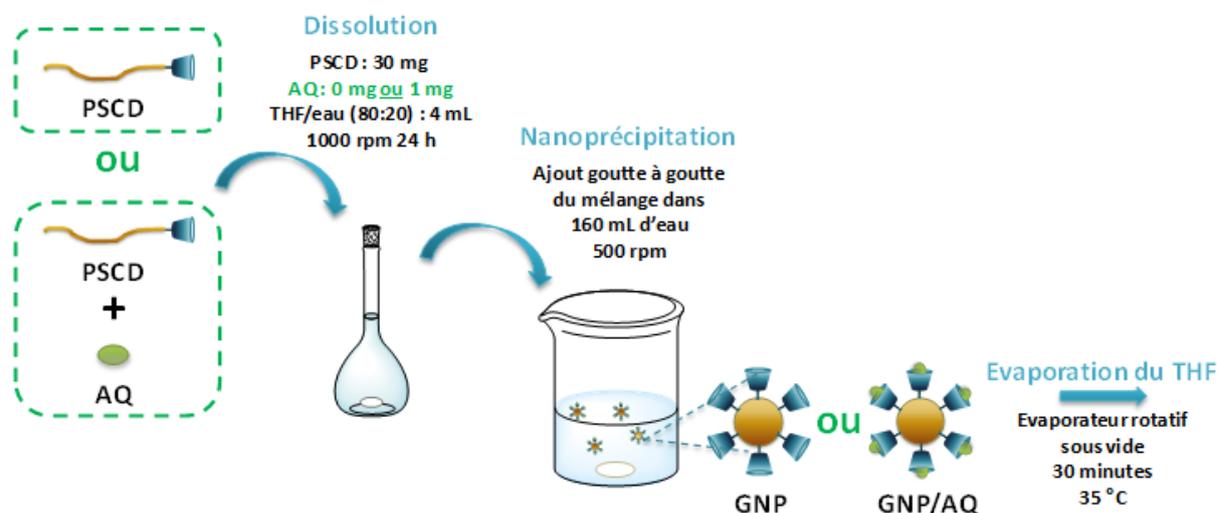


Schéma 3 : Obtention des GNPs et des GNPs modifiées par l'antraquinone (GNP/AQ).

Afin d'obtenir les glyconanoparticules GNP_{PSCD} , à 4 mL de solvant contenant 80 % en masse de THF et 20 % en masse d'eau, 30 mg de copolymère PSCD, sont ajoutés. Une fois la dissolution du copolymère effectuée et après agitation pendant 24 heures, la solution ainsi obtenue est ajoutée gouttes à gouttes dans un grand volume d'eau de 160 mL sous agitation. Afin d'avoir un débit contrôlé et automatisé, un pousse-seringue est utilisé avec un débit de $10,2 \text{ mL.h}^{-1}$. Cette étape de nanoprécipitation permet d'obtenir des structures micellaires, comme déjà démontré dans la littérature, avec un cœur de polystyrène et les sucres en surface⁸. Afin d'obtenir les GNPs modifiées par l'antraquinone qui sont notées $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$, la même procédure d'assemblage est utilisée mais en présence d'antraquinone. Dans les 2 cas d'auto-assemblage des GNPs (en présence ou en l'absence d'antraquinone), après évaporation du THF, une suspension d'aspect laiteuse de GNPs est obtenue. La concentration finale de copolymère est de $0,1875 \text{ mg.mL}^{-1}$, le volume final de la solution étant ajusté minutieusement à 160 mL. Les suspensions de glyconanoparticules ainsi obtenues sont conservées pendant 2 mois à 4 °C.

III. Caractérisations physico-chimiques des glyconanoparticules GNP_{PSCD} et $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$

III.1. Détermination de la morphologie et la taille des particules par microscopie électronique à transmission (MET)

III.1.1. De $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$

Après quelques jours de stockage au réfrigérateur, les $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$ commencent à sédimenter laissant apparaître un surnageant limpide et un culot plus opaque, contrairement aux GNP_{PSCD} . Ainsi, avant chaque utilisation, les $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$ sont soumises à des ultra-sons pendant 20 minutes permettant d'obtenir de nouveau une dispersion d'aspect homogène. Afin de déterminer la forme des objets ainsi que leur taille, des clichés en microscopie électronique à transmission (MET) du culot, du surnageant et après exposition pendant 20 minutes aux ultra-sons, ont été réalisés. Une goutte de la solution de $\text{GNP}_{\text{PSCD}/\text{AQ}}$ est déposée sur une grille de carbone. Le solvant est ensuite retiré par capillarité. Les détails permettant de préparer les échantillons sont rappelés dans la partie expérimentale.

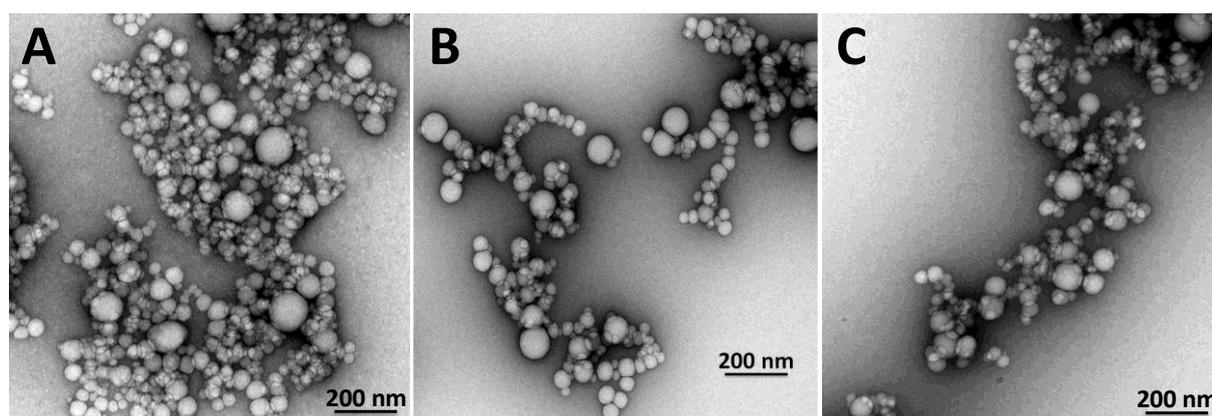


Figure 3 : Cliché de MET des GNP/AQ obtenues par pré-fonctionnalisation et contenues dans le culot (A), dans le surnageant (B) et après exposition à 20 minutes d'ultra-sons (C).

Des GNPs sphériques sont visibles sur les clichés de MET, comme illustré sur la Figure 3, quel que soit l'échantillon observé, comme le culot (Figure 3A), le surnageant (Figure 3B) et le surnageant après exposition aux ultra-sons (Figure 3C). La taille des nanoparticules est mesurée en utilisant un programme de traitement d'images (voir partie expérimentale). Le diamètre d'environ 2000 nanoparticules sur plusieurs images (environ 5) MET différentes ont été mesurées et ont permis de les répartir en nombre selon leur taille. De ce dénombrement, résultent les histogrammes (Figure 4A, 4B, 4C) en traçant le pourcentage des particules en nombre en fonction du diamètre de celles-ci. Comme nous pouvons le constater les distributions sont monomodales et ne sont pas parfaitement symétriques. Dans un premier

temps, ces distributions ont été modélisées par une loi gaussienne mais le coefficient de corrélation était inférieur à 0,975, du fait du caractère asymétrique de l'histogramme.

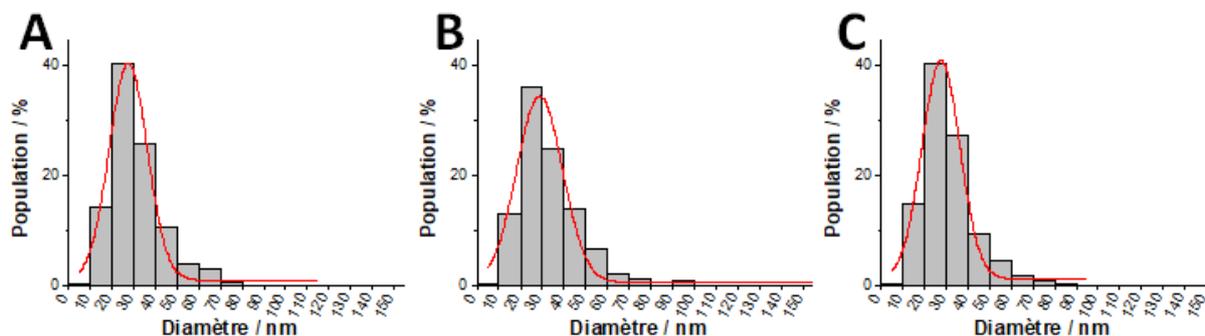


Figure 4 : Distribution du diamètre des GNP_{PSCD/AQ} contenues dans le surnageant du pilulier (A), dans le culot (B), puis suite à une exposition de 20 minutes aux ultra-sons (C). Les modélisations sont réalisées avec une courbe gaussienne. R^2 : (A) = 0,965 ; (B) = 0,943 ; (C) = 0,975.

La valeur qui s'écartait de 1, montrait que l'ajustement des valeurs pouvait être amélioré. En modélisant ces distributions par une loi log-normale (Figure 5A, 5B, 5C), les coefficients de corrélation pour chacune des distributions ont des valeurs supérieures à 0,99 attestant que le modèle choisi est bien adapté.

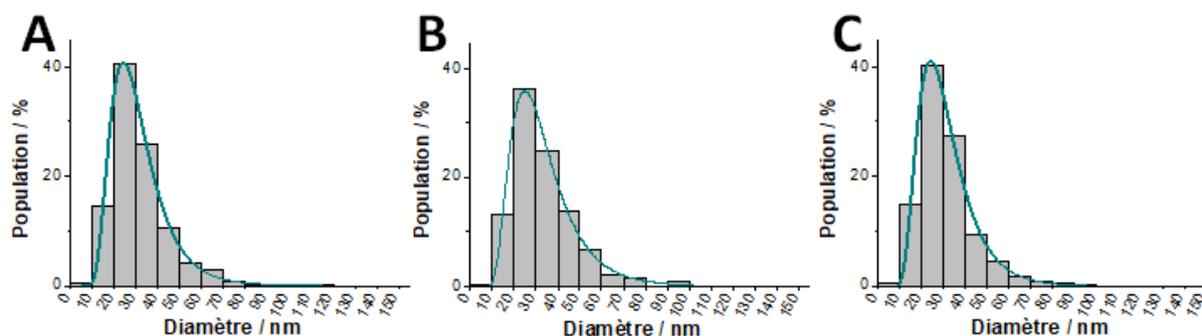


Figure 5 : Distribution du diamètre des GNPs composées de PSCD/AQ contenues dans le surnageant du pilulier (A), dans le culot (B), puis suite à une exposition de 20 minutes aux ultra-sons (C). Les modélisations suivent une loi log-normale. R^2 : (A) = 0,998 ; (B) = 0,999 ; (C) = 0,999.

D'après les profils obtenus, la plus grande proportion des GNPs du surnageant et du culot ont respectivement un diamètre moyen de 24 et 25 nm (Figure 5 et Tableau 1). La répartition de la taille des GNPs du culot est légèrement plus large, avec 99 % des diamètres compris en dessous de 80 nm, tandis que pour le surnageant, 99 % des diamètres sont compris en dessous de 70 nm. Si nous prenons en compte la méthode fastidieuse pour effectuer l'histogramme, les tailles des GNPs du culot et du surnageant sont identiques. Par ailleurs, après une exposition de 20 minutes d'ultra-sons, les GNPs du surnageant ne changent pas de morphologie comme l'attestent les clichés représentés sur la Figure 3C et l'histogramme de la Figure 5C. Le diamètre prépondérant de 24 nm pour les GNPs prélevées dans le surnageant est identique

avant et après exposition aux ultrasons. La distribution est aussi répartie de manière identique, avec 95 % des GNPs ayant un diamètre inférieur à 60 nm et 99 % des GNPs ayant un diamètre inférieur à 70 nm. Ces données attestent que les 20 minutes d’ultrasons n’affectent ni la forme, ni la taille des GNPs.

Tableau 1 : Répartition de l’effectif des GNPs en fonction de leur diamètre et de l’échantillon.

	GNP AQ surnageant	GNP AQ culot	GNP AQ surnageant US
Moyenne	24 nm	25 nm	24 nm
95^{ème} centile	60 nm	60 nm	60 nm
99^{ème} centile	70 nm	80 nm	70 nm

III.1.2. De GNP_{PSCD}

De la même façon que décrite précédemment pour les GNP_{PSCD}/AQ , des clichés ont été réalisés en microscopie électronique à transmission pour les GNP_{PSCD} (Figure 6A). La courbe de distribution obtenue après comptage des particules (Figure 6B) a également été modélisée par une fonction log-normale. De ces données, on peut remarquer que 45 % des GNPs ont un diamètre 21 nm, alors que 95 % des GNPs ont un diamètre inférieur à 50 nm. Les GNPs ayant des diamètres supérieurs à 70 nm sont très rares, comme le montre le tableau (inséré dans la Figure 6), puisque 99 % des GNPs ont un diamètre inférieur à 70 nm.

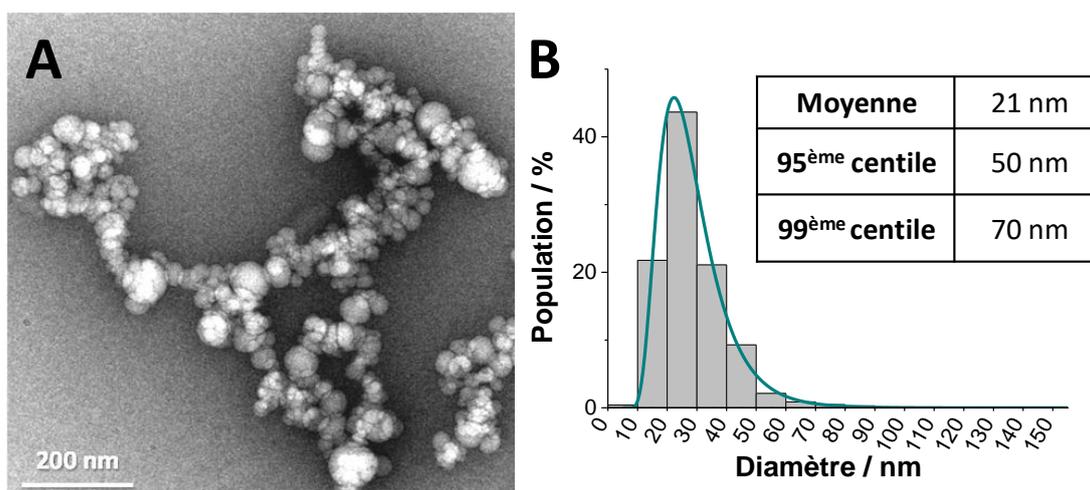


Figure 6 : (A) Cliché MET de GNP_{PSCD} et (B) distribution du diamètre des GNP_{PSCD} avec tableau récapitulatif représentant la répartition des particules en fonction de leur diamètre.

III.2. Détermination de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les diamètres des GNP_{PSCD}/AQ et des GNP_{PSCD} obtenus en MET étant proches, que ce soit dans le culot ou dans le surnageant, les solutions de glyconanoparticules ont été analysées dans l'ensemble par DLS pour déterminer le diamètre hydrodynamique des GNP_{PSCD}/AQ et des GNP_{PSCD}, suite à une agitation des échantillons par un mélangeur vortex à tige de retenue après filtration sur une membrane hydrophile à base de cellulose ester mixte (cellulose acétate et nitrate) de 0,8 µm afin d'éliminer les agglomérats ou les poussières et mieux observer les petites structures.

III.2.1. De GNP_{PSCD}

Les mesures en DLS à différents angles mettent en évidence la présence de deux distributions ayant un diamètre moyen de 54 ± 11 nm pour la plus petite distribution, et un diamètre moyen de 254 ± 17 nm. La Figure 7 reporte le diamètre moyen de ces deux distributions de particules obtenues en fonction de l'angle de diffusion.

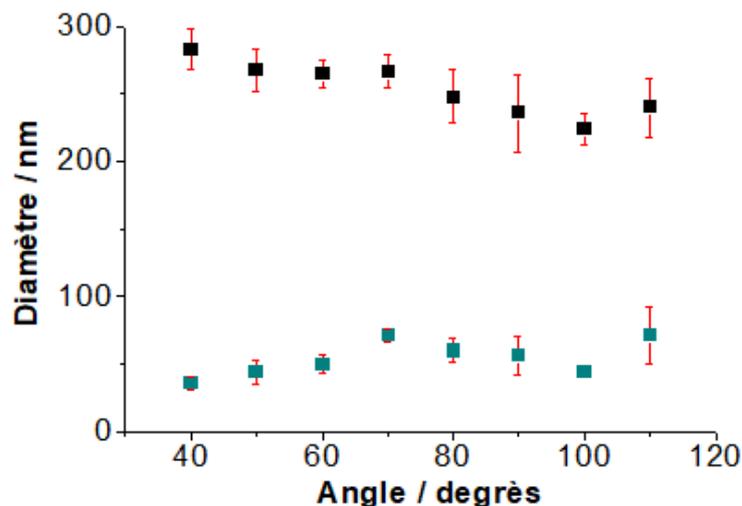


Figure 7 : DLS de la solution de GNP_{PSCD} à différents angles. Conditions : GNPs filtrées sur 0,8 µm, angles étudiés : 40 °, 50 °, 60 °, 70 °, 80 °, 90 °, 100 °, 110 °.

Pour déterminer le coefficient de diffusion, D , de ces deux distributions de particules, la relation (1) est utilisée :

$$\frac{1}{\tau} = D q^2 \quad (1)$$

Avec τ le temps de relaxation en secondes, et q le vecteur d'onde en cm^{-1} . Une distribution en fonction du temps de relaxation peut être obtenue et permet d'obtenir les valeurs de τ par lecture graphique, en notant la valeur de l'abscisse pour chaque pic. Ces valeurs sont

reportées en fonction du carré du vecteur d'onde, dont la valeur est calculée par la formule (2) :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (2)$$

Avec θ l'angle d'analyse en radians, n l'indice de réfraction de l'eau à 25 °C pour une longueur d'onde incidente, λ , de 633 nm. On obtient alors expérimentalement les points des graphiques présentés sur la Figure 8.

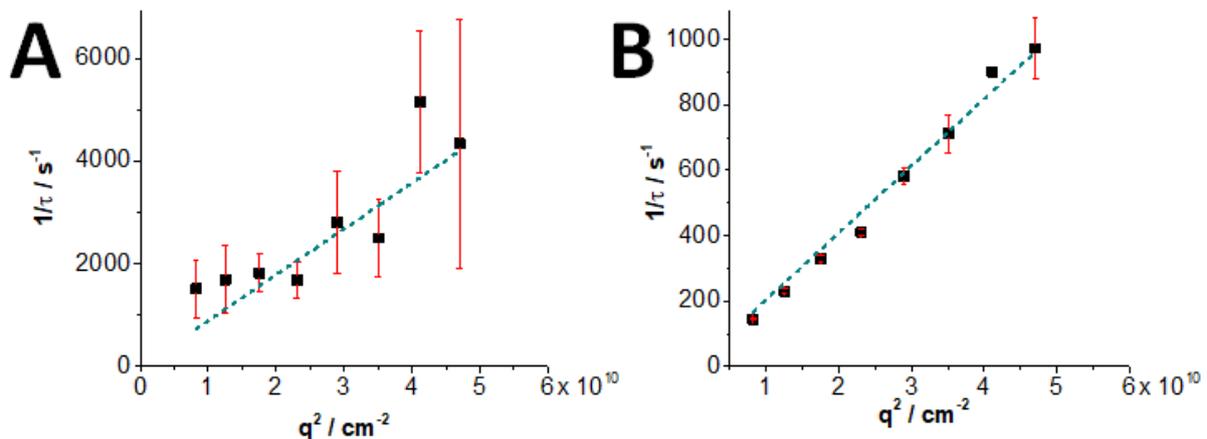


Figure 8 : Dépendance de la fréquence de relaxation ($1/\tau$) en fonction du carré du vecteur de diffusion angulaire (q^2) de la suspension de GNP_{PSCD}. Points moyens sur 4 valeurs. (A) première distribution et (B) deuxième distribution

Pour modéliser linéairement les points, l'ordonnée à l'origine est fixée à 0 s⁻¹. Les pentes obtenues égales à leurs coefficients de diffusion respectifs sont de $(8,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ($R^2 = 0,9278$) et $(2,05 \pm 0,04) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ($R^2 = 0,9962$) pour la distribution ayant un diamètre de 55 nm et 239 nm respectivement, valeurs proches de la littérature pour des systèmes similaires à base de glyconanoparticules de PSCD ⁹. Les valeurs d'incertitudes sur les valeurs sont déterminées grâce au logiciel Origin.

Nous détaillons ci-dessous les mesures réalisées en DLS pour les GNP_{PSCD} à 90 ° en traçant la fonction d'autocorrélation (Figure 9A) et la distribution en taille (Figure 9B). Comme on peut le constater sur la Figure 9, deux pics sont obtenus sur la courbe de distribution, correspondant respectivement à une distribution de diamètre de 56 ± 29 nm, et une seconde de 236 ± 14 nm. Ces valeurs permettent de retrouver les valeurs précédentes issues des mesures à différents angles, même si les incertitudes sont plus élevées, attestant que les mesures effectuées à 90°, moins chronophages, sont assez représentatives de la taille des particules présentes en solution. Ainsi pour la suite des expériences, les mesures ont seulement été réalisées à un angle de 90 °.

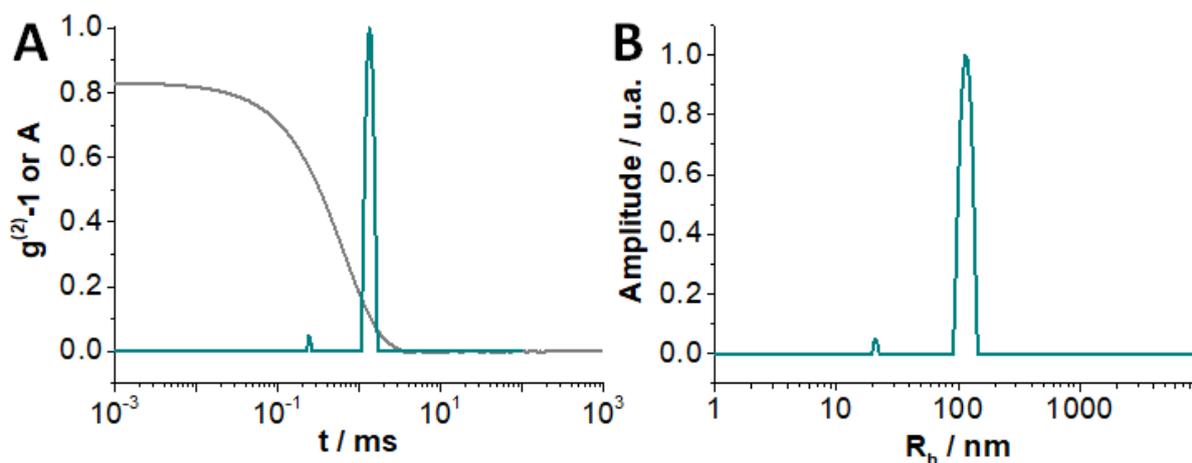


Figure 9 : Fonction d'autocorrélation et de distribution en temps de relaxation (A) et en taille (B) obtenue par DLS pour les GNP_{PSCD} . Conditions : $\theta = 90^\circ$, $T = 25^\circ\text{C}$, $t_{\text{run}} = 120 \text{ sec}$, $[\text{copolymère}] = 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$. Incertitudes calculées sur 4 valeurs.

III.2.2. De $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$

Lorsque les mesures sont réalisées à 90° (Figure 10A), on peut noter pour les solutions de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$, la présence d'une seule distribution avec un diamètre de $230 \pm 5 \text{ nm}$, Figure B, suggérant que dans cet échantillon, la distribution de plus petite taille de 25 nm visible sur les clichés MET n'est pas détectée par DLS à cet angle. Ceci est probablement dû au fait que la distribution de petite taille pourrait être « cachée » par le signal de la distribution de diamètre de 230 nm, qui serait plus nombreuse en nombre, que dans l'échantillon de GNP_{PSCD} sans AQ. Ce résultat concorde avec le fait que l'insertion partielle ⁶ de AQ dans les cavités des cyclodextrines peut provoquer une réticulation entre plusieurs glyconanoparticules, formant ainsi des agglomérats stables, augmentant leur nombre en solution.

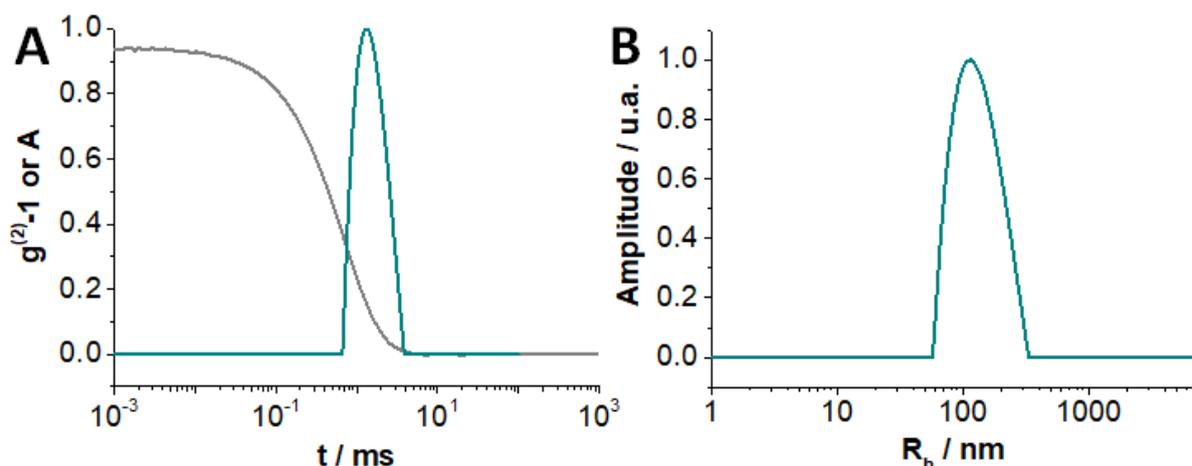


Figure 10 : Fonction d'autocorrélation et de distribution en temps de relaxation (A) et en taille (B) obtenue par DLS pour les $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$. Conditions : 90° , $T = 25^\circ\text{C}$, $t_{\text{run}} = 60 \text{ secondes}$, $[\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}] = 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Ayant utilisé différentes méthodes de caractérisation pour caractériser les GNP_{PSCD} et les GNP_{PSCD}/AQ, le Tableau 2 rassemble les diamètres hydrodynamiques des GNPs par DLS et les diamètres des glyconanoparticules séchées sur support par MET. La DLS permet de mettre en évidence des interactions en solution, que ce soit pour les GNP_{PSCD}/AQ ou les GNP_{PSCD} avec respectivement des diamètres de 230 ± 5 nm et 236 ± 14 nm. L'incertitude sur chaque diamètre étant de l'ordre de l'écart ou supérieure à l'écart obtenu entre les deux diamètres, on peut dire que les deux diamètres sont identiques. En DLS une distribution de plus petite taille n'est pas visible pour les GNP_{PSCD}/AQ mais est visible pour GNP_{PSCD}. Ces entités ne sont, en réalité, que faiblement présentes en nombre, et de ce fait peu ou pas visible sur les histogrammes tracés avec cette méthode.

Les analyses en MET montrent que les particules GNP_{PSCD}/AQ sont présentes, avec un diamètre de 24 nm pour 40 % des glyconanoparticules. Ce diamètre est très proche de celui obtenu en MET pour les GNP_{PSCD} (21 nm pour 45 %) montrant ainsi que la taille des GNP_{PSCD} est peu affecté par la présence d'AQ.

En comparant les méthodes d'analyses DLS et MET pour les GNP_{PSCD}, on remarque que la taille de la distribution de plus petit diamètre est plus faible lorsqu'elle est mesurée par microscopie, ce qui s'explique par le fait que les GNPs déposées sur la grille de carbone pour l'analyse en microscopie électronique sont séchées et donc déshydratées, rendant leur rayon plus faible^{10,11} alors que le diamètre mesuré par DLS prend en compte la sphère de solvation de la nanoparticule.

Tableau 2 : Récapitulatif des diamètres obtenus pour les GNP_{PSCD} et les GNP_{PSCD}/AQ par DLS et MET.

	GNP _{PSCD} /AQ	GNP _{PSCD}
DLS, 90 °	/	56 ± 29 nm
(filtration 0,8 µm)	230 ± 5 nm	236 ± 14 nm
TEM	24 nm	21 nm

III.3. Caractérisation spectroscopique RAMAN de GNP_{PSCD} et de GNP_{PSCD}/AQ

Sur la Figure 11, sont représentés respectivement les spectres RAMAN de l'antraquinone AQ (Figure 11, spectre a) et de la cyclodextrine CD (spectre b) déposées toutes les deux sous forme de poudre sur plaque de platine, conçue par nos soins au laboratoire (voir partie expérimentale). Pour effectuer les spectres RAMAN des glyconanoparticules GNP_{PSCD} (spectre c) et GNP_{PSCD}/AQ (spectre d), une goutte de 120 µL de chacune des solutions a été

déposée sur la plaque de Pt de surface de $1,3 \text{ cm}^2$, et séchée à l'air à température ambiante avant analyse. Comme on peut le constater sur chacun des spectres RAMAN a (AQ), c (GNP_{PSCD}), d ($\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$), de nombreuses bandes sont communes pour AQ, GNP_{PSCD} du fait de la présence des doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$ dans les structures de l'antraquinone et du polystyrène. En revanche, la bande située à 1710 cm^{-1} n'est détectée que pour AQ puisqu'elle est caractéristique de la vibration de la liaison de $\text{C}=\text{O}$, comme rapporté dans la littérature ¹². On pourrait ainsi s'attendre à détecter cette bande sur le spectre RAMAN de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ avec éventuellement un décalage du nombre d'onde du fait de l'inclusion de AQ dans la cavité de la cyclodextrine, ce qui n'est pas observé (Figure 11, spectre d). De façon identique, les bandes caractéristiques de la β -cyclodextrine ne sont pas non plus détectées sur le spectre RAMAN de GNP_{PSCD} . Ceci pourrait s'expliquer par une faible proportion de cyclodextrines présentes dans la structure de PSCD par rapport au nombre de motifs styrène du polystyrène ($M_n = 4500 \text{ g.mol}^{-1}$), l'intensité de la bande étant liée au nombre de molécules diffusantes ¹³.

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que cette méthode ne permet pas de démontrer la fonctionnalisation de GNP_{PSCD} par AQ puisque l'on ne fait pas la différence entre GNP_{PSCD} et $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ par l'observation des spectres RAMAN de ces deux entités.

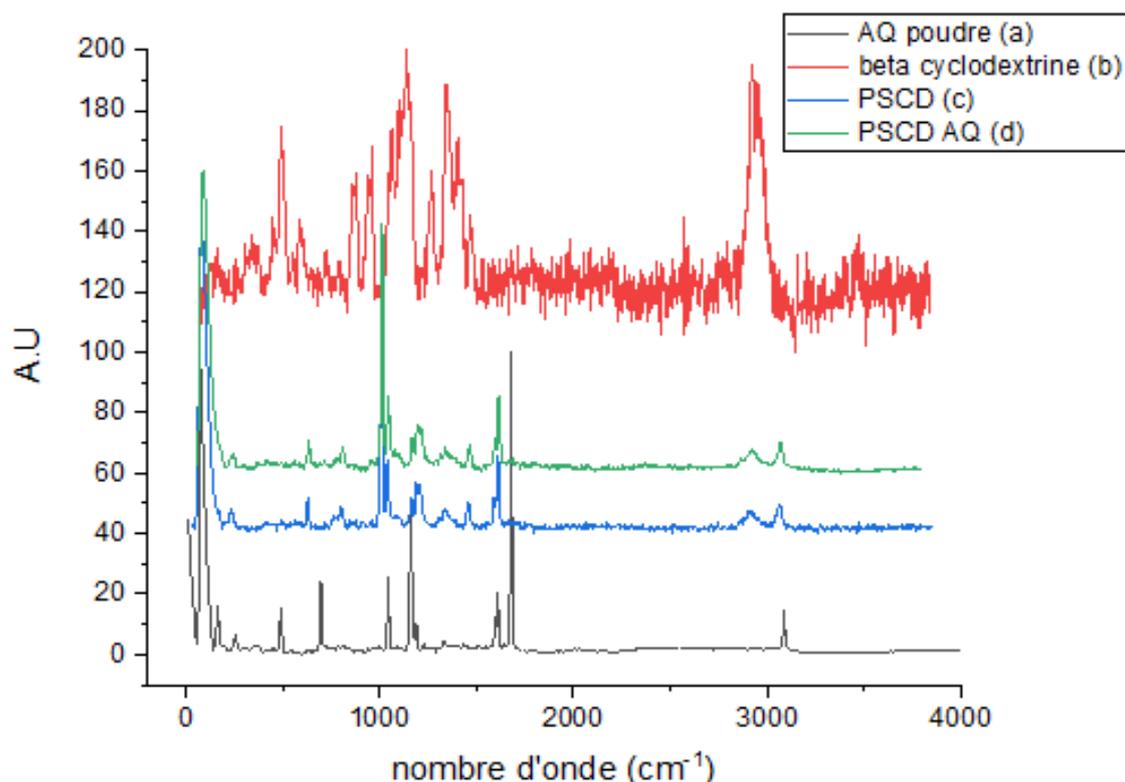


Figure 11 : Spectres RAMAN de l'antraquinone AQ (a), de la β -cyclodextrine CD (b) déposées sous forme solide sur plaque de Pt et des glyconanoparticules GNP_{PSCD} (spectre c) et de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ (d) déposées sur électrode de Pt ($120 \mu\text{L}$ sur une électrode de surface de $1,3 \text{ cm}^2$).

IV. Propriétés électrochimiques des glyconanoparticules GNP_{PSCD} et $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$

IV.1. En solution

Les solutions de GNP_{PSCD} et de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ ont été étudiées en solution aqueuse par voltampérométrie cyclique (CV) entre 0,0 V et -0,6 V à une vitesse de balayage de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en milieu tamponné à $\text{pH} = 6$ (Figure 12A et Figure 12B respectivement).

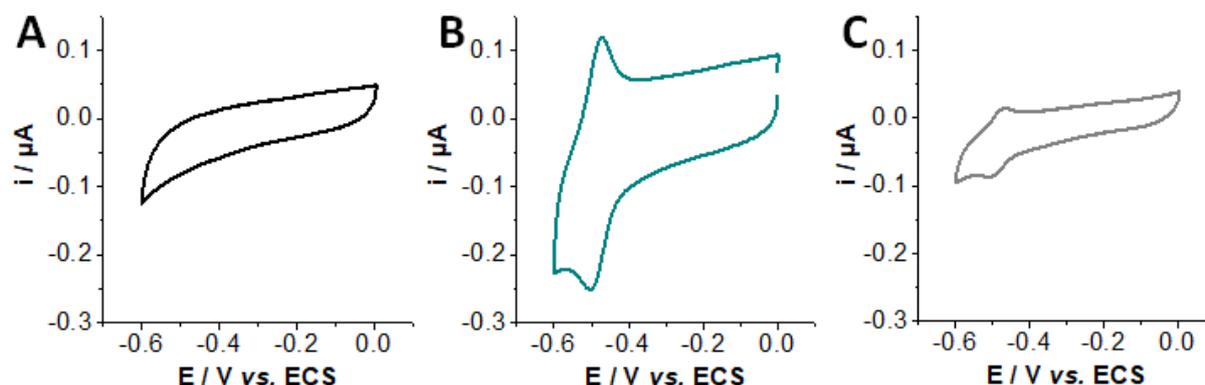


Figure 12 : CV des GNP_{PSCD} (A), des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ (B) et de AQ (C) en solution. **Conditions :** électrodes de carbone vitreux, Ar, $\nu = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, électrolyte : (A) et (B) 2 mL de tampon McIlvaine à $\text{pH} = 6$ + 2 mL de solution de GNPs ou de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ avec une concentration de $0,094 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. (C) [AQ] saturée, $0,003 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Après un dégazage minutieux de la solution d'étude avec de l'argon pendant 20 minutes, lors du balayage de la fenêtre de potentiel vers les potentiels négatifs, aucun signal n'est détecté pour la solution de GNP_{PSCD} (Figure 12A). En revanche, un pic cathodique, est détecté à un potentiel $E_{\text{pc}} = -0,496 \text{ V vs. ECS}$ sur le voltampérogramme associé au balayage retour à un pic anodique, détecté à $E_{\text{pa}} = -0,476 \text{ V vs. ECS}$ pour la solution de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$. Ces résultats montrent sans ambiguïté que le signal électrochimique des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ est bien caractéristique de AQ. De plus, le signal électrochimique des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ (Figure 12B) a été aussi comparé à celui obtenu pour une solution saturée en AQ à pH identique (Figure 12C). Le courant de pic cathodique i_{pc} après soustraction du courant capacitif pour $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ d'une valeur de $-0,15 \mu\text{A}$ est beaucoup plus important que celui mesuré pour AQ ($-0,02 \mu\text{A}$) à $E_{\text{pc}} = -0,496 \text{ V}$ et $E_{\text{pc}} = -0,500 \text{ V}$ respectivement. Ce résultat atteste qu'en présence du polymère, le signal électrochimique de AQ est augmenté, traduisant la solubilisation de AQ, conformément à ce qui est décrit dans la littérature^{9,14}. La différence de potentiel entre les E_{pc} peut venir de l'interaction entre les CDs et la sonde rédox, comme précédemment décrit dans la littérature avec une complexation entre une β -cyclodextrine et l'acide ascorbique ou l'acide urique¹⁵.

Afin d'étudier le comportement électrochimique des GNP_{PS_{CD}}/AQ en fonction du pH, des voltampérométries cycliques, Figure 13A, ont été réalisées dans des solutions tamponnées à différents pH, variant entre 2,5 et 8 pour une concentration en polymère en solution égale à 0,0938 mg.mL⁻¹. Nous avons vérifié au préalable que la forme des glyconanoparticules n'était pas affectée par le pH en réalisant des clichés MET. Le signal caractéristique du couple rédox AQ/AQH₂ est bien visible sur chacun des voltampérogrammes. Les potentiels de pic cathodique et anodique sont décalés vers les potentiels négatifs lorsque le pH augmente. A titre d'illustration, le potentiel de pic cathodique détecté de $E_{pc} = -0,314$ V pour un pH de 2,5 est déplacé à un potentiel de pic égal à $-0,606$ V pour un pH de 8. La Figure 13B présente l'évolution du potentiel de demi-pic $E_{1/2}$ en fonction du pH qui peut être modélisée par une droite d'équation $E_{1/2} = -0,056 \text{ pH} - 0,140$ ($R^2 = 0,9991$).

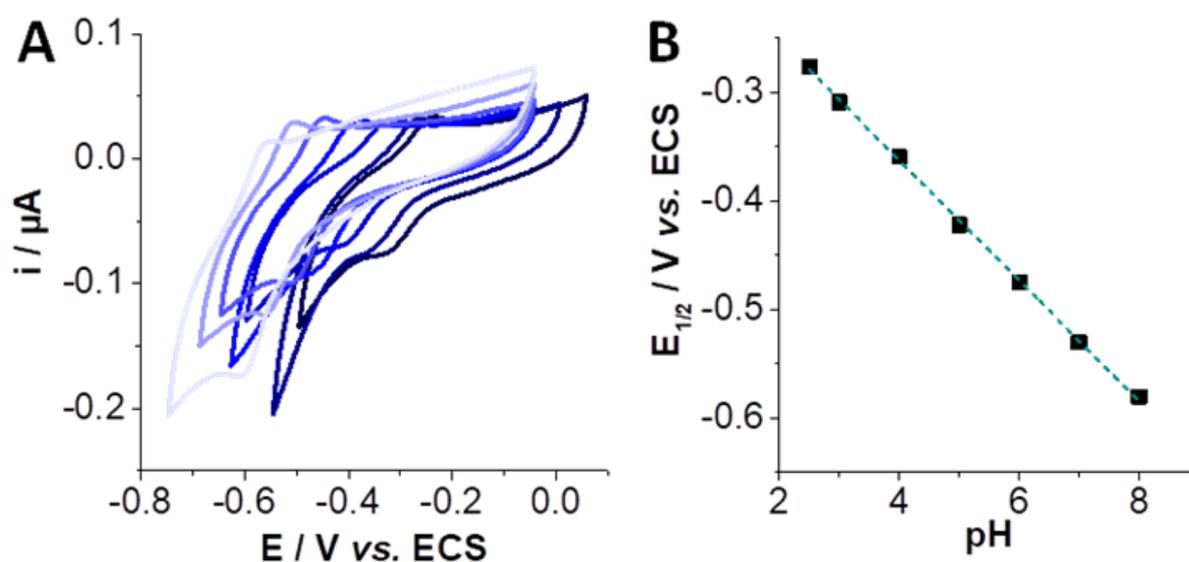


Figure 13 : CV des GNP_{PS_{CD}}/AQ en solution (A) et variation de $E_{1/2}$ en fonction du pH associé (B). **Conditions** : électrodes de carbone vitreux, CV sous Ar, 10 mV.s⁻¹, électrolyte : 1 mL de tampon McIlvaine + 1 mL de solution de GNPs, pH résultants : 2,5 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 et 8. [copolymère] = 0,0938 mg.mL⁻¹. Equation de la droite : $E_{1/2} = -0,056 \text{ pH} - 0,140$; $R^2 = 0,9991$.

L'étude en fonction du pH permet de mettre en avant le ratio de protons échangés par rapport aux électrons pour un système simple $\text{Ox} + m\text{H}^+ + n\text{e}^- \leftrightarrow \text{Red}$, en écrivant le loi de Nernst, suivant l'équation (3) à 25°C¹⁶.

$$E_{th} = E^0 - 0,059 \frac{m}{n} \text{pH} \quad (3)$$

Avec Ox et Red les espèces oxydées et réduites, m et n le nombre de protons et d'électrons échangés respectivement et E^0 le potentiel standard du couple rédox étudié. La valeur de la pente calculée, -56 mV par unité de pH, est proche de la valeur théorique attendue de -59 mV par unité de pH pour un mécanisme de rapport proton/électron 1/1 à une température

de 25 °C. Ces résultats confirment le mécanisme de réduction de l'AQ, équation (4), mettant en jeu $2 H^+$ et $2 e^-$ comme déjà sur le schéma carré (Schéma 4), proposé par J. Jacq en 1971 pour les mécanismes de réduction ¹⁷.

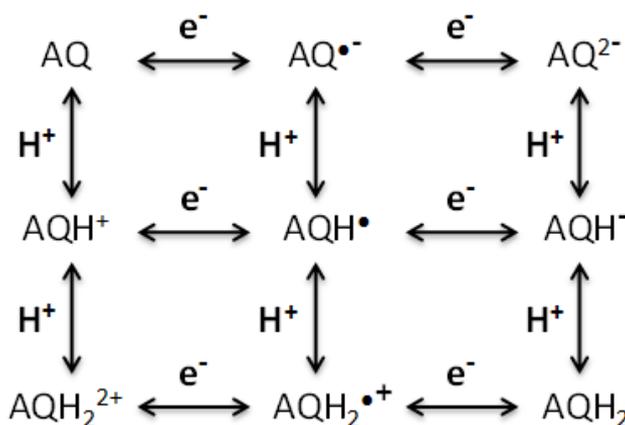
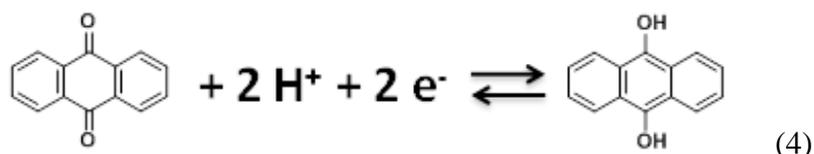


Schéma 4 : Schéma carré généralisé pour le système rédox de l'anthraquinone à $2 H^+$, $2 e^-$, selon J. Jacq ¹⁷.

En se basant sur le schéma carré, et en s'appuyant des résultats de la littérature pour des dérivés de AQ ¹⁸, le mécanisme de réduction des GNP_{PSCD}/AQ serait plutôt de type ECEC à pH = 6, alors qu'à pH = 13 le mécanisme est de type EE, tel que le montre, par exemple, le Schéma 5.

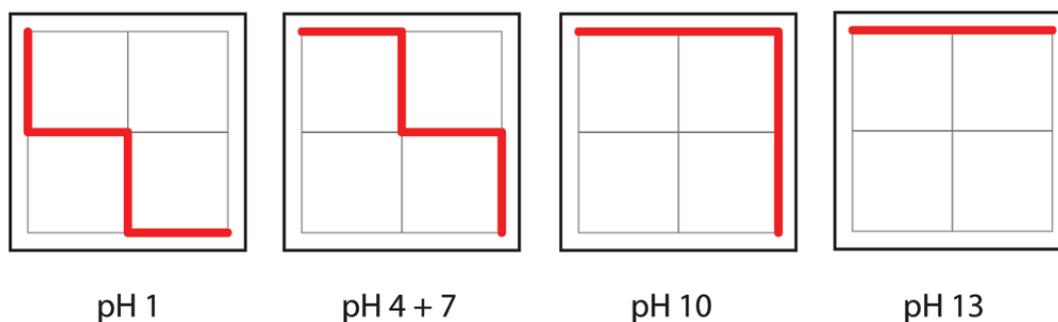


Schéma 5 : Schéma des mécanismes de réactions d'oxydoréduction pour les deux dérivés de quinone d'après ²⁴. Les chemins horizontaux représentent les transferts d'électrons tandis que les chemins verticaux représentent les transferts de proton, comme présenté sur le Schéma.

Afin d'étudier le comportement électrochimique du système à différentes vitesses de balayage, les courbes de voltampérométrie cyclique ont été ensuite réalisées à différentes vitesses de balayage (Figure 14A) variant entre 2 et 100 mV.s⁻¹. En reportant la valeur du courant faradique cathodique ou anodique en fonction de la racine carrée de la vitesse de

balayage, la droite obtenue (avec un coefficient de corrélation R^2 égal respectivement à 0,9982 et 0,9970) (Figure 14B) confirme que les courants faradiques sont bien proportionnels à la racine carrée de la vitesse de balayage⁹. Cette linéarité en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage a déjà été observé pour des glyconanoparticules modifiées par exemple par des tétrazines mettant en jeu le transfert de 2 électrons et de 2 protons⁹ ou encore par des micelles¹⁹.

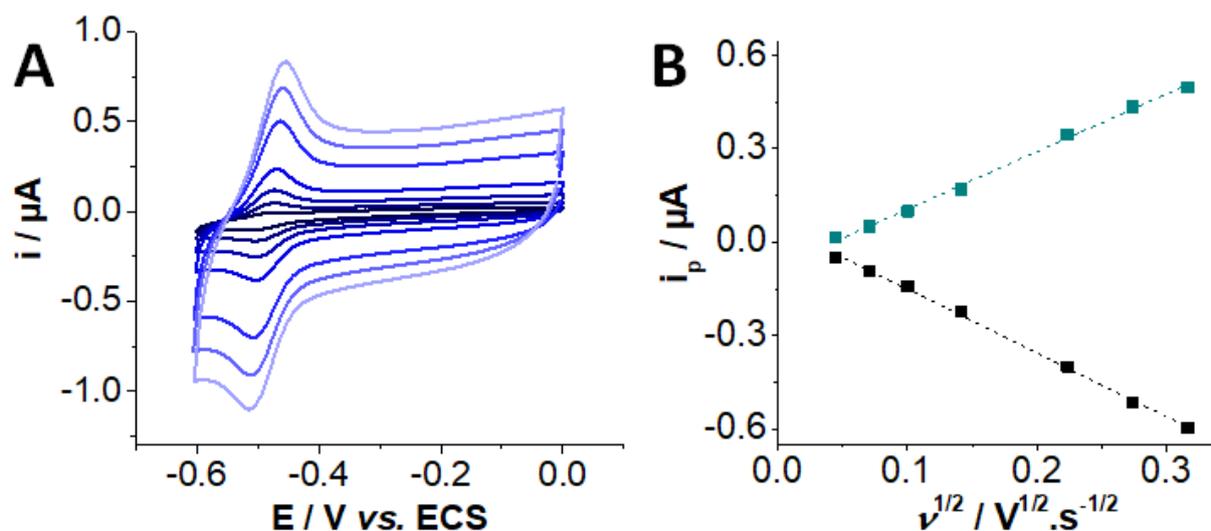


Figure 14 : CV des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ à différentes vitesses de balayage (A) et graphique représentant la variation du courant de pic cathodique et anodique en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage (B). **Conditions :** électrodes de carbone vitreux, 2 mL solution de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ + 2 mL de tampon McIlvaine (pH = 6), Ar, $\nu = 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 ; 100 \text{ mV s}^{-1}$. **Equation des droites :** $i_{\text{pc}} = -2,05 \cdot 10^{-6} \nu^{1/2} + 5 \cdot 10^{-8}$; $R^2 = 0,9982$; $i_{\text{pa}} = 1,85 \cdot 10^{-6} \nu^{1/2} - 8 \cdot 10^{-8}$; $R^2 = 0,9970$.

Cette corrélation linéaire démontre que l'équation de Randles-Sevcik est bien vérifiée et que le processus est contrôlé par le processus de diffusion, avec une diffusion pouvant être considérée comme perpendiculaire à la surface de l'électrode de travail, comme pour des espèces rédox dissoutes en solution^{20,21}. Pour une espèce en solution, l'équation de Randles Sevcik est rappelée dans l'équation (5).

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} SD^{1/2} C \nu^{1/2} \quad (5)$$

Avec i_p le courant de pic (A), n le nombre d'électrons échangés, S la surface de l'électrode, D le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) de l'espèce rédox, C la concentration de l'espèce rédox en solution ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$) et ν la vitesse de balayage en potentiel ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$). Dans le cas des glyconanoparticules, du fait de l'inclusion des espèces rédox dans la cavité des cyclodextrines, le coefficient de diffusion D à prendre en compte est celui des glyconanoparticules déterminé par DLS.

Nous pouvons aussi constater que les valeurs de potentiels de pic anodique E_{pa} et cathodique E_{pc} , ainsi que $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ varient avec la vitesse de balayage avec, par exemple, une valeur de ΔE_p de 54 mV pour une vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} . Dans le cas d'un système nernstien réversible, les potentiels de pic cathodique et anodique ne varient pas avec la vitesse de balayage et la différence de pic entre les potentiels de pic anodique et cathodique est égale à $59 \text{ mV}/n$ avec n , le nombre d'électrons échangé²². Ici, en considérant que le nombre d'électrons est égal à 2, conformément à ce qui est décrit dans la littérature, la différence de potentiel devrait être égale à 29,5 mV, ce qui est le cas pour les vitesses de balayage égales ou inférieures à 50 mV.s^{-1} . Ces résultats indiquent donc que pour des vitesses de balayage supérieures à 50 mV.s^{-1} , le comportement électrochimique s'éloigne d'un système nernstien réversible.

IV.2. Sur électrodes de carbone

Afin d'étudier le signal électrochimique des $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQ}}$ immobilisées sur support conducteur et pouvoir par la suite utiliser ces électrodes pour des applications en bioélectrochimie, les glyconanoparticules ont été déposées sur des électrodes de carbone vitreux (GCE) de 3 mm de diamètre avec des volumes croissants de $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQ}}$ (de $2 \mu\text{L}$ à $80 \mu\text{L}$) et séchées à l'air et à température ambiante. Après rinçage avec de l'eau pendant 2 minutes, les électrodes ainsi fonctionnalisées ont été caractérisées par CV en milieu tamponné à $\text{pH} = 6$ (Figure 15A) avec la détection d'un système détecté à $E_{1/2} = -0,486 \text{ V}$, comme démontré en solution aqueuse au même pH. La Figure 15B présente les variations des valeurs de courant anodique et cathodique, moyennées sur 4 mesures, obtenues suite à l'incubation avec des volumes croissants en GNPs sur l'électrode de carbone. Comme attendu, les courants de pic cathodique et anodiques des pics caractéristiques de l'anthraquinone augmentent avec la quantité de GNPs immobilisées à la surface de l'électrode pour atteindre une valeur constante respectivement de $-0,75 \pm 0,09 \mu\text{A}$ et de $0,62 \pm 0,07 \mu\text{A}$ après incubation de $60 \mu\text{L}$ de $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQ}}$ qui correspondrait à une saturation de l'électrode en glyconanoparticules.

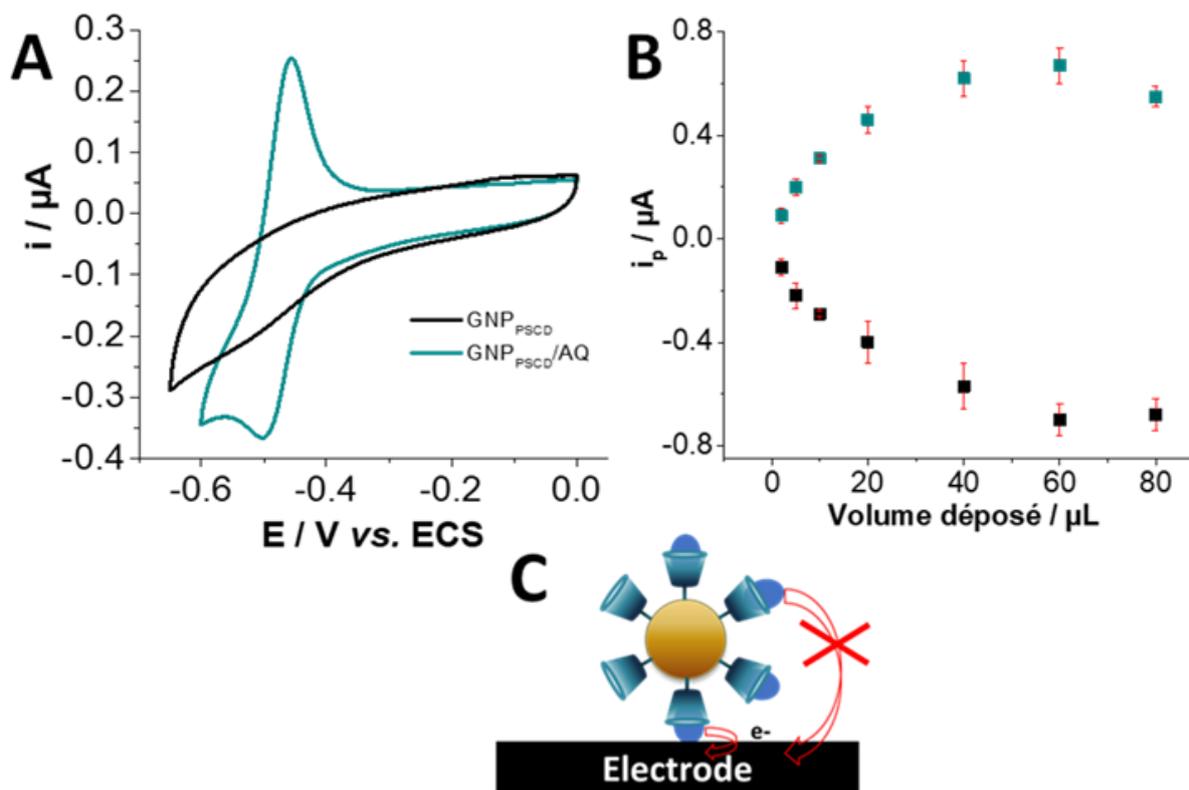


Figure 15 : CV des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ immobilisées sur électrode de carbone vitreux (A) et variation des courants de pics cathodique et anodique en fonction du volume de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ déposé (B). Représentation schématique des transferts d'électrons possibles ou non (C). Conditions : (A) 20 μL $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ déposées sur GCE, tampon Britton Robinson (pH = 6), 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ar. (B) incertitudes sur 4 mesures.

Afin de déterminer la quantité d'AQ immobilisée à la surface de l'électrode de carbone, la concentration surfacique d'AQ, Γ_{AQ} en $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, est calculée en utilisant l'équation (6) :

$$\Gamma = \frac{Q}{nFS} \quad (6)$$

Avec $Q = \frac{Q_a + Q_c}{2}$, Q_a et Q_c étant les charges obtenues en intégrant respectivement les pics d'intérêt anodique et cathodique, n le nombre d'électrons échangés ($n = 2$), F la constante de Faraday ($96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$) et S la surface de l'électrode (égale à $0,07 \text{ cm}^2$). Une valeur de recouvrement de surface Γ_{AQ} égal à $1,7\cdot 10^{-10} \pm 0,5\cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été calculée pour les électrodes couvertes de 60 μL de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$. Sachant qu'une monocouche d'AQ a une concentration surfacique de $0,5\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ²³, l'immobilisation des GNPs représentent environ 0,3 monocouches de AQ. Cette valeur très faible est certainement due au fait que les anthraquinones ne sont pas toutes disponibles pour effectuer un transfert d'électron à l'électrode de par leur éloignement à l'électrode. Comme montré sur la Figure 15C, on peut supposer que le courant mesuré provient seulement de AQ proche de la surface.

Pour comparer le signal électrochimique obtenu des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ sur électrode de carbone, des dépôts successifs de $3 \times 20 \mu\text{L}$ d'une solution de AQ à $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (solution saturée) ont été réalisés sur électrode (Figure 16, courbe a) dans les mêmes conditions expérimentales décrites ci-dessus. Comme on peut le constater, le signal de AQ (Figure 16, courbe a) est visible en réduction mais est mal défini par comparaison au signal obtenu pour $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ (Figure 16, b) qui présente un courant de réduction de $i_{\text{pc}} = -0,481 \mu\text{A}$. Ces résultats montrent de nouveau sans ambiguïté que les glyconanoparticules permettent la solubilisation de l'anthraquinone.

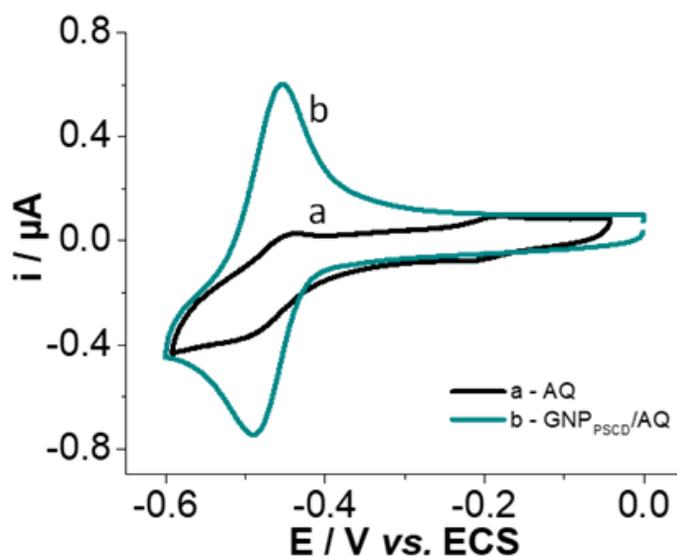


Figure 16 : Courbe de voltampérométrie cyclique des électrodes de carbone vitreux modifiées avec a) de AQ ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) en solution aqueuse. b) des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ pré-fonctionnalisées. Conditions : tampon McIlvaine $\text{pH} = 6$, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, Ar, électrodes de carbone (3 mm de diamètre) recouvertes de 3 dépôts successifs de $20 \mu\text{L}$ de $20 \mu\text{L}$ d'anthraquinone à $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (trait pointillés, courbe a), ou de 3 dépôts successifs de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ (trait plein, noir, courbe b)

Afin de vérifier l'immobilisation des GNPs sur électrode de carbone, des CVs ont été réalisées à différentes vitesses de balayage à $\text{pH} = 6$, pour un dépôt de $60 \mu\text{L}$ de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$, correspondant à un recouvrement surfacique de $1,77.10^{-10} \pm 0,5.10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ (Figure 17A). La linéarité entre les courants de pics cathodique et anodiques avec la vitesse de balayage confirment l'immobilisation des espèces rédox à la surface de l'électrode (Figure 17B).

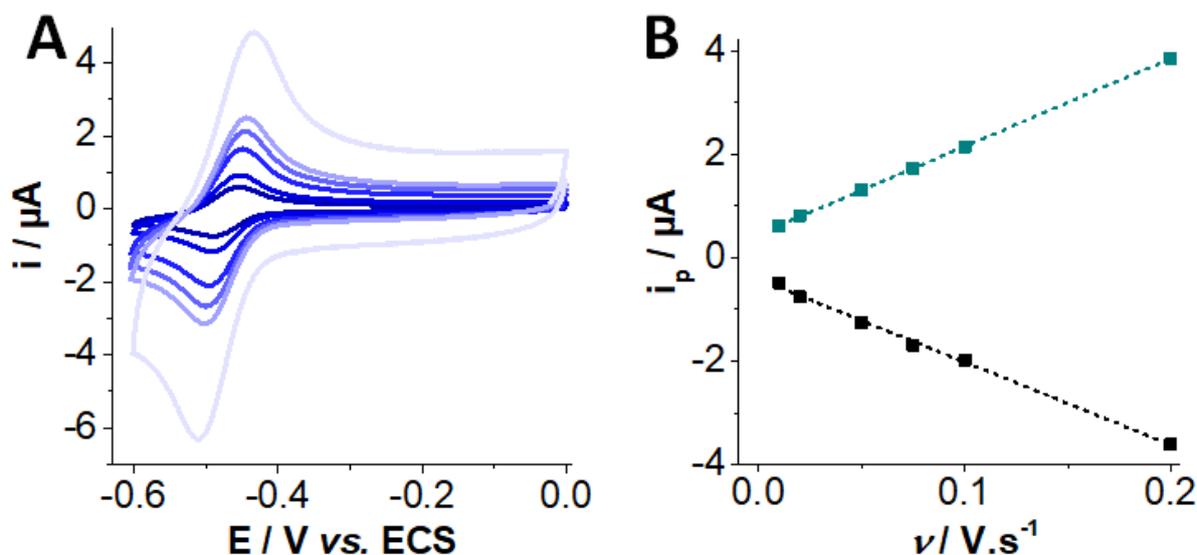


Figure 17 : CV des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ immobilisées sur des électrodes de carbone vitreux à différentes vitesses de balayage (A) et graphique représentant la variation du courant de pic cathodique en fonction de la vitesse de balayage (B). **Conditions** : dépôts de $3 \times 20 \mu\text{L}$ de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ sur des GCE, électrolyte : 2 mL de tampon McIlvaine pH = 6, Ar, $\nu = 10 ; 20 ; 50 ; 75 ; 100 ; 200 \text{ mV.s}^{-1}$. Equation des droites : $i_{\text{pc}} = -1,61 \cdot 10^{-5} \nu - 4,09 \cdot 10^{-7}$; $R^2 = 0,9965$; $i_{\text{pa}} = 1,70 \cdot 10^{-5} \nu + 4,58 \cdot 10^{-7}$; $R^2 = 0,9999$.

De même qu'en solution, pour vérifier le comportement électrochimique des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ immobilisées sur électrode en fonction du pH, les courbes de CV ont été aussi tracées, après immobilisation de $60 \mu\text{L}$ de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ à la surface d'une électrode de carbone pour des pH variant entre 2,5 et 8 à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} (Figure 18A). En reportant le potentiel de pic $E_{1/2}$ en fonction du pH, Figure 18B, une dépendance linéaire est obtenue, d'équation $E_{1/2} = -0,053 \text{ pH} - 0,142$, confirmant de nouveau le mécanisme 2/2 d'échange de proton/électron, comme déjà démontré en solution.

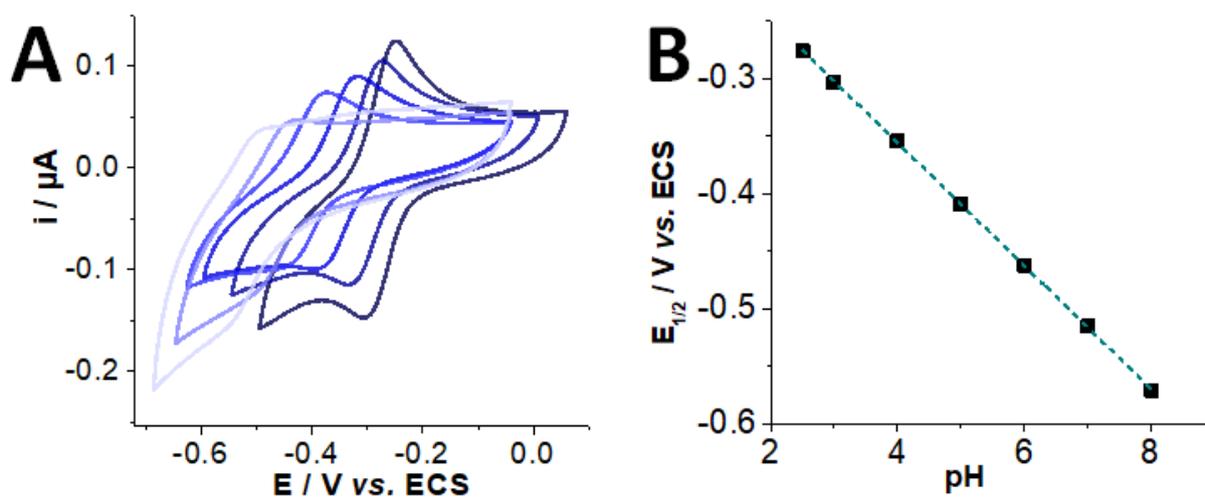


Figure 18 : (A) CV des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ immobilisées sur des électrodes de carbone vitreux et (B) variation des $E_{1/2}$ en fonction du pH. **Conditions** : CV sous Ar, électrode de travail : carbone recouverte de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$, électrolyte de droite à gauche : tampon McIlvaine de pH = 2,5 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 et 8, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$. Equation de la droite : $E_{1/2} = -0,053 \text{ pH} - 0,142$; $R^2 = 0,9998$.

IV.3. Sur électrode de carbone recouvertes de nanotubes de carbone

Le comportement électrochimique des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ a également été étudié sur des électrodes de carbone couvertes de nanotubes de carbone multi-parois. Comme décrit dans le chapitre bibliographique, ces nanomatériaux ont la particularité d'avoir une grande surface spécifique et une très bonne conductivité, ce qui conduit à l'amélioration des performances des dispositifs électrochimiques²⁴. Ainsi, en déposant les $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ sur les MWCNTs, on peut s'attendre à ce que des signaux électrochimiques soient augmentés. Les électrodes modifiées par les nanotubes de carbone ont été élaborées par dépôt puis séchage sous vide de 20 μL d'une solution de nanotubes préalablement dispersés dans une solution de NMP ($[\text{MWCNT}] = 5 \text{ mg.mL}^{-1}$), comme réalisé habituellement au laboratoire^{25,26}. Cette méthode permet l'obtention de dépôts homogènes de nanotubes de carbone d'épaisseur de l'ordre de 5 μm . Puis, en suivant la même démarche expérimentale que sur carbone, des dépôts de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ avec des volumes croissants ont été effectués sur l'électrode recouverte de nanotubes et séchés à l'air libre, comme montré sur le Schéma 6.

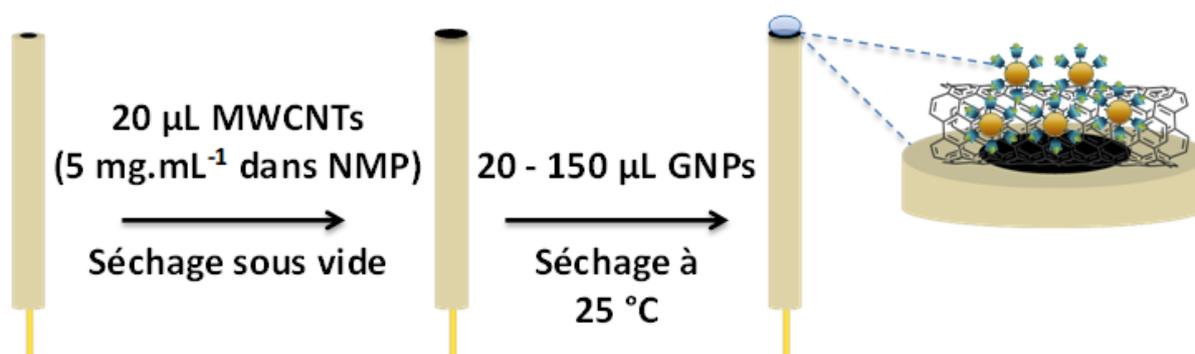


Schéma 6: Représentation schématique de la procédure de fonctionnalisation des électrodes avec des nanotubes de carbone multi-parois et des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$.

Après rinçage des électrodes avec de l'eau distillée pendant 5 minutes, les électrodes ainsi modifiées ont été étudiées par voltampérométrie cyclique à $\text{pH} = 6$ à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} , Figure 19. Comme attendu, le signal caractéristique de l'électroactivité du couple AQ/AQH_2 est détecté à un potentiel $E_{1/2} = -0,511 \text{ V}$ avec une faible différence de potentiel $\Delta E_p = 53,4 \text{ mV}$ à 10 mV.s^{-1} . Les signaux électrochimiques caractéristiques de l'anthraquinone augmentent avec le volume de GNPs déposé à la surface de l'électrode pour atteindre une valeur de courant constante d'environ $80 \mu\text{A}$ après dépôt de $100 \mu\text{L}$ de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$, ce qui suggère une saturation de la surface par les glyconanoparticules. L'intégration respective des pics anodique et cathodique ($Q_a = 0,72 \text{ mC}$ et $Q_c = 0,68 \text{ mC}$), conduit à une charge moyenne Q_m égale à $0,70 \text{ mC}$, permettant ainsi d'obtenir un recouvrement surfacique de $1,85.10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$. Si l'on compare cette valeur à celle obtenue sur électrode de carbone, la valeur est multipliée par 100 (soit 37 couches d'AQ), montrant

ainsi que la structure tridimensionnelle des nanotubes de carbone permet, comme attendu, d'augmenter la quantité de glyconanoparticules immobilisées et donc d'antraquinone immobilisée.

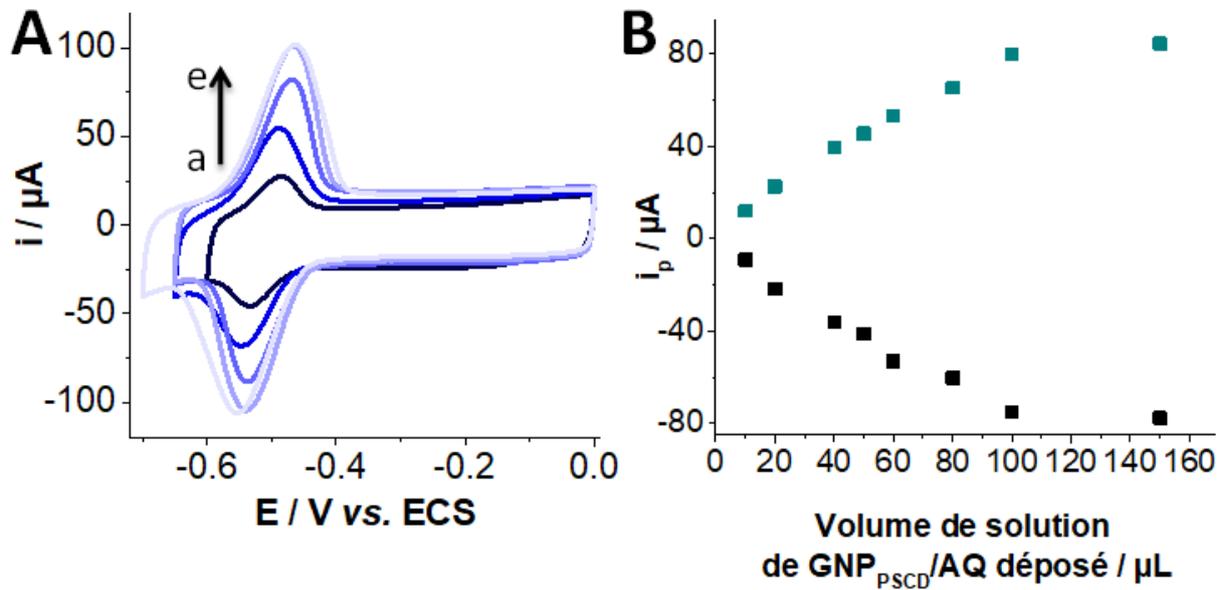


Figure 19 : CV des GNP_{PSCD}/AQ immobilisées sur électrode de carbone vitreux couvertes de MWCNTs (A) et variation des courants de pics cathodique et anodique en fonction du volume de GNP_{PSCD}/AQ déposé (B). Conditions : (A) 20 μL GNP_{PSCD}/AQ déposées sur électrodes couvertes de MWCNT (20 μL, 5 mg.mL⁻¹), 5 mL tampon Britton Robinson (pH = 6), $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, Ar, surface électrode couverte de MWCNTs.

De plus, afin de prouver l'immobilisation de GNP_{PSCD}/AQ sur les nanotubes, les CV (Figure 20A) ont été tracées avec des vitesses de balayage faibles variant de 1 et 20 mV.s⁻¹ afin d'avoir une faible contribution du courant capacitif. Sur la Figure 20B, on note une augmentation des courants de pic anodique et cathodique avec la vitesse de balayage associée à un décalage des potentiels de réduction vers les potentiels négatifs avec des vitesses de balayage croissantes, comme déjà observé en solution. La variation linéaire des courants de pics anodique et cathodique en fonction de la vitesse de balayage (Figure 20B), démontre le succès de l'immobilisation des nanoparticules GNP_{PSCD}/AQ sur les électrodes recouvertes de nanotubes de carbone.

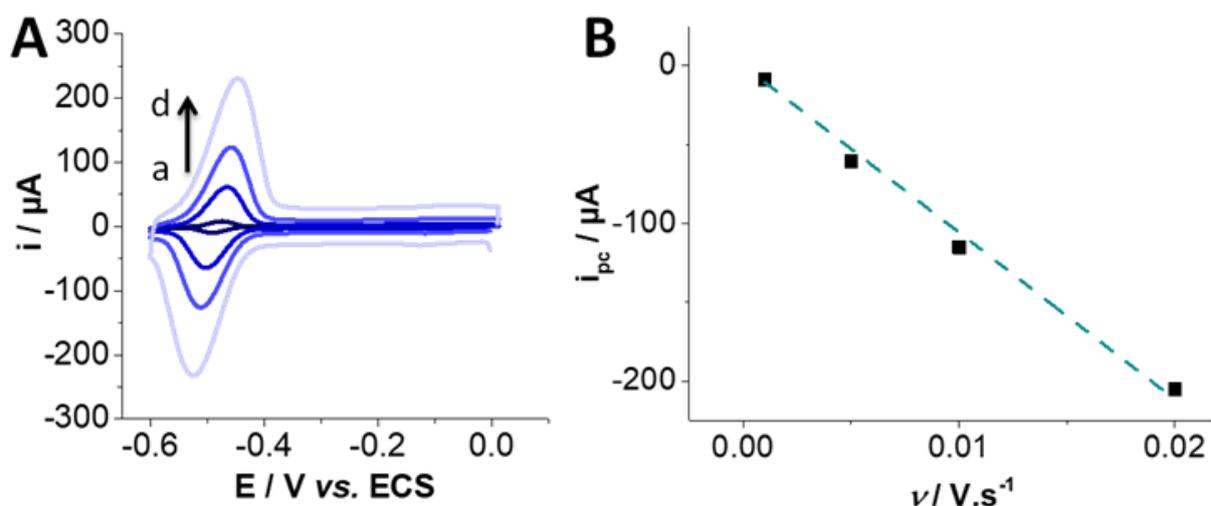


Figure 20 : CV des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ immobilisées sur des électrodes de carbone vitreux recouvertes de nanotubes de carbone à différentes vitesses de balayage (A) et graphique représentant la variation du courant de pic cathodique en fonction de la vitesse de balayage (B). Conditions : recouvrement surfacique obtenu pour la saturation du signal ($\Gamma = 1,85 \cdot 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$), solvant : tampon phosphate pH = 7,4, Ar, $\nu = 1$; 5 ; 10 ; 20 mV.s^{-1} .

De plus, la stabilité des électrodes a été étudiée en réalisant 90 cycles entre les potentiels 0 et $-0,6 \text{ V vs. ECS}$ dans une solution tamponnée à pH = 6, soit en réalisant 9 fois plus de cycles que réalisés précédemment sur électrodes de carbone recouvertes de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$. Comme on peut le constater sur la Figure 21, les valeurs de courants de pics faradiques anodiques et cathodiques sont quasiment identiques avec $i_{\text{pa}} = 112,1 \mu\text{A}$ et $i_{\text{pc}} = -109,6 \mu\text{A}$ après 90 cycles, traduisant ainsi l'excellente stabilité des électrodes ainsi préparées, ce qui correspond à une stabilité dans le temps de plus d'1h 30.

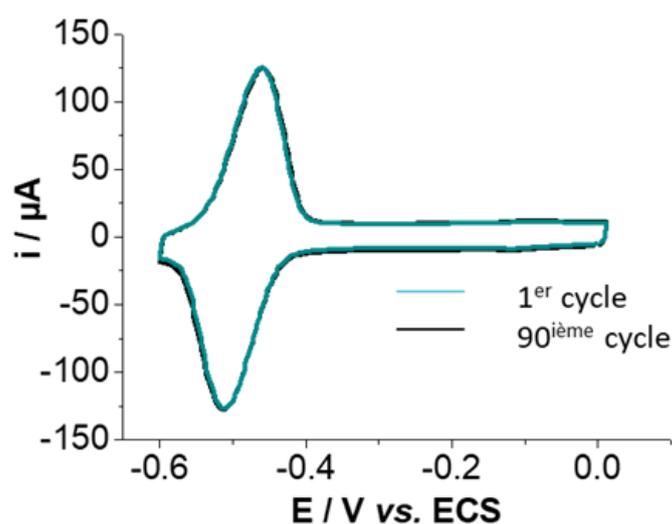


Figure 21 : CV d'une électrode de carbone vitreux couverte de MWCNTs et $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ au premier cycle et après 90 cycles. Conditions : solution McIlvaine pH = 6, Ar, WE : 20 μL MWCNT (5 mg.mL^{-1}), puis dépôt 150 μL de la solution de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, des glyconanoparticules à base de cyclodextrine et de polystyrène ont été fonctionnalisées par l'anthraquinone et caractérisées par différentes méthodes physico-chimiques mettant en évidence la forme sphérique et la taille des objets ainsi obtenus. L'interaction entre différentes particules en solution a pu être mise en évidence du fait des différences observées par DLS et par microscopie MET qui sont des techniques complémentaires analysant les systèmes en solution ou séchées sur électrode. Afin de mettre en évidence la fonctionnalisation des glyconanoparticules par AQ, nous avons pu constater que l'électrochimie est une méthode de choix. Une étude détaillée des propriétés électrochimiques en solution a été réalisée en fonction du pH et de la vitesse de balayage. Nous avons pu aussi démontrer que l'immobilisation des glyconanoparticules a permis la conservation des propriétés électrochimiques obtenues en solution et que la saturation de la surface est atteinte pour une concentration surfacique de $1,7 \cdot 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ et de $1,85 \cdot 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ respectivement sur électrode de carbone et sur électrode de carbone recouverte de nanotubes de carbone. Une excellente stabilité des électrodes en réalisant 90 cycles à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} , a pu être démontrée sur nanotubes de carbone. Les résultats concernant l'immobilisation de ces glyconanoparticules sont innovants car leur capacité à être immobilisée sur support conducteur n'avait été jusqu'ici, jamais évaluée. Les manipulations effectuées ont été essentielles puisqu'elles permettent de démontrer que les électrodes recouvertes de nanotubes de carbone et de GNP_{PSCD}/AQ peuvent être utilisées pour des applications en bioélectrochimie, comme nous le verrons dans le dernier chapitre avec la réalisation de biocathodes.

Références

1. Otsuka, I. *et al.* Self-Assembly of Maltoheptaose- *block* -Polystyrene into Micellar Nanoparticles and Encapsulation of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **29**, 15224–15230 (2013).
2. Ran, Y., He, Y., Yang, G., Johnson, J. L. H. & Yalkowsky, S. H. Estimation of aqueous solubility of organic compounds by using the general solubility equation. *Chemosphere* **48**, 487–509 (2002).
3. Šljukić, B., Banks, C. E. & Compton, R. G. An overview of the electrochemical reduction of oxygen at carbon-based modified electrodes. *J. Iran. Chem. Soc.* **2**, 1–25 (2005).
4. Sarapuu, A., Vaik, K., Schiffrin, D. J. & Tammeveski, K. Electrochemical reduction of oxygen on anthraquinone-modified glassy carbon electrodes in alkaline solution. *J. Electroanal. Chem.* **541**, 23–29 (2003).

5. Dang, X.-J., Tong, R. & Li, H.-L. The electrochemistry of the inclusion complex of anthraquinone with β -Cyclodextrin studied by means of OSWV. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **24**, 275–286 (1996).
6. Dang, X.-J., Nie, M.-Y., Tong, J. & Li, H.-L. Inclusion of the parent molecules of some drugs with β -cyclodextrin studied by electrochemical and spectrometric methods. *J. Electroanal. Chem.* **448**, 61–67 (1998).
7. Jiang, H. *et al.* NMR Investigations of Inclusion Complexes between β -Cyclodextrin and Naphthalene/Anthraquinone Derivatives. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **58**, 133–138 (2007).
8. Giacomelli, C. *et al.* Aqueous Self-Assembly of Polystyrene Chains End-Functionalized with β -Cyclodextrin. *Biomacromolecules* **10**, 449–453 (2009).
9. Gross, A. J. *et al.* Redox-Active Carbohydrate-Coated Nanoparticles: Self-Assembly of a Cyclodextrin–Polystyrene Glycopolymer with Tetrazine–Naphthalimide. *Langmuir* **32**, 11939–11945 (2016).
10. Zhang, H. *et al.* Multi-responsive cyclodextrin vesicles assembled by ‘supramolecular bola-amphiphiles’. *Supramol. Chem.* **22**, 297–310 (2010).
11. Sun, T. *et al.* pH-reversible vesicles based on the “supramolecular amphiphilicities” formed by cyclodextrin and anthraquinone derivate. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **375**, 87–96 (2011).
12. Joseph, T. *et al.* Infrared and Raman spectroscopic analysis and theoretical computation of the first hyperpolarizability of a monoarylated anthraquinone, 1-(4-methoxyphenyl)-4-methylantraquinone. *J. Mol. Struct.* **1005**, 17–24 (2011).
13. Barbillat, J. *et al.* Spectrométrie Raman. (1999).
14. Fritea, L. *et al.* Fluorescent and redox tetrazine films by host-guest immobilization of tetrazine derivatives within poly(pyrrole- β -cyclodextrin) films. *J. Electroanal. Chem.* **781**, 36–40 (2016).
15. Fritea, L., Tertiş, M., Cristea, C., Cosnier, S. & Săndulescu, R. Simultaneous Determination of Ascorbic and Uric Acids in Urine Using an Innovative Electrochemical Sensor Based on β -Cyclodextrin. *Anal. Lett.* **48**, 89–99 (2015).
16. Bedioui, F. & Griveau, S. Voltampérométrie - Phénomènes préalables ou couplés au transfert électronique. (2008).
17. Jacq, J. Schema carre. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **29**, 149–180 (1971).
18. Batchelor-McAuley, C., Li, Q., Dapin, S. M. & Compton, R. G. Voltammetric Characterization of DNA Intercalators across the Full pH Range: Anthraquinone-2,6-disulfonate and Anthraquinone-2-sulfonate. *J. Phys. Chem. B* **114**, 4094–4100 (2010).
19. Mandal, A. B. & Nair, B. U. Cyclic voltammetric technique for the determination of the critical micelle concentration of surfactants, self-diffusion coefficient of micelles, and partition coefficient of an electrochemical probe. *J. Phys. Chem.* **95**, 9008–9013 (1991).
20. Randles, J. E. B. Kinetics of rapid electrode reactions. *Discuss. Faraday Soc.* **1**, 11 (1947).
21. Bedioui, F. Voltampérométrie. Théorie et mise en œuvre expérimentale. (1999).

22. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. (2001).
23. Bourourou, M. *et al.* Supramolecular Immobilization of Laccase on Carbon Nanotube Electrodes Functionalized with (Methylpyrenylaminomethyl)anthraquinone for Direct Electron Reduction of Oxygen. *Chem. - Eur. J.* **19**, 9371–9375 (2013).
24. Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, S. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. *Electrochimica Acta* **82**, 179–190 (2012).
25. Gentil, S. *et al.* A Nanotube-Supported Dicopper Complex Enhances Pt-free Molecular H₂/Air Fuel Cells. *Joule* **3**, 2020–2029 (2019).
26. Hosu, O. *et al.* Nanostructured photoactivatable electrode surface based on pyrene diazirine. *Electrochem. Commun.* **80**, 5–8 (2017).

Chapitre III

Assemblage, fonctionnalisation et caractérisations physico-chimique et électrochimique de glyconanoparticules à base de polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine et de polystyrène-*bloc*-maltoheptaose (PSMH) suivie de la fonctionnalisation par l'anthraquinone sulfonate

Sommaire

I. Introduction.....	96
II. Description de la méthode d'assemblage des copolymères.....	97
II.1. Choix du solvant et de la concentration en copolymère.....	97
II.2. Description de la méthode d'auto-assemblage des copolymères.....	98
II.3. Caractérisations des glyconanoparticules : détermination de la forme et de la taille.....	99
II.3.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	99
II.3.2. Analyse du suivi individuel de particules (NTA).....	100
II.3.3. Microscopies.....	102
III. Fonctionnalisation des glyconanoparticules.....	106
III.1. Procédure.....	106
III.2. Mise au point de la méthode de dialyse.....	106
IV. Caractérisation de la morphologie et détermination de la tailles des GNPs après fonctionnalisation.....	108
IV.1. Caractérisation des GNPs par MET.....	108
IV.1. Caractérisation des GNPs par DLS.....	110
V. Etude des propriétés électrochimiques des différentes glyconanoparticules.....	111
V.1. Etude électrochimique des différentes glyconanoparticules en solution.....	111
V.2. Immobilisation de GNP _{PSCD} /AQS sur MWCNT.....	114
VI. Conclusion.....	117
Références.....	117

I. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons conçu des glyconanoparticules à base de polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine (PSCD) fonctionnalisés par l'antraquinone. Pour cela, conformément à ce qui est décrit dans la littérature, la première étape consistait à solubiliser le copolymère PSCD avec la molécule rédox dans un solvant convenablement choisi en association avec l'antraquinone, permettant ainsi de les dissoudre conjointement¹⁻⁵. Ce milieu contenant un solvant organique n'est donc pas adapté pour fonctionnaliser les glyconanoparticules par des espèces ne supportant pas les milieux organiques, telles que des enzymes, par exemple. Ainsi, il est nécessaire, dans ce cas, de tout d'abord concevoir les glyconanoparticules et de les fonctionnaliser ensuite en milieu aqueux. De plus, les enzymes sont des protéines rédox ayant une taille élevée et il est probable que les cyclodextrines se trouvant en surface ne soient pas toutes impliquées dans le processus d'inclusion, du fait de l'encombrement stérique engendrée par les molécules biologiques. On peut alors imaginer qu'il ne soit pas nécessaire que les GNPs soient entièrement recouvertes de CDs et qu'il serait intéressant de concevoir des glyconanoparticules avec un nombre moins élevé de cyclodextrine en surface. C'est donc dans ce contexte que ce chapitre s'inscrit, avec pour objectif de concevoir des GNPs avec un nombre plus restreint de cyclodextrine en surface. Pour cela, le polystyrène-*bloc*-maltoheptaose (PSMH), dont la structure est représentée sur le Schéma 1, a été utilisé. Comme PSCD, ce copolymère est composé d'une chaîne polystyrène (PS) ($M_n = 4500 \text{ g.mol}^{-1}$), mais avec une terminaison hydrophile différente, qui contrairement à PSCD, ne peut pas former de complexes hôte-invités, du fait de sa conformation linéaire. Ainsi, de façon à obtenir des GNPs hybrides avec un nombre de cyclodextrines différent en surface, différentes fractions de chacun des copolymères (50 % PSCD - 50 % PSMH) (10 % de PSCD - 90 % de PSMH) ont été utilisées. Leur morphologie, leur taille sont comparées à celles conçues à partir de glyconanoparticules « uniques » préparées avec 100 % de PSCD et 100 % PSMH. De plus, afin d'évaluer le nombre de cyclodextrines en surface et comparer leurs propriétés d'inclusion, les glyconanoparticules ainsi formées ont été fonctionnalisées par l'antraquinone sulfonate, molécule amphiphile soluble dans l'eau ayant une partie hydrophobe s'insérant dans la cavité des cyclodextrines avec une constante de 10^3 L.mol^{-1} ^{6,7}. Les caractéristiques électrochimiques des différentes GNPs ainsi conçues sont étudiées en solution et par immobilisation sur support conducteur.

Polystyrène-*bloc*-maltoheptaose PSMH

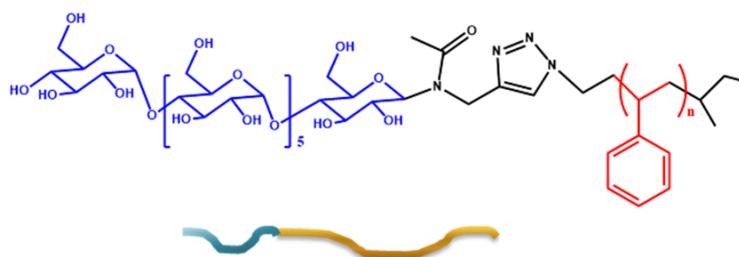


Schéma 1 : Schéma et structure chimique du polystyrène-*bloc*-maltoheptaose (PSMH).

II. Description de la méthode d'assemblage des copolymères

II.1. Choix du solvant et de la concentration en copolymère

Comme réalisé précédemment pour le copolymère PSCD dans le chapitre II, la solubilité de PSMH a été étudiée par SLS dans différents mélanges de solvant à base de THF et de H₂O. On s'attend à avoir un comportement relativement similaire que pour le PSCD, puisque la chaîne de PS possède une masse molaire identique et que l'extrémité est une cyclodextrine ouverte, composée d'un même nombre de sucres. L'intensité diffusée moyenne sur un temps de 120 secondes est reportée sur la Figure 1A en fonction de la composition du solvant. Comme nous pouvons le constater, le PSMH a un comportement similaire à celui de PSCD avec une intensité minimale obtenue pour des mélanges contenant entre 70 et 80 % de THF, signifiant que le copolymère est bien dissous. Comme pour PSCD, un mélange de 80 % de THF et de 20 % d'eau permet de bien solubiliser les chaînes de copolymère PSMH. Pour différentes concentrations en polymère (1, 2, 4, 6 et 7,5 mg.mL⁻¹) (Figure 1B), l'intensité diffusée diminue avec la concentration en copolymère pour atteindre une valeur moyenne de 35 kHz (moyenne effectuée sur les 3 mesures). Ainsi, afin d'être dans les mêmes conditions expérimentales que pour PSCD, la concentration choisie est de 7,5 mg.mL⁻¹.

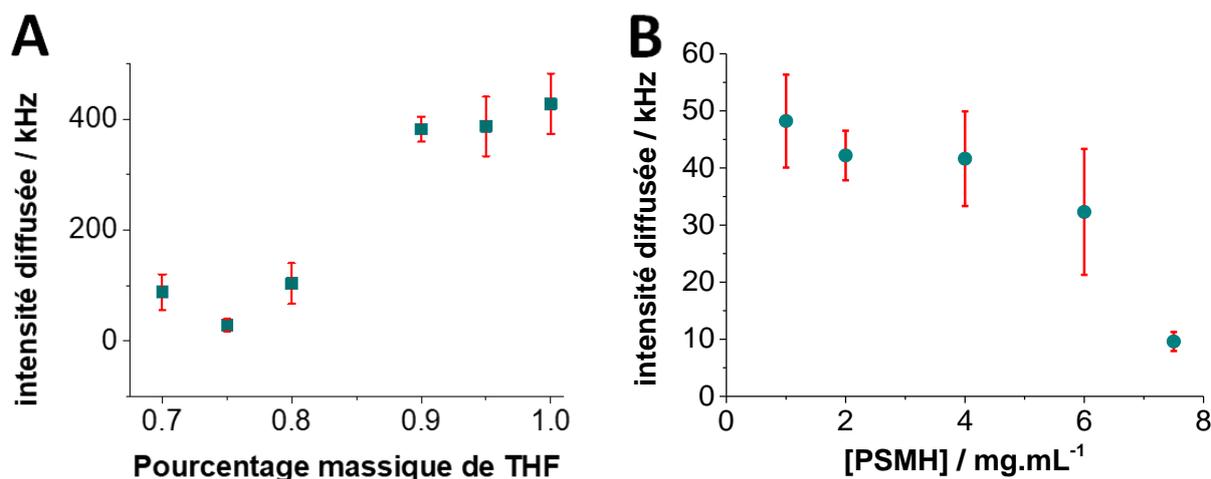


Figure 1 : (A) Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la composition du solvant pour des chaînes de PSMH et (B) évolution de l'intensité diffusée en fonction de la concentration de PSMH. Conditions : (A) $[PSCD] = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\theta = 90^\circ$, $T = 25^\circ\text{C}$, $t_{\text{run}} = 60$ secondes. (B) Evolution de l'intensité diffusée avec une composition de solvant $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ 20:80 % en masse, et une concentration en polymère de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 6 et 7,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

II.2. Description de la méthode d'auto-assemblage des copolymères

Les glyconanoparticules ont été auto-assemblées avec un copolymère unique tel que le PSCD et PSMH ou d'un mélange de ceux-ci avec des proportions en masse de 50 % de chacun des copolymères (50 % PSCD, 50 % PSMH) et de 10 % en masse de PSCD (10 % PSCD, 90 % PSMH). Dans la suite de ce chapitre, les glyconanoparticules ainsi obtenues avec ces proportions de polymère sont notées respectivement GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , $\text{GNP}_{\text{PSCD}50}$ et $\text{GNP}_{\text{PSCD}10}$. Pour réaliser l'auto-assemblage, la même procédure que celle présentée dans le chapitre précédent (Schéma 2) est suivie. Tout d'abord une dilution de 30 mg de copolymères dans un mélange de 80% de THF et 20% d'eau sont ajoutés goutte à goutte à un volume d'eau de 160 mL, afin de permettre l'auto-assemblage des copolymères. Après évaporation du solvant, le volume des solutions après évaporation est mesuré et réajusté avec précision à 160 mL avec de l'eau.

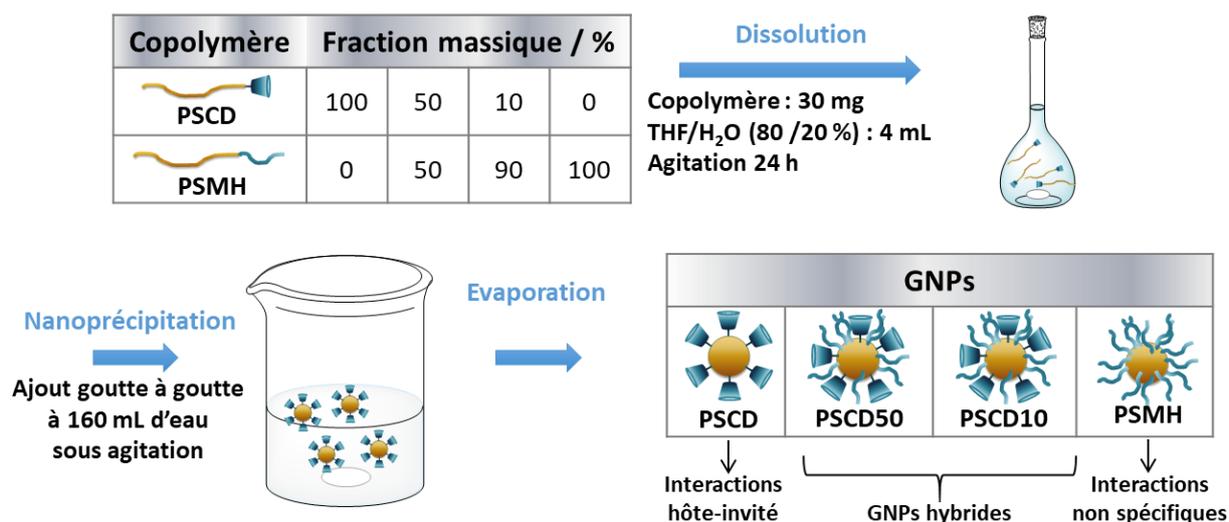


Schéma 2 : Méthode de préparation des différents glyconanoparticules permettant l'auto-assemblage des copolymères pour former les glyconanoparticules.

II.3. Caractérisations des glyconanoparticules : détermination de la forme et de la taille

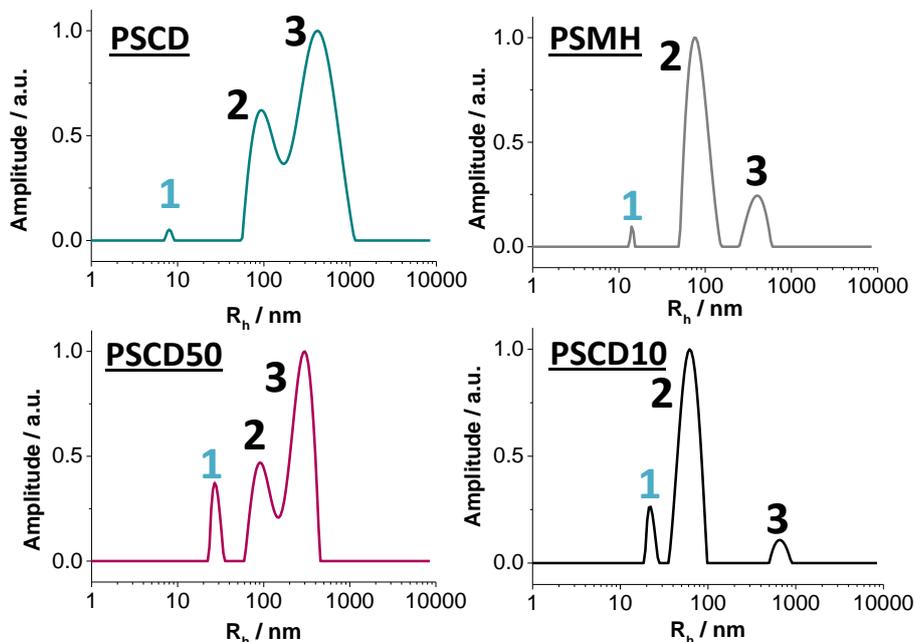
Afin de déterminer la taille et la morphologie des différentes glyconanoparticules, différentes caractérisations ont été effectuées, avec en solution des mesures en DLS et NTA et les mesures en MEB et MET sont venues compléter ces mesures. Les résultats obtenus sont successivement présentés dans les sous-parties suivantes.

II.3.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La taille des différentes glyconanoparticules GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , GNP_{PSCD50} et GNP_{PSCD10} a été étudiée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à un angle de 90°. Nous avons choisi de rassembler de nouveau les résultats obtenus avec GNP_{PSCD} auto-assemblés le même jour, avec des conditions expérimentales identiques, avec notamment une température et un taux d'humidité similaire qui pourraient influencer sur la taille des glyconanoparticules.

Sur la Figure 2 sont reportées les intensités diffusées en fonction du rayon hydrodynamique de chacune des glyconanoparticules. Le tableau représenté dessous récapitule les valeurs en regroupant les moyennes puisque les mesures ont été quadruplées. On peut constater sur la Figure 2, la présence de trois pics signifiant que trois distributions sont présentes pour chacun des mélanges de copolymères. La première distribution est obtenue pour des diamètres de 25, 21, 41 et 40 nm alors que la seconde distribution a des diamètres de 220, 144, 139 et 122 nm pour respectivement les glyconanoparticules GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , GNP_{PSCD50} , GNP_{PSCD10} . Quant à la dernière distribution, elle se situe à des valeurs de 870, 733, 639 et 1785 nm,

mettant en évidence la présence de gros agglomérats. Les solutions obtenues n'ont pas été filtrées, contrairement à ce qui a été décrit au chapitre précédent, expliquant la présence de cette dernière distribution. De plus, l'intensité des pics est beaucoup plus faible pour la distribution ayant le diamètre le plus petit provenant du fait que la distribution dépend du poids signifiant que c'est la distribution majoritaire en nombre. Ainsi, la distribution ayant le plus grand diamètre est minoritaire, voire inexistante en termes de quantité numérique.



Diamètres /nm				
	PSCD	PSMH	PSCD50	PSCD10
Distribution 1	25 ± 17	20 ± 7	41 ± 13	40 ± 7
Distribution 2	220 ± 61	144 ± 7	139 ± 38	122 ± 4
Distribution 3	870 ± 63	733 ± 121	639 ± 206	1785 ± 836

Figure 2 : Fonction de distribution obtenue par DLS pour les GNPs à base de différentes proportions de PSCD et PSMH dont les diamètres sont reportés dans le tableau. Conditions : $\theta = 90^\circ$, $T = 25^\circ\text{C}$, $t_{\text{run}} = 120$ sec, $[\text{copolymère}] = 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$. Incertitudes calculées sur 4 valeurs.

Nous pouvons aussi constater que le diamètre établi pour GNP_{PSCD} , dans cette sous-partie a une valeur de 25 ± 17 nm, alors que dans le chapitre précédent, avec des mesures réalisées au même angle de 90° , le diamètre était de 56 ± 29 nm. En prenant en compte les valeurs des incertitudes, nous pouvons déduire que les résultats sont cohérents.

II.3.2. Analyse du suivi individuel de particules (NTA)

Afin d'obtenir une distribution en nombre des glyconanoparticules conçues, une analyse du suivi individuel de particules est réalisée. Cette méthode présente l'avantage d'enregistrer une vidéo des particules se déplaçant sous un mouvement brownien permettant de les suivre de façon individuelle. A partir de l'équation de Stokes Einstein, les valeurs des diamètres hydrodynamiques sont calculées et reportés sur la Figure 3, pour chacune des glyconanoparticules obtenues.

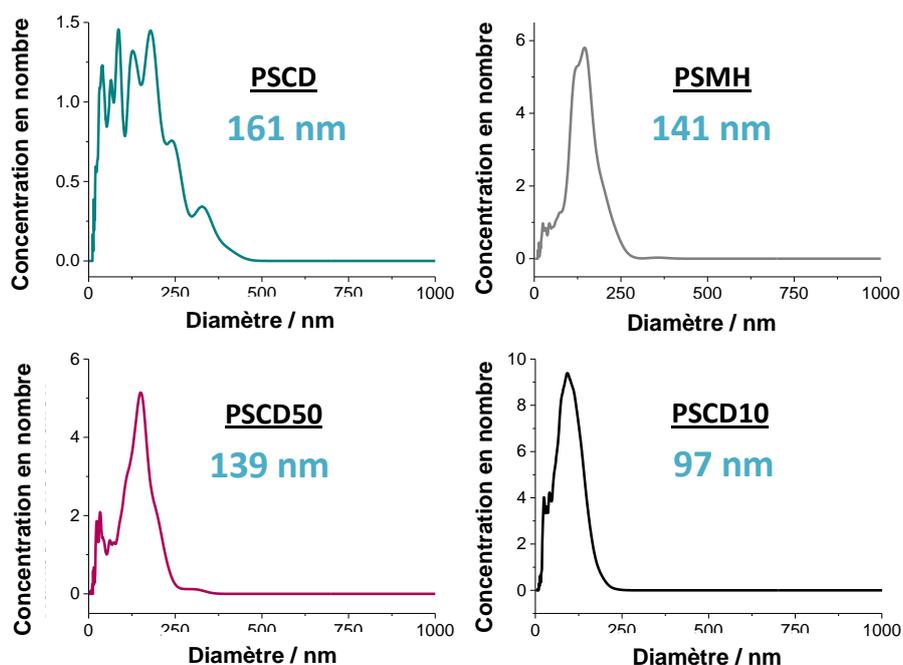


Figure 3 : Fonction de distribution obtenue par NTA pour les GNPs à base de différentes proportions de PSCD et PSMH. Conditions : [copolymère] = 0,02 mg.mL⁻¹. Les diamètres hydrodynamiques calculés avec le logiciel sont notés sur les courbes de distribution.

Les diamètres hydrodynamiques moyens sont de 161, 141, 139 et 97 nm pour respectivement les glyconanoparticules GNP_{PSCD}, GNP_{PSMH}, GNP_{PSCD50} et GNP_{PSCD10}. En tenant compte des incertitudes mesurées pour les diamètres en DLS, cette méthode met en évidence la seconde distribution déterminée par DLS. La Figure 3 indique également qu'au-dessus d'un diamètre de 250 nm, il n'y a pas de glyconanoparticules, confirmant de nouveau les résultats obtenus en DLS, la troisième distribution déterminée en DLS est donc bien en quantité négligeable. Cette technique n'est pas appropriée pour mesurer des particules ayant des diamètres inférieurs à 30 expliquant pourquoi les valeurs des diamètres observés par NTA ne sont pas centrées sur la première distribution obtenue en DLS mais sur la deuxième.

II.3.3. Microscopies

II.3.3.a. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les clichés obtenus par MEB (Figure 4) mettent en évidence la forme sphérique de chacune des glyconanoparticules et à partir des diamètres mesurés, sont tracées les distributions en nombre pour chacune des glyconanoparticules (Figure 5).

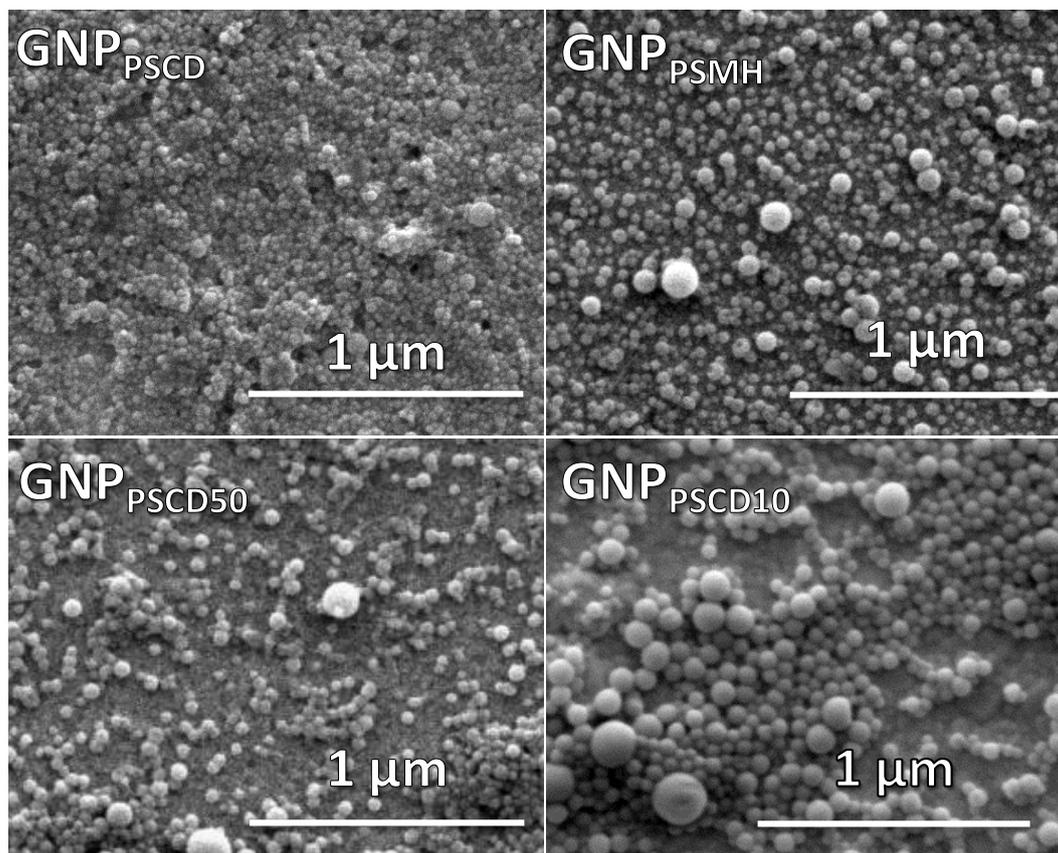


Figure 4 : Clichés de MEB des GNP/AQ obtenues par post-fonctionnalisation de respectivement GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$ et $\text{GNP}_{\text{PSCD10}}$. La meilleure définition pour les images obtenues $\text{GNP}_{\text{PSCD10}}$ vient de la métallisation $\text{GNP}_{\text{PSCD10}}$.

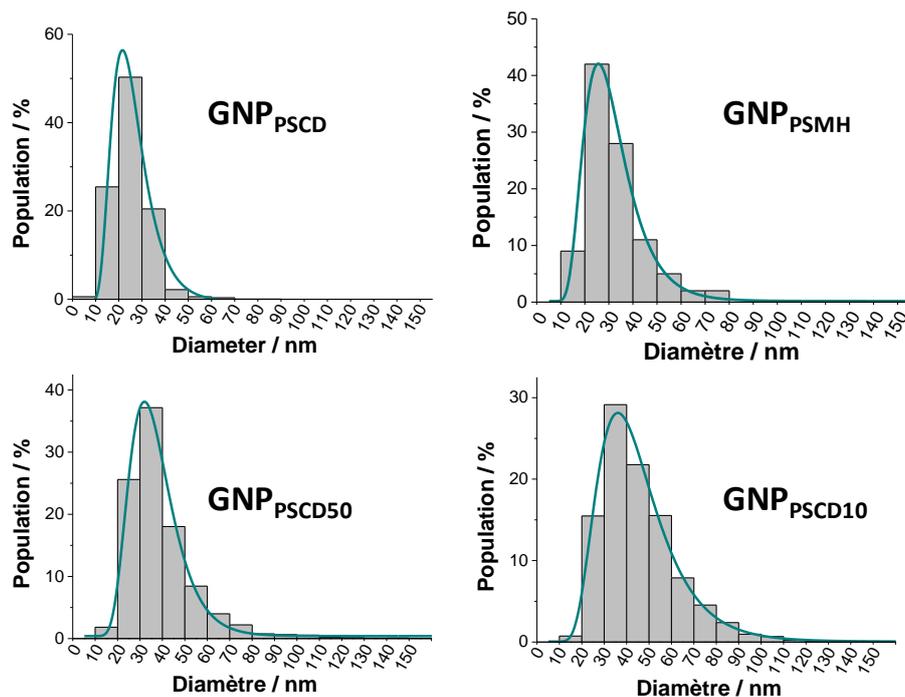


Figure 5 : Distribution de GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , GNP_{PSCD50} et GNP_{PSCD10} en fonction de leur diamètre déterminé par MEB. Diamètres de GNP_{PSCD} : 20 nm ($R^2 = 0,9925$), GNP_{PSMH} : 24 nm ($R^2 = 0,9981$), GNP_{PSCD50} : 30 nm ($R^2 = 0,9947$), GNP_{PSCD10} : 37 nm ($R^2 = 0,9957$).

La distribution la plus importante en nombre est obtenue pour des diamètres respectifs de 20, 24, 30 et 37 nm pour respectivement GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , GNP_{PSCD50} et GNP_{PSCD10} . Par ailleurs, les particules issues d'un copolymère unique GNP_{PSCD} et GNP_{PSMH} ont des répartitions plus réduites que les particules hybrides GNP_{PSCD} (Tableau 1) puisque 99 % de GNP_{PSCD} et 99 % de GNP_{PSMH} ont un diamètre inférieur à 50 nm et 80 nm respectivement alors que pour les particules hybrides, les distributions s'étendent jusqu'à 100 nm et 110 nm pour GNP_{PSCD50} et GNP_{PSCD10} respectivement.

Tableau 1 : Répartition de l'effectif des GNPs en fonction de leur diamètre et de leur composition.

GNP	PSCD	PSMH	PSCD50	PSCD10
Moyenne	20 nm	24 nm	30 nm	37 nm
95^{ème} centile	40 nm	60 nm	70 nm	80 nm
99^{ème} centile	50 nm	80 nm	100 nm	110 nm

II.3.3.b. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les clichés obtenus par MET (Figure 6) confirment la forme sphérique des glyconanoparticules.

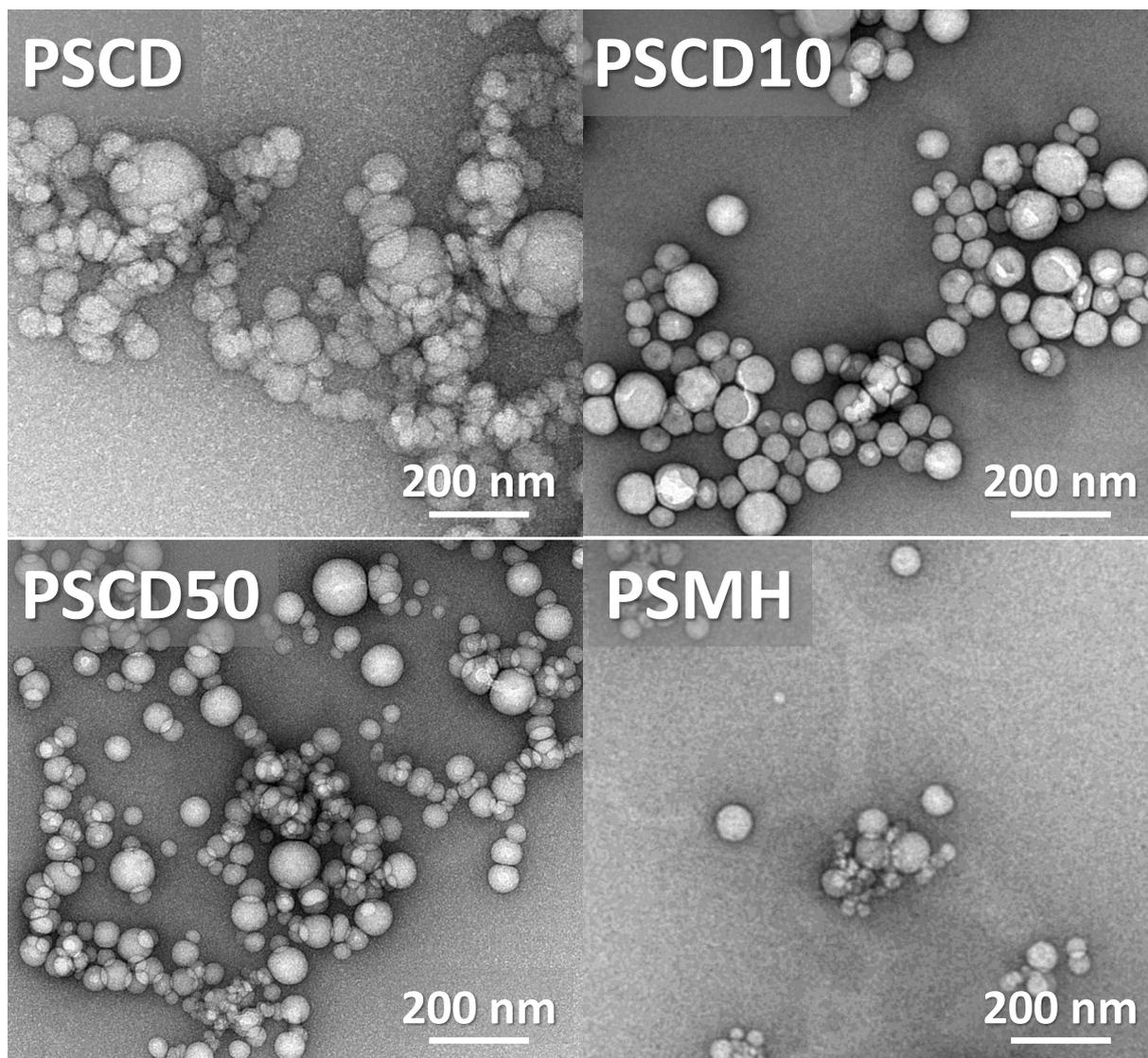


Figure 6 : Clichés de MET des GNP/AQ obtenues par post-fonctionnalisation de respectivement GNP_{PSCD} , $\text{GNP}_{\text{PSCD10}}$, $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$ et GNP_{PSMH} .

La distribution de la taille en nombre est présentée sur la Figure 7 et montre un diamètre moyen pour chacune des glyconanoparticules proche de celui obtenu en MEB avec des valeurs de diamètre de 26 nm, 32 nm, 36 nm et 34 nm pour GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$ et $\text{GNP}_{\text{PSCD10}}$. La valeur qui s'écarte le plus de celle obtenue par MEB (32 au lieu de 24 nm) est pour GNP_{PSMH} , mais dans ce cas, nous pouvons constater que $R^2 = 0,9729$ alors que pour la modélisation des courbes par MEB, la valeur de $R^2 = 0,9981$, pouvant expliquer en plus des incertitudes de mesures la différence des résultats.

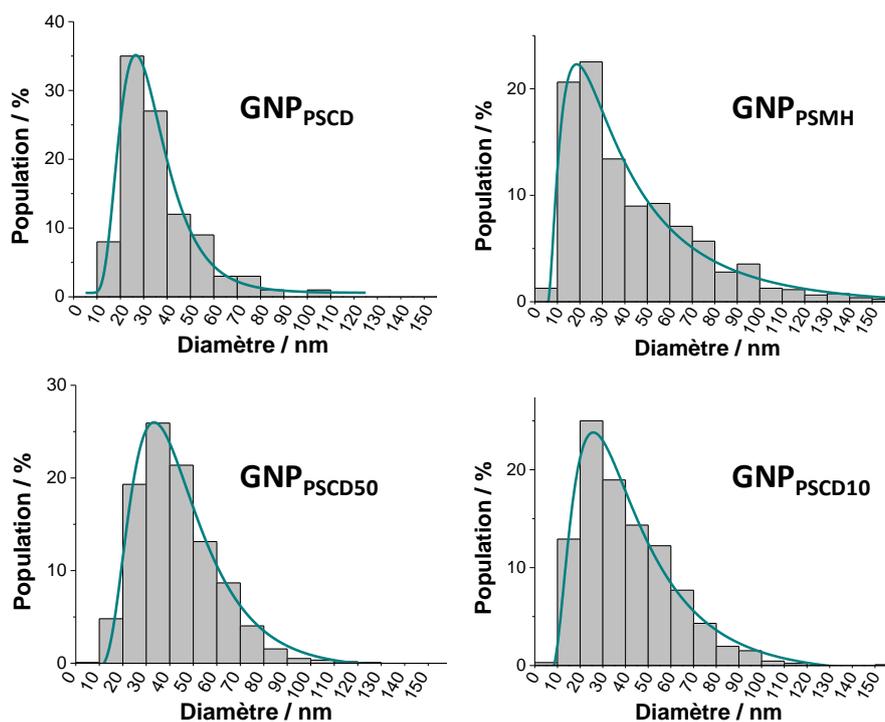


Figure 7 : Distribution obtenue en MET des GNPs de différentes compositions en fonction de leur diamètre. Diamètres GNPs à base de PSCD : 26 nm ($R^2 = 0,9871$), PSMH : 32 nm ($R^2 = 0,9729$), PSCD50 : 36 nm ($R^2 = 0,9861$), PSCD10 : 34 nm ($R^2 = 0,9846$).

Les dispersions sont plus étendues que précédemment, avec 99 % des diamètres compris en dessous de 110 nm, 140 nm, 90 nm et 100 nm pour GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , GNP_{PSCD50} et GNP_{PSCD10} respectivement (Tableau 2). Ces résultats sont en adéquation avec les précédentes mesures, confirmant que la population majoritaire est effectivement celle avec le plus petit diamètre, comprise entre 20 et 40 nm, les différences pouvant de nouveau s'expliquer par une valeur de R^2 s'écartant de 1.

Tableau 2 : Répartition de l'effectif des GNPs en fonction de leur diamètre et de leur composition.

GNP	PSCD	PSMH	PSCD50	PSCD10
Moyenne	26 nm	32 nm	36 nm	34 nm
95^{ème} centile	80 nm	100 nm	80 nm	80 nm
99^{ème} centile	110 nm	140 nm	90 nm	100 nm

III. Fonctionnalisation des glyconanoparticules

III.1. Procédure

Pour fonctionnaliser les GNPs par une espèce rédox, l'anthraquinone sulfonate (AQS), un dérivé de AQ possédant un groupement sulfonate, comme représenté sur le Schéma 3, a été utilisée. Ayant un groupement chargé en solution, AQS est plus hydrophile que AQ et est soluble dans l'eau.

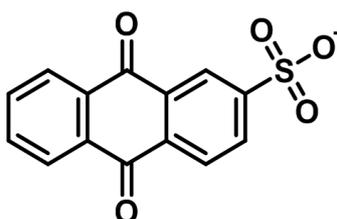


Schéma 3 : Structure de l'anthraquinone sulfonate (AQS).

En utilisant les propriétés d'inclusion des cyclodextrines situées en surface des GNPs, les différentes glyconanoparticules conçues ont été fonctionnalisées par AQS en suivant la procédure décrite sur le Schéma 4. En s'appuyant sur des exemples issus de la littérature, les différentes GNPs sont mises en présence d'un excès d'AQS et exposées pendant 2 h à des ultrasons, l'excès de molécules devant être éliminé⁸.

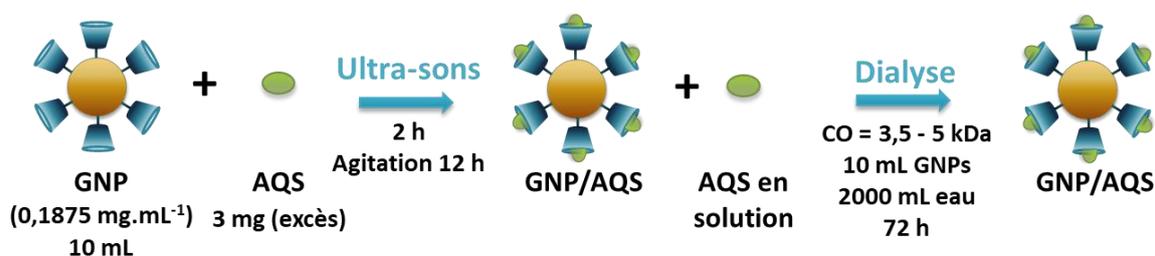


Schéma 4 : Méthode de fonctionnalisation des GNPs en les exposant à des ultra-sons et purification des GNPs par dialyse.

III.2. Mise au point de la méthode de dialyse

La méthode de dialyse est utilisée pour éliminer AQS restant en solution, non insérée dans les cavités des cyclodextrines après la fonctionnalisation. Les membranes de dialyse sont perméables et constituées d'un enchevêtrement de fibres de cellulose. Le principe de fonctionnement de celles-ci repose sur la diffusion d'un soluté en fonction de son gradient de concentration à travers ses parois pour arriver à un équilibre de concentration. Le diamètre des

pores de la membrane permet de séparer sélectivement les composés en fonction de leur taille. Le bain de dialyse à l'extérieur de la membrane est mis sous agitation et est changé régulièrement pour permettre la bonne diffusion des espèces. Le seuil de coupure des membranes de dialyse (cut off, CO) a été choisi de façon à ce que seules les molécules d'AQS, de masse molaire de $310,26 \text{ g.mol}^{-1}$, diffusent. Pour que la dialyse soit efficace, le CO doit être le plus élevé possible pour pouvoir éliminer facilement les molécules, et doit être au moins deux fois plus petit que la masse molaire des macromolécules à conserver. Les GNPs sont formées de plusieurs chaînes de polymères de masse moléculaire de 5700 g.mol^{-1} chacune, et de taille supérieure à 10 nm de diamètre. D'après les indications des fournisseurs, pour une taille d'objets de 10 nm, afin que ceux-ci ne soient pas éliminés par dialyse, les pores doivent être inférieurs à 100 kDa. Pour trouver les conditions expérimentales, la dialyse a tout d'abord été réalisée avec une solution de AQS de concentration identique à celle utilisée pour fonctionnaliser les glyconanoparticules, soit $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ et afin de suivre la concentration au cours du temps dans le sac de dialyse de AQS, des CV ont été effectuées avant et après 72 h de dialyse. Au début de la dialyse, la CV (Figure 8A, courbe a) présente un signal important caractéristique de AQS détecté à $E_{1/2} = -0,59 \text{ V vs. ECS}$ avec des valeurs de courants de pic cathodique et anodique importantes ($i_{pc} = -28 \text{ }\mu\text{A}$, $i_{pa} = 20 \text{ }\mu\text{A}$) alors qu'après 72 h de dialyse et dans les mêmes conditions d'analyse, aucun signal relatif à AQS n'est observable (Figure 8A, courbe b). Sur la CV tracée avec un agrandissement de l'échelle (Figure 8B, courbe b), les valeurs de courants sont difficilement mesurables, attestant que la concentration en AQS dans le sac de dialyse est suffisamment faible pour ne pas être détecté par CV. Le temps de 72 h a donc été choisi pour éliminer AQS libre en solution dans le cas de la fonctionnalisation des différentes glyconanoparticules par AQS, en utilisant une membrane avec un seuil de coupure de 3,5 – 5 kDa. De façon identique, la courbe de voltampérométrie cyclique a été tracée pour les GNPs (Figure 8B, courbe b) en présence de AQS après 72 h de dialyse. Le système détecté à $E_{1/2} = -0,53 \text{ V vs. ECS}$ (8B, courbe b), est dû à l'électroactivité des anthraquinones insérées dans les cyclodextrines. Il est à préciser qu'il est difficile de comparer les $E_{1/2}$ mesurés pour AQS seul et pour $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$ car les CV n'ont pas été réalisées à un pH contrôlé. Cette étape de dialyse est fastidieuse et il est important de respecter les conditions expérimentales (voir chapitre expérimental) pour que la dialyse soit efficace.

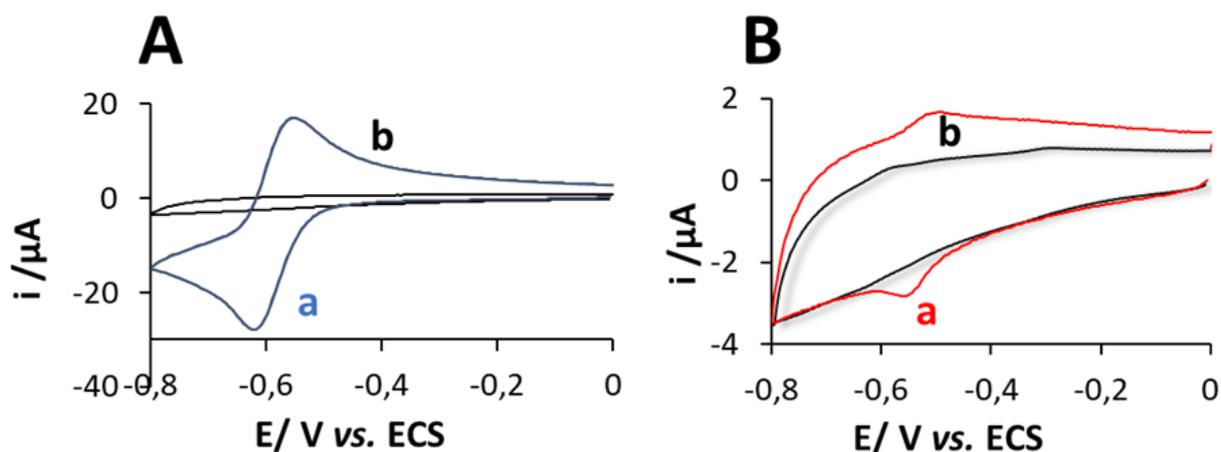


Figure 8 : (A) CV de AQS ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) dans $\text{H}_2\text{O} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ avant (a) et après 72h de dialyse (b) (B) CV de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$ après 72h de dialyse (a) de AQS après 72 H de dialyse (b). Conditions : électrodes de carbone vitreux, $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$, solution dégazée sous argon.

IV. Caractérisation de la morphologie et détermination de la tailles des GNPs après fonctionnalisation

IV.1. Caractérisation des GNPs par MET

Les tailles des GNPs après fonctionnalisation et dialyse n'ont pas été déterminées par MEB car les images obtenues n'étaient pas exploitables. Sur l'ensemble des clichés MET, Figure 9, représentant les différentes glyconanoparticules, on peut noter la présence d'objets sphériques mais aussi de nombreuses GNPs souvent agglutinées. Ceci pourrait être dû à la méthode de séchage lors de la préparation des échantillons, rendant le comptage par la suite de celles-ci difficile et pouvant induire un nombre conséquent d'erreurs. Néanmoins, comme l'attestent les courbes de distribution, les dimensions trouvées sont cohérentes avec celles déterminées précédemment, avec des diamètres compris entre 22 et 34 nm, la valeur la plus surprenante étant pour celle de $\text{GNP}_{\text{PSCD}10}/\text{AQS}$ qui a un diamètre inférieur à celui avant fonctionnalisation.

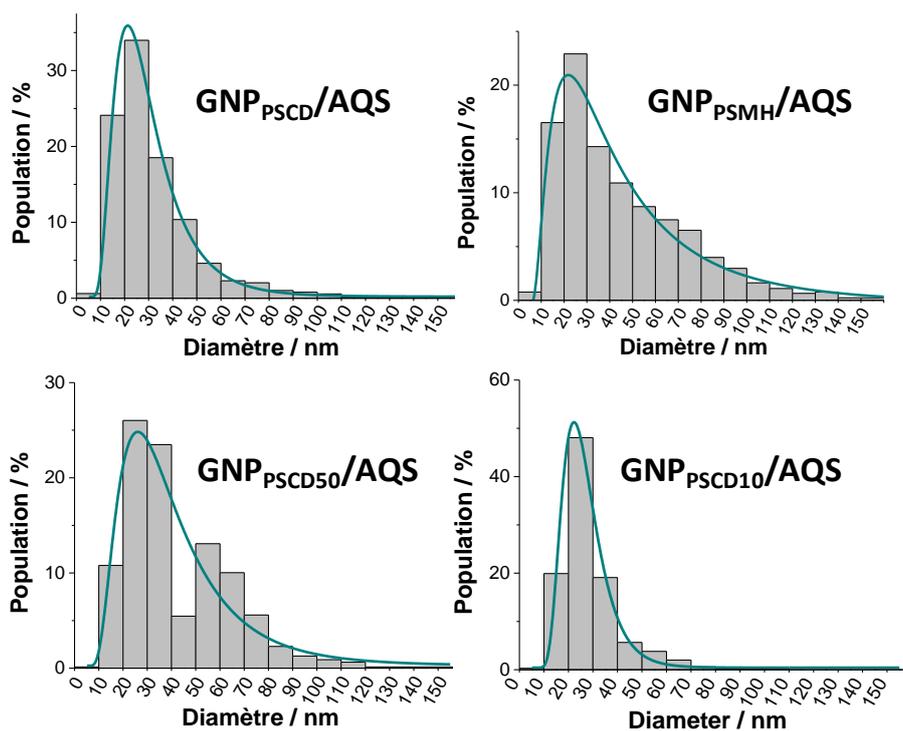
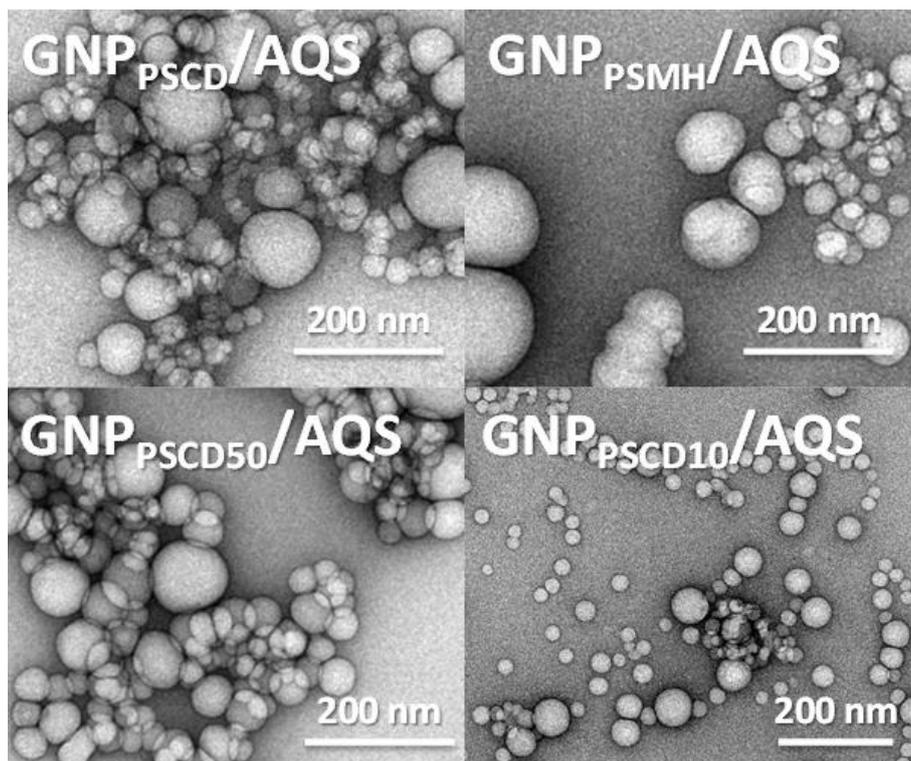


Figure 9 : Clichés et distribution obtenue en MET des GNP/AQS de différentes compositions en fonction de leur diamètre. Diamètres GNPs à base de PSCD : 22 nm ($R^2 = 0,9981$), PSMH : 34 nm ($R^2 = 0,9734$), PSCD50 : 31 nm ($R^2 = 0,8443$), PSCD10 : 20 nm ($R^2 = 0,9965$).

Tableau 3 : Répartition de l'effectif des GNP/AQS en fonction de leur diamètre et de leur composition.

GNP	PSCD/AQS	PSMH/AQS	PSCD50/AQS	PSCD10/AQS
Moyenne	22 nm	34 nm	31 nm	20 nm
95 ^{ème} centile	70 nm	100 nm	80 nm	50 nm
99 ^{ème} centile	110 nm	140 nm	110 nm	70 nm

Concernant les distributions, Tableau 3, les GNPs suivent la même tendance que précédemment, le 99^{ème} centile étant légèrement plus élevé.

IV.1. Caractérisation des GNPs par DLS

De même par DLS, Figure 10 et Tableau 4, trois distributions sont visibles avec des tailles cohérentes aux tailles mesurées avant fonctionnalisation en prenant en compte les valeurs d'incertitude.

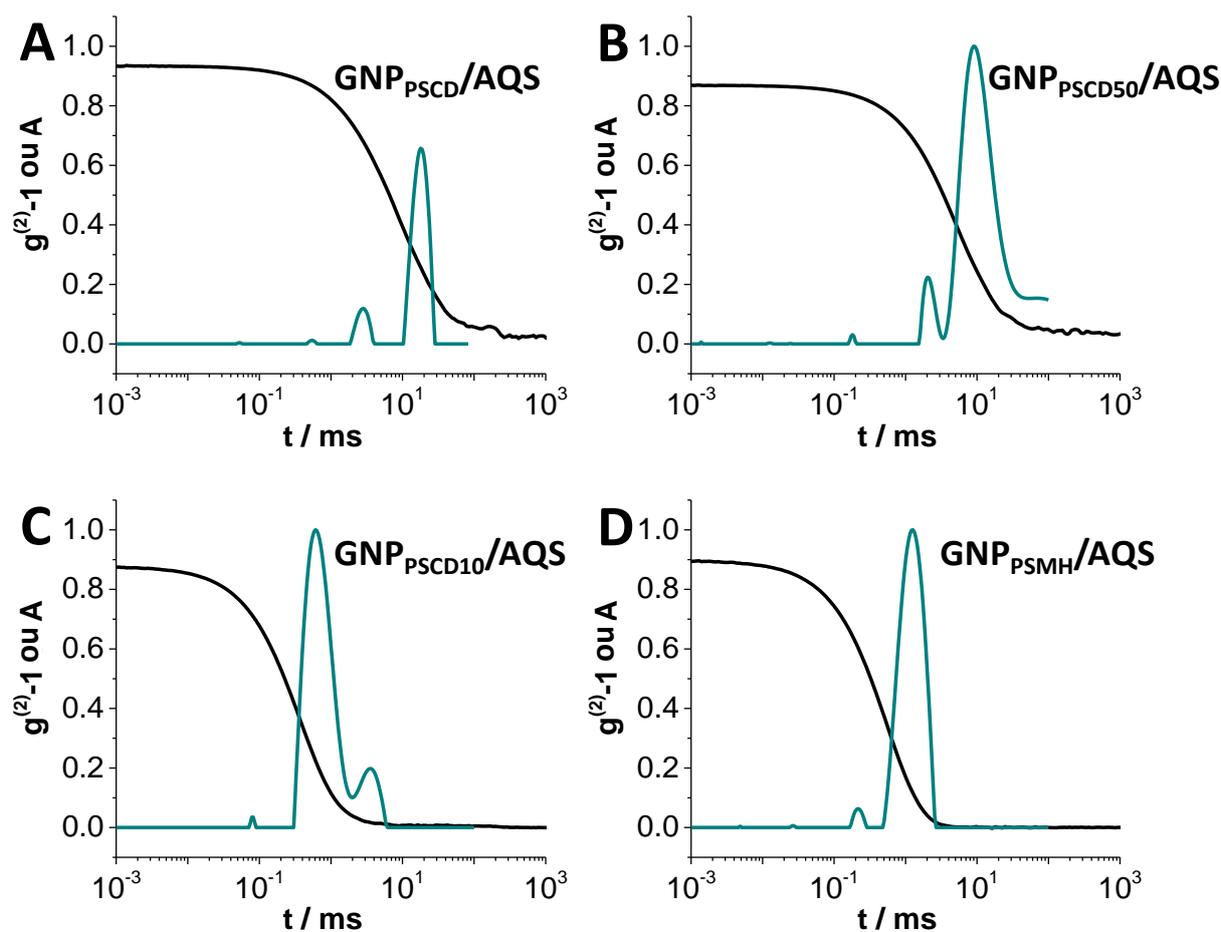


Figure 10 : Courbes d'autocorrélation (courbe noire) et distribution du temps de relaxation (courbe verte) des différents types de GNPs après fonctionnalisation avec AQS, obtenues par DLS. Conditions : $\theta = 90^\circ$, $T = 25^\circ C$, $t_{run} = 120$ sec, [copolymère] = 0,02 mg.mL⁻¹. Incertitudes calculées sur 4 valeurs.

Tableau 4 : Taille des GNPs après fonctionnalisation avec AQS déterminées par DLS.

Diamètre GNP / nm			
PSCD/AQS	PSMH/AQS	PSCD50/AQS	PSCD10/AQS
58 ± 30	43 ± 18	44 ± 13	20 ± 13
505 ± 80	228 ± 26	363 ± 180	110 ± 5
3375 ± 443		1913 ± 431	675 ± 47

V. Etude des propriétés électrochimiques des différentes glyconanoparticules

V.1. Etude électrochimique des différentes glyconanoparticules en solution

Les CV des différentes glyconanoparticules conçues fonctionnalisées par AQS, $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$ (Figure 11A) $\text{GNP}_{\text{PSMH}}/\text{AQS}$ (Figure 11B), $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}/\text{AQS}$ (Figure 11C), $\text{GNP}_{\text{PSCD10}}/\text{AQS}$ (Figure 11D) ont été comparées à celles de leur jumelles non fonctionnalisées GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$, $\text{GNP}_{\text{PSCD10}}$ en milieu aqueux à $\text{pH} = 6$ en présence de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Comme attendu, les glyconanoparticules non fonctionnalisées ne présentent aucun pic cathodique dans la gamme de potentiel étudié (entre 0,0 V et - 0,8 V). En revanche, pour chacune des glyconanoparticules fonctionnalisées, dans les mêmes gammes de potentiel, un pic de réduction d'intensité variable est détecté, associé aussi à un pic d'oxydation lors du balayage retour moins bien défini.

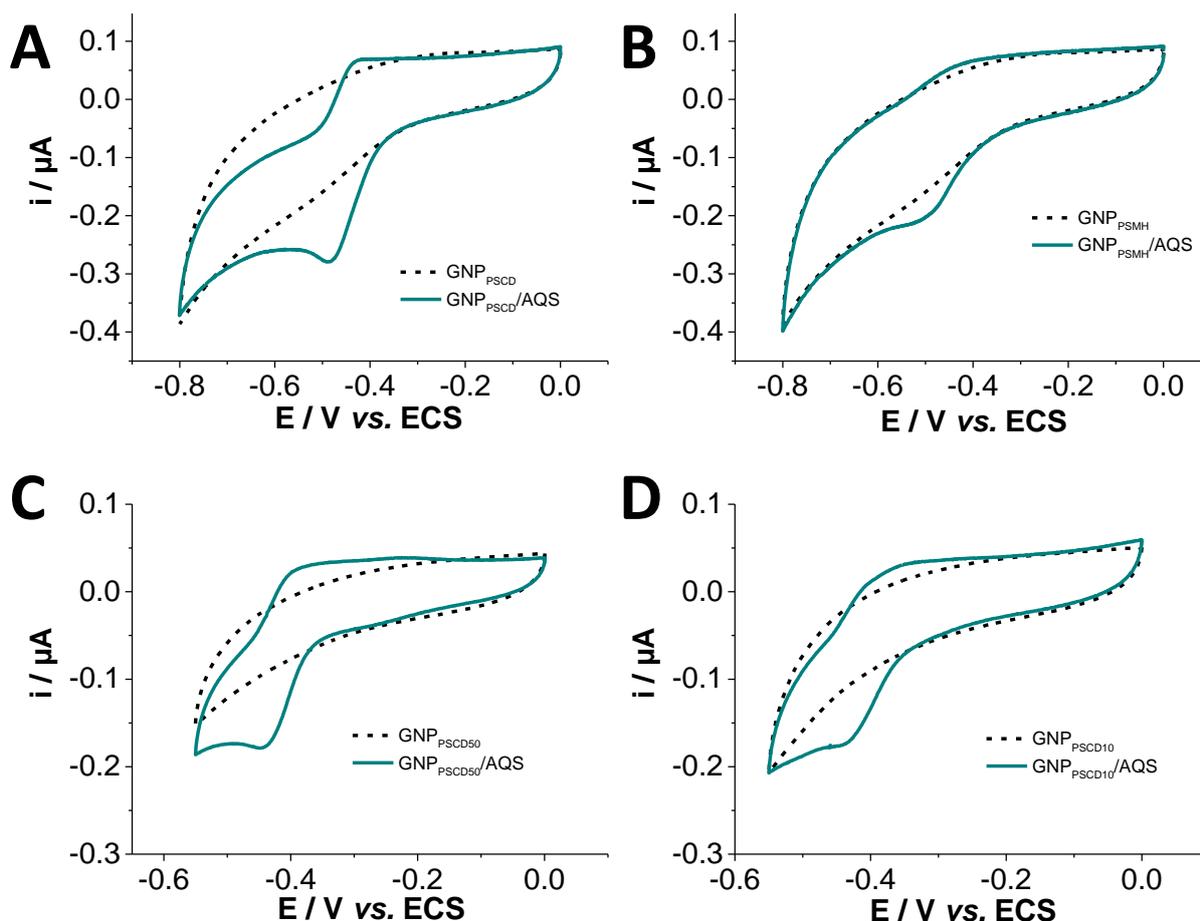


Figure 11 : CV sur électrode de carbone vitreux d'une solution de GNP/AQS après dialyse.

Conditions : [copolymère]_{totale} = 0,18 mg.mL⁻¹ dans H₂O + 0,1 mol.L⁻¹ KCl, sous Ar, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$. Le pH est ajusté avec 200 μL de tampon McIlvaine à pH = 6 dans 2 mL de GNPs (B). Concentrations des polymères avant dialyse GNP_{PSCD10} : [PSCD] = 0,018 mg.mL⁻¹ ; [PSMH] = 0,162 mg.mL⁻¹. GNP_{PSCD50} : [PSCD] = [PSMH] = 0,090 mg.mL⁻¹.

Comme attendu, la valeur de courant la plus élevée est celle mesurée avec les GNP_{PSCD}/AQS ($-0,3 \mu\text{A}$) qui possède en leur surface le plus de cyclodextrines, montrant ainsi le succès de l'inclusion de AQS dans les cyclodextrines. Afin de comparer les valeurs de courants à celles de GNP_{PSCD}/AQS, nous avons choisi de normer la valeur du courant faradique à 100 % pour GNP_{PSCD}/AQS pour rendre la lecture plus facile, ainsi il est possible de reporter les valeurs de courants des autres glyconanoparticules en % par rapport à GNP_{PSCD}/AQS. Du Tableau 5, nous pouvons constater que le signal de GNP_{PSMH} correspond à 30 % du signal de GNP_{PSCD}, mettant en évidence des interactions non spécifiques entre AQS et le maltoheptaose, pouvant être par exemple des liaisons hydrogène ou encore des interactions entre les cycles de l'anthraquinone et les chaînes de polymères. Le signal de GNP_{PSCD10}, est très proche de la valeur du signal de GNP_{PSMH}. En revanche pour les GNP_{PSCD50}, le signal de 67 % est très proche de la valeur attendue si l'on considère que le signal résulte de la somme des moitiés des signaux des glyconanoparticules uniques. En ce que concerne les potentiels, les valeurs de E_{pc} (Tableau 5) pour les nanoparticules hybrides sont comprises entre les potentiels de pic E_{pc}

des particules uniques, suggérant que les valeurs de potentiel sont dépendantes du type d'interaction entre GNPs et l'antraquinone. Plus les particules sont couvertes de cyclodextrines, plus E_{pc} se déplace vers la valeur de E_{pc} de GNP_{PSCD} et s'éloigne de GNP_{PSMH} .

Tableau 5 : Valeur de potentiels de pic cathodique des différentes GNPs fonctionnalisées par AQS et intensités du courant de pic cathodique en pourcentage par rapport aux GNP_{PSCD} prises comme référence (la proportion de signal est fixée à 100 % pour celles-ci, 3 mesures ont été réalisées pour calculer les incertitudes. Les valeurs de potentiels sont données à ± 5 mV).

GNP	PS- <i>b</i> -CD	PS- <i>b</i> -MH	PS- <i>b</i> -CD50	PS- <i>b</i> -CD10
E_{pc} / V vs. SCE	-0.430	-0.445	-0.433	-0.435
Courant / %	100 \pm 7	30 \pm 5	67 \pm 16	32 \pm 12

L'étude en fonction du pH, Figure 12, permet de mettre en évidence le mécanisme de réaction d'oxydoréduction de AQS à $2 e^- / 2 H^+$ puisque le potentiel de pic cathodique E_{pc} varie linéairement avec le pH, avec une pente, comme attendue, de 57 mV par unité de pH⁹⁻¹¹.

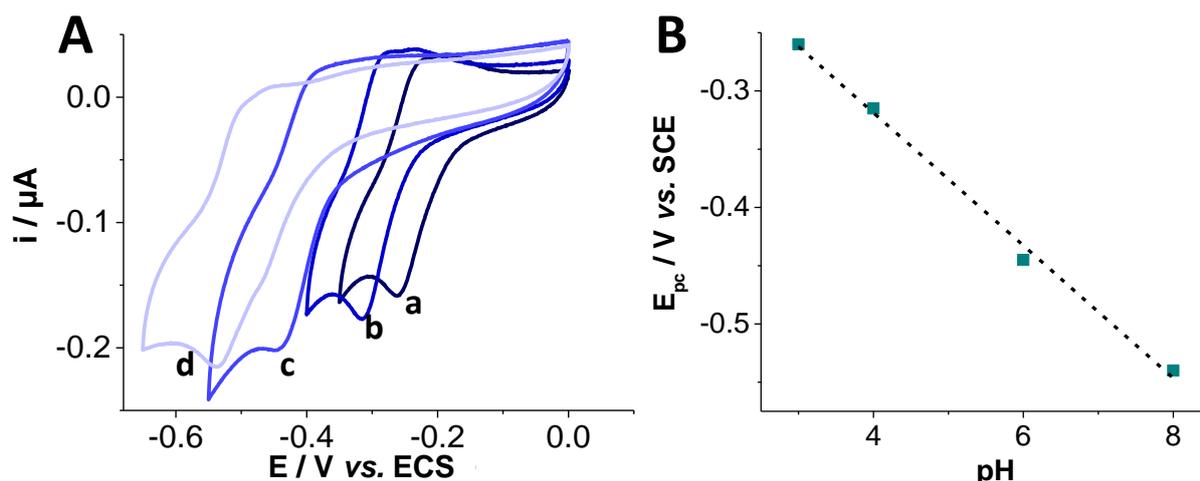


Figure 12 : CV sur électrode de carbone vitreux d'une solution de GNP/AQS après dialyse.

Conditions : [copolymère] = 0,14 mg.mL⁻¹, sous Ar, $\nu = 10$ mV.s⁻¹. Le pH est ajusté avec 0,5 mL de tampon McIlvaine (pH_a = 3 ; pH_b = 4 ; pH_c = 6 ; pH_d = 8) dans 2 mL de GNPs. Equation de la droite : $E_{1/2} = -0,057 \text{ pH} - 0,091$; $R^2 = 0,9934$.

V.2. Immobilisation de GNP_{PSCD}/AQS sur MWCNT

Les images MEB de GNP_{PSCD}/AQS déposées sur des nanotubes de carbone multi-parois sont présentées sur la Figure 13 (A, B, C, D). Une fente a été réalisée à l'aide d'une aiguille sur la surface afin d'observer les différentes couches déposées sur l'électrode. On discerne tout d'abord aux bords de la fente, la surface du substrat de carbone (noté **1** sur les images), puis les MWCNTs (noté **2**) et enfin une couche superficielle homogène de GNPs (noté **3**). L'image D permet de montrer la conservation de la forme sphérique de GNP_{PSCD}, immobilisée sur nanotubes de carbone.

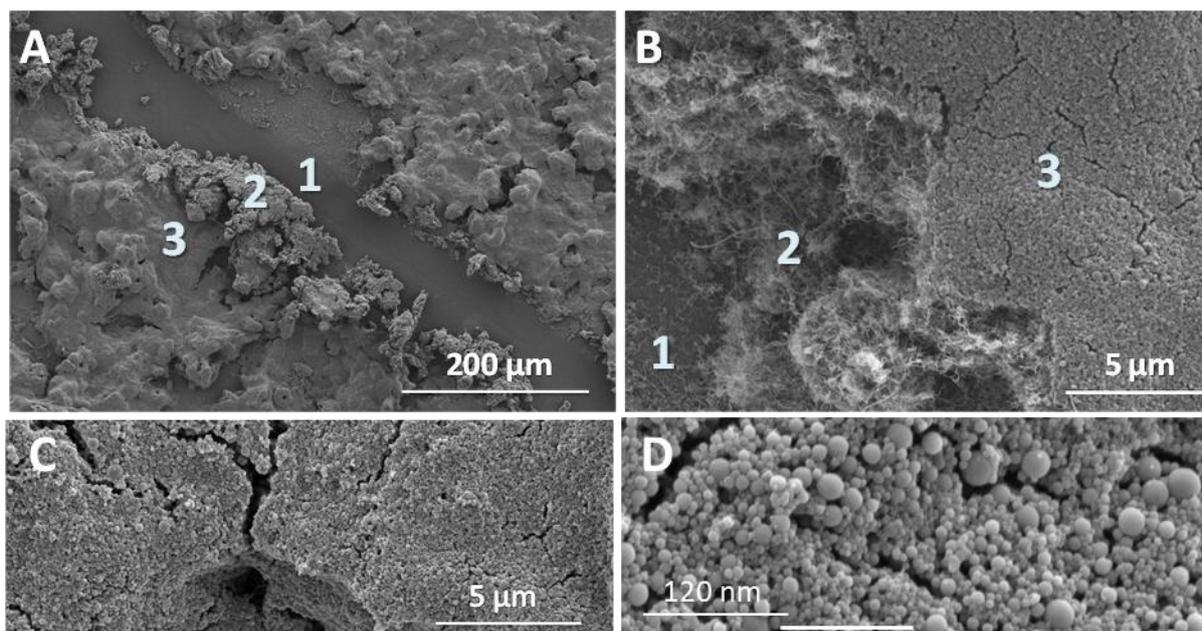


Figure 13 : Clichés A, B, C, D de MEB des GNP_{PSCD}/AQS déposées sur des MWCNTs à différents grossissements. 3 couches sont visibles : le support de carbone (1), les MWCNTs (2) et les GNPs (3).

Comme précédemment, les électrodes ont été étudiées par voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayage (Figure 14A) variant de $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ à $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Un système de pics est détecté à $E_{1/2} = -0,427 \text{ V vs. ECS}$, avec $\Delta E_p = 17 \text{ mV}$ à une vitesse de balayage de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. La variation linéaire du courant avec la vitesse de balayage (Figure 14B) confirme le succès de l'immobilisation de ces objets sur les nanotubes de carbone.

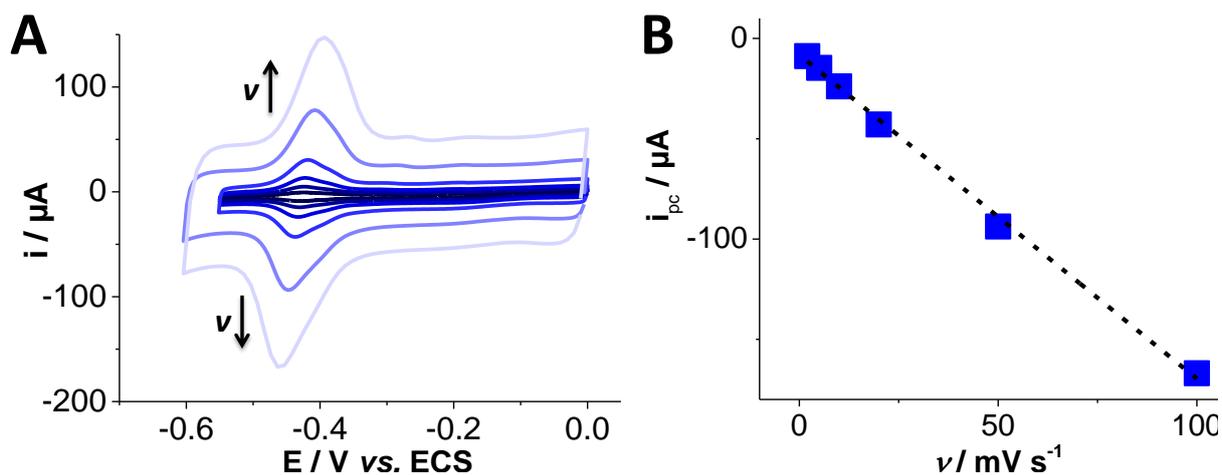


Figure 14 : CV des électrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNTs et de $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQS}}$ à différentes vitesses de balayage (A) et variation du courant de pic cathodique en fonction de la vitesse de balayage (B). **Conditions :** 20 μL MWCNT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans NMP), 50 μL $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQS}}$, 5 mL McIlvaine pH = 6, Ar, $\nu = 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Equation de la droite (B) : $i_{\text{pc}} = -1,62 \nu - 8,17$; $R^2 = 0,9976$.

De plus, les CV tracées à différents pH, Figure 15 ainsi que le tracé de $E_{1/2}$ en fonction du pH confirme le mécanisme à $2 e^- / 2 H^+$, comme précédemment démontré en solution, avec une pente de 57,9 mV par unité de pH (Figure 15B).

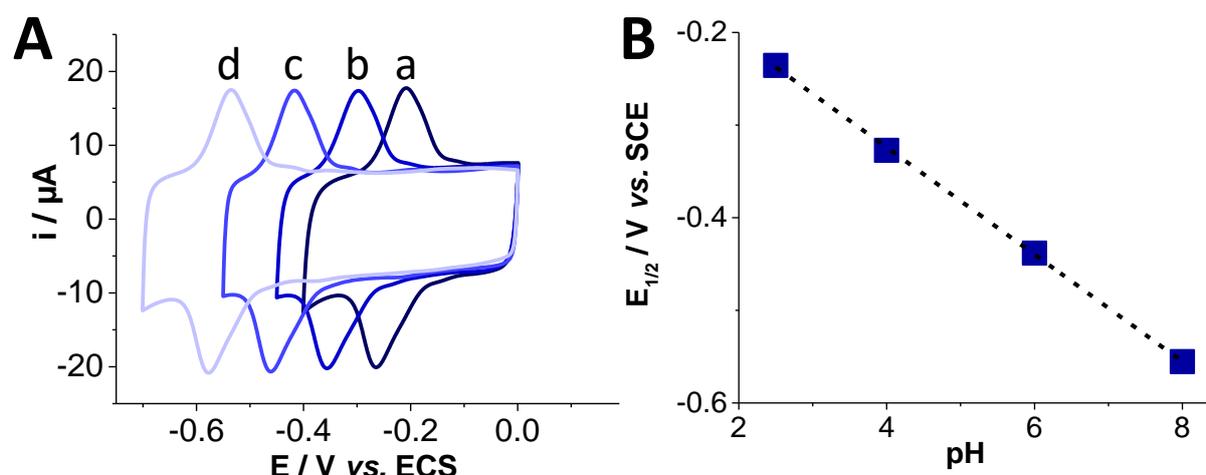


Figure 15 : CV des électrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNTs et de $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQS}}$ à différents pH (A) et variation du potentiel de demi-pic en fonction du pH (B). **Conditions :** 20 μL MWCNT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans NMP), 50 μL $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQS}}$, $\nu = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ar, 5 mL tampon (Britton-Robinson) pH = 2,5 (a) ; 4 (b) ; 6 (c) ; 8 (d). Equation de la droite (B) : $E_{1/2} = -0,058 \text{ pH} - 0,093$; $R^2 = 0,9998$.

La conservation du signal de réduction de AQS à 86 % (diminution du courant de pic de $-1,198\cdot 10^{-5}$ à $-1,036\cdot 10^{-5}$ A) en réalisant 50 cycles entre 0,0 V et $-0,6$ V vs. ECS, Figure 16A permet de montrer l'excellente stabilité des électrodes. La stabilité du signal au cours du temps, Figure 16B, a été aussi évaluée en réalisant des CV pendant plus de 30 jours. On peut déduire de la Figure 16B, que le courant atteint une valeur constante au bout de 10 jours avec conservation de 40 % du signal initial. Cette perte de courant semble liée essentiellement à la

dégradation du dépôt de nanotubes qui, en séchant, finit par se craqueler et se détacher en partie.

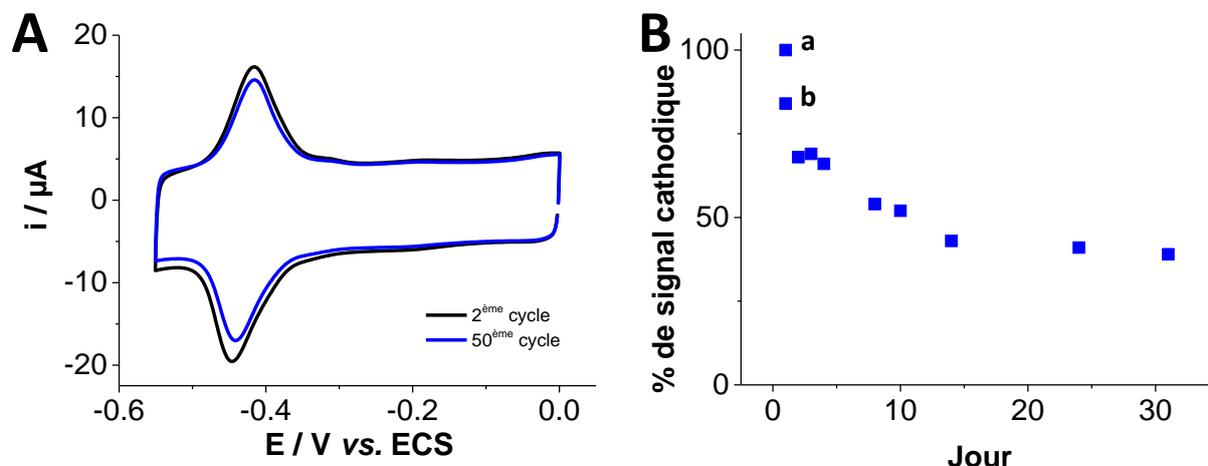


Figure 16 : CV des électrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNTs et de GNP_{PSCD}/AQS (A) et étude de la stabilité au cours du temps (B). Conditions : 20 μL MWCNT ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans NMP), 50 μL GNP_{PSCD}/AQS, 5 mL McIlvaine pH = 6, $\nu = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ar. CV sur la même électrode au bout de 1 cycle (a) et 50 cycles (b) le même jour, puis à différents jours d'intervalle.

De plus, afin de connaître la quantité maximale de polymère permettant de recouvrir des nanotubes de carbone, des CV des électrodes incubées avec des volumes croissants de GNP_{PSCD}/AQS ont été enregistrées entre 0,0 V et $-0,6$ V (Figure 17A). La Figure 17B met en évidence la croissance des courants de pic anodique et cathodique en fonction des volumes ajoutés avec tout d'abord une partie linéaire qui s'incurve pour se stabiliser à une valeur de $-55 \mu\text{A}$ et $50 \mu\text{A}$ pour les courants de pic cathodique et anodique pour un volume supérieur à $350 \mu\text{L}$ de GNP_{PSCD}/AQ. Cette valeur correspond à un recouvrement surfacique de $2\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$.

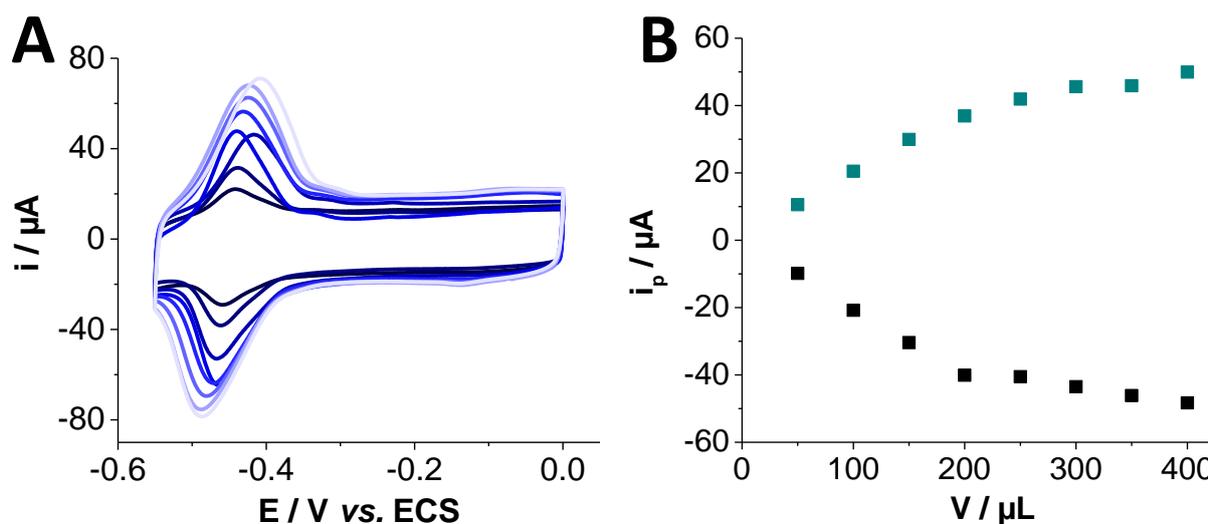


Figure 17 : CV des GNP_{PSCD}/AQS immobilisées sur électrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNTs (A) et variation des courants de pics cathodique et anodique en fonction du volume de GNP_{PSCD}/AQS déposé (B). Conditions : 5 mL tampon Britton Robinson (pH = 6), $\nu = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ar, électrode de carbone électrode couverte de 20 L de MWCNTs ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

VI. Conclusion

Ce chapitre a été consacré à la conception de nouvelles glyconanoparticules réalisées à partir de mélanges de copolymère de polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine et de polystyrène-*bloc*-maltoheptaose dans des proportions différentes et à la caractérisation morphologique par différentes méthodes physico-chimiques telles que la DLS, le NTA, le MEB et le MET. Les glyconanoparticules obtenues sont sphériques et de taille nanométrique avec des diamètres moyens principaux compris entre 20 et 40 nm et des distributions s'étendant jusqu'à 90 nm. Ces glyconanoparticules ont ensuite été fonctionnalisées par l'antraquinone sulfonate en utilisant les interactions d'inclusion entre les cyclodextrines et les groupements antraquinone en milieu aqueux. Les propriétés électrochimiques des glyconanoparticules ainsi conçues ont été étudiées et comparées entre elles. Nous avons pu montrer que le signal électrochimique de AQS était présent pour chacune des glyconanoparticules, avec un signal beaucoup plus élevé pour les glyconanoparticules recouvertes de cyclodextrines, attestant de l'interaction d'inclusion entre les cyclodextrines des glyconanoparticules et l'antraquinone. Cette méthode mise au point pour fonctionnaliser les glyconanoparticules est versatile et pourrait ainsi être transposée pour fonctionnaliser les glyconanoparticules avec des molécules biologiques par exemple. L'immobilisation de GNP_{PSCD}/AQS sur les électrodes recouvertes de nanotubes de carbone a permis de montrer la conservation des propriétés électrochimiques en solution et 40 % du signal électrochimique après un mois de stockage à température ambiante. Bien que cette étude semble répétitive, elle est nécessaire pour caractériser au mieux les glyconanoparticules pour les utiliser ensuite dans la réalisation de biocathodes afin d'orienter la bilirubine oxydase, ce qui fait l'objet du dernier chapitre de cette thèse.

Références

1. Otsuka, I. *et al.* Self-Assembly of Maltoheptaose- *block* -Polystyrene into Micellar Nanoparticles and Encapsulation of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **29**, 15224–15230 (2013).
2. Gross, A. J. *et al.* Redox-Active Carbohydrate-Coated Nanoparticles: Self-Assembly of a Cyclodextrin–Polystyrene Glycopolymer with Tetrazine–Naphthalimide. *Langmuir* **32**, 11939–11945 (2016).
3. Gross, A. J. *et al.* Redox-Active Glyconanoparticles as Electron Shuttles for Mediated Electron Transfer with Bilirubin Oxidase in Solution. *Journal of the American Chemical Society* **139**, 16076–16079 (2017).
4. Hammond, J. L. *et al.* Solubilized Enzymatic Fuel Cell (SEFC) for Quasi-Continuous Operation Exploiting Carbohydrate Block Copolymer Glyconanoparticle Mediators. *ACS Energy Letters* **4**, 142–148 (2019).
5. Giacomelli, C. *et al.* Aqueous Self-Assembly of Polystyrene Chains End-Functionalized with β -Cyclodextrin. *Biomacromolecules* **10**, 449–453 (2009).

6. Haider, J. M. *et al.* Metallocyclodextrins as Building Blocks in Noncovalent Assemblies of Photoactive Units for the Study of Photoinduced Intercomponent Processes. *Inorganic Chemistry* **40**, 3912–3921 (2001).
7. Djedaïni, F. & Perly, B. Anthraquinone sulphonate as a general-purpose shift reagent for the NMR analysis of cyclodextrins. *Magn. Reson. Chem.* **28**, 372–374 (1990).
8. Fritea, L. *et al.* First Occurrence of Tetrazines in Aqueous Solution: Electrochemistry and Fluorescence. *ChemPhysChem* **16**, 3695–3699 (2015).
9. Jacq, J. Schema carre. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **29**, 149–180 (1971).
10. Batchelor-McAuley, C., Li, Q., Dapin, S. M. & Compton, R. G. Voltammetric Characterization of DNA Intercalators across the Full pH Range: Anthraquinone-2,6-disulfonate and Anthraquinone-2-sulfonate. *J. Phys. Chem. B* **114**, 4094–4100 (2010).
11. Honarasa, F., Yousefinejad, S., Nasr, S. & Nekoeinia, M. Structure–electrochemistry relationship in non-aqueous solutions: Predicting the reduction potential of anthraquinones derivatives in some organic solvents. *Journal of Molecular Liquids* **212**, 52–57 (2015).

Chapitre IV

Composés rédox à base de viologène : électrochimie en solution et par immobilisation sur support conducteur. Vers la conception de glyconanoparticules à base de viologène

Sommaire

I. Introduction.....	122
II. Adamantane-viologène (Ad-V ²⁺)	123
II.1. Propriétés électrochimiques de Ad-V ²⁺ en solution organique (DMF : MeCN 1:1)	123
II.2. Propriétés électrochimiques de Ad-V ²⁺ en solution aqueuse	126
II.3. Assemblage de glyconanoparticules à base de PSCD en présence de Ad-V ²⁺	128
III. Pyrène-viologène (PV ²⁺)	134
III.1. Electrochimie de PV ²⁺ en solution organique	134
III.2. Electrochimie de PV ²⁺ immobilisé sur électrodes de carbone vitreux et recouvertes de nanotubes de carbone	136
III.3. Fonctionnalisation des glyconanoparticules avec le pyrène viologène.....	143
IV. Conclusion	145
Références	146

I. Introduction

Les sels de 4,4'-bipyridinium, ou plus communément appelée viologènes, sont des molécules électrochromes, qui changent de couleur en fonction de leurs degrés d'oxydation. Connue également pour son utilisation dans l'élaboration de machines moléculaires artificielles¹⁻³, la fonction viologène est également très utilisée en bioélectrochimie. En effet, de nombreux exemples dans la littérature montrent l'efficacité de cette fonction pour connecter électriquement des enzymes à l'électrode. A titre d'exemple, le viologène a été utilisé comme médiateur rédox de la nitrate réductase⁴⁻⁹ ou de la nitrite réductase¹⁰ pour la conception de capteurs à nitrates ou de nitrites, ces enzymes catalysant respectivement la réduction des ions nitrate en ion nitrite et des ions nitrite en ion ammonium. Il a été également démontré que la fonction viologène peut servir de relais d'électrons pour la nitrogénase, enzyme qui catalyse par exemple la réduction du diazote en ammoniacque¹¹⁻¹³ en solution ou immobilisée sur électrode. Enfin, un dernier exemple présenté ici, est l'utilisation des viologènes et de ses dérivés pour médier le transfert d'électrons des hydrogénases qui sont des enzymes de la famille des oxydoréductases, catalysant la réaction d'oxydation du dihydrogène en protons^{14,15}. De plus, un intérêt supplémentaire de l'utilisation des viologènes est la formation d'une couche protectrice pour l'hydrogénase vis-à-vis d'une exposition à de hauts potentiels¹⁶, souvent responsable de sa désactivation.

L'objectif principal de ce chapitre est la conception de glyconanoparticules à base de copolymère à bloc de polystyrène-*bloc-β*-cyclodextrine (GNP_{PSCD}) et de viologène pour les utiliser ultérieurement en bioélectrochimie. Les composés dérivés du viologène utilisés dans ce chapitre sont représentés sur le Schéma 1. Le groupement viologène est substitué par une chaîne alkyle comportant à son extrémité un groupement pyrène ou adamantane, ces deux fonctions étant connues pour jouer le rôle d'invitées dans les complexes d'inclusion avec les cyclodextrines, avec des constantes d'association élevées respectivement de $2,3 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ¹⁷ et de $10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ¹⁸. La synthèse et la caractérisation de chacune de ces molécules sont décrites dans le chapitre expérimental. Ce chapitre est scindé en deux parties principales, avec dans chacune des parties, la présentation successive des propriétés électrochimiques en solution organique et en milieu aqueux de chacun des composés, noté par la suite PV²⁺ (pour le N-pyrényl-1-butyl-N'-méthyl-4,4'-bipyridinium-tétrafluoroborate) et Ad-V²⁺ (pour le N-Adamantaneéthyl-N'-méthyl-4,4'-bipyridinium-iodure) respectivement. Leur dépôt sur électrode est également présenté, les méthodes étant différentes selon le groupement fonctionnel associé à l'entité viologène. Ensuite, dans chaque partie, la capacité qu'ont ces deux composés à fonctionnaliser les glyconanoparticules est évaluée. Les méthodes d'assemblage, les caractérisations de la morphologie et de la taille des glyconanoparticules ainsi obtenues en microscopie et par diffusion dynamique de la lumière sont présentées. Enfin les caractérisations électrochimiques sont étudiées.

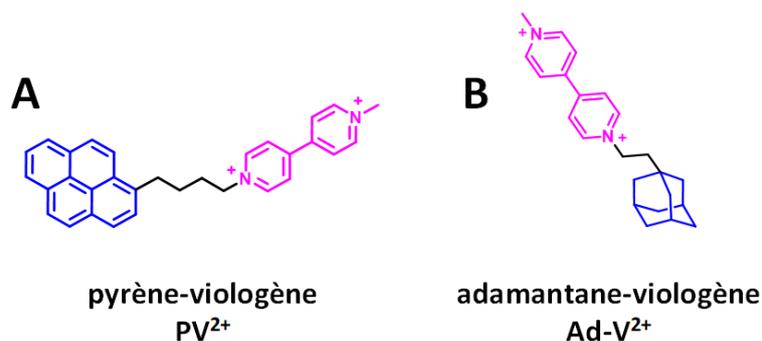


Schéma 1 : Structure chimique des dérivés viologène utilisés avec (A) le pyrène-viologène (noté PV²⁺) et (B) l'adamantane-viologène (noté Ad-V²⁺).

II. Adamantane-viologène (Ad-V²⁺)

II.1. Propriétés électrochimiques de Ad-V²⁺ en solution organique (DMF : MeCN 1:1)

Les propriétés électrochimiques de Ad-V²⁺ ont tout d'abord été étudiées en solution organique en boîte à gants ($[O_2] \leq 20$ ppm) pour éviter toute interférence avec le dioxygène. Du fait de la faible solubilité de ce composé dans CH₃CN, solvant utilisé habituellement en électrochimie, le mélange DMF : MeCN (1 :1) a été utilisé puisqu'il permet une solubilisation totale du composé. Une courbe de voltampérométrie cyclique a été réalisée en balayant la fenêtre de potentiel dans la zone des potentiels négatifs de 0,0 V à -1,5 V vs. Ag/AgNO₃ (10^{-2} mol.L⁻¹).

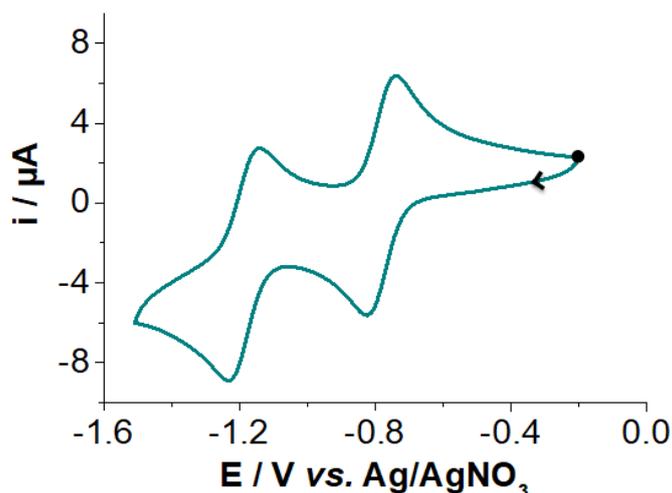


Figure 1 : CV de Ad-V²⁺ en solution organique. Conditions : électrode de carbone vitreux, (DMF:MeCN 1:1), TBAP 0,1 mol.L⁻¹, [Ad-V²⁺] = $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, $[O_2] < 20$ ppm en boîte à gants), $\nu = 100$ mV.s⁻¹.

Comme l'atteste le voltampérogramme sur la Figure 1, en balayant jusqu'à un potentiel de -1,500 V, deux pics cathodiques sont observés à $E_{pc} = -0,824$ V et $E_{pc} = -1,236$ V, associé

au balayage retour à des pics anodiques détectés à $E_{pa} = -0,733$ V et $-1,136$ V respectivement. Ces systèmes électrochimiques, conformément à la littérature, peuvent être attribués aux couples $V^{2+}/V^{\bullet+}$ et $V^{\bullet+}/V^0$. Les différentes caractéristiques des 2 couples rédox sont rassemblées dans le Tableau 1, avec notamment le report des valeurs de $E_{1/2}$ et de ΔE_p proches de 90 mV.

Tableau 1 : Valeurs de potentiel obtenues pour les deux systèmes rédox du composé viologène en milieu organique. DMF : MeCN (1 : 1).

	1 ^{er} système	2 ^{ème} système
E_{pc} / V vs. Ag/AgNO ₃	-0,824	-1,236
E_{pa} / V vs. Ag/AgNO ₃	-0,733	-1,136
$E_{1/2}$ / V vs. Ag/AgNO ₃	-0,778	-1,186
ΔE_p / V	0,091	0,101

Afin de mettre en évidence les différents degrés d'oxydation du viologène, des électrolyses exhaustives aux potentiels de $-0,850$ V et $-1,300$ V ont été conduites successivement sur plaque de carbone. Au cours de la première réduction, la solution initiale incolore (Figure 2, a) devient progressivement bleue (Figure 2, b) avec une longueur d'onde $\lambda_{max} = 606$ nm, couleur caractéristique de la formation du radical cation $Ad-V^{\bullet+}$, comme déjà montré dans la littérature¹⁹. 0,98 électron par mole de V^{2+} sont consommés traduisant la réduction monoélectronique du composé. Lorsque l'électrolyse est poursuivie à $-1,300$ V, la solution de couleur bleue devient progressivement jaune-marron après passage de 1 électron par mole de composé. Ceci se traduit par la disparition de la large bande à $\lambda = 606$ nm au profit d'une bande intense détectée à $\lambda = 400$ nm (Figure 2, c)¹⁹.

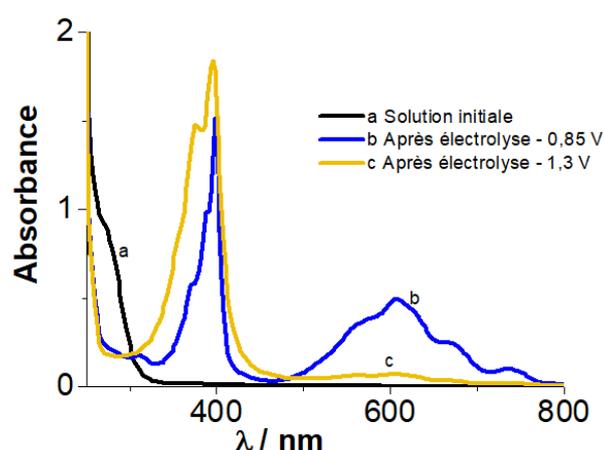


Figure 2: Spectre UV-visible de la solution de $Ad-V^{2+}$ avant électrolyse (noir, courbe a), après électrolyse exhaustive à $-0,85$ V (courbe b, bleu) et après électrolyse exhaustive à $-1,3$ V (courbe c, jaune). Conditions : $[Ad-V^{2+}] = 0,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, (DMF:MeCN 1:1), 0,1 mol.L⁻¹ TBAP, trajet optique 1 mm.

La voltampérométrie cyclique réalisée, Figure 3, entre $-0,800$ V et $-0,100$ V après la première électrolyse puis entre $-1,300$ V et $-0,100$ V après la seconde électrolyse, permet de détecter les systèmes électrochimiques centrés à $E_{1/2} = -0,778$ V et $E_{1/2} = -1,186$ V avec des intensités respectives de $5 \mu\text{A}$ et $4,3 \mu\text{A}$ pour i_{pa} et de $-4,8 \mu\text{A}$ et $-4,7 \mu\text{A}$ pour i_{pc} , proches des valeurs de courant mesurées avant l'électrolyse. De par la conservation des valeurs de courant de pics avant et après électrolyse, nous pouvons en déduire que les espèces électrogénérées sont stables à l'échelle de temps de l'électrolyse, et que les réactions chimiques couplées au transfert électronique, comme des réactions de dimérisation n'ont pas lieu ou sont minoritaires par rapport à la réaction électrochimique. Pour écarter la présence de dimérisation, il aurait été intéressant de vérifier l'absence de bande à des longueurs d'onde supérieures à 800 nm après électrolyse. La présence de signal en RPE aurait également permis de confirmer l'absence de dimérisation pendant les processus de réduction.

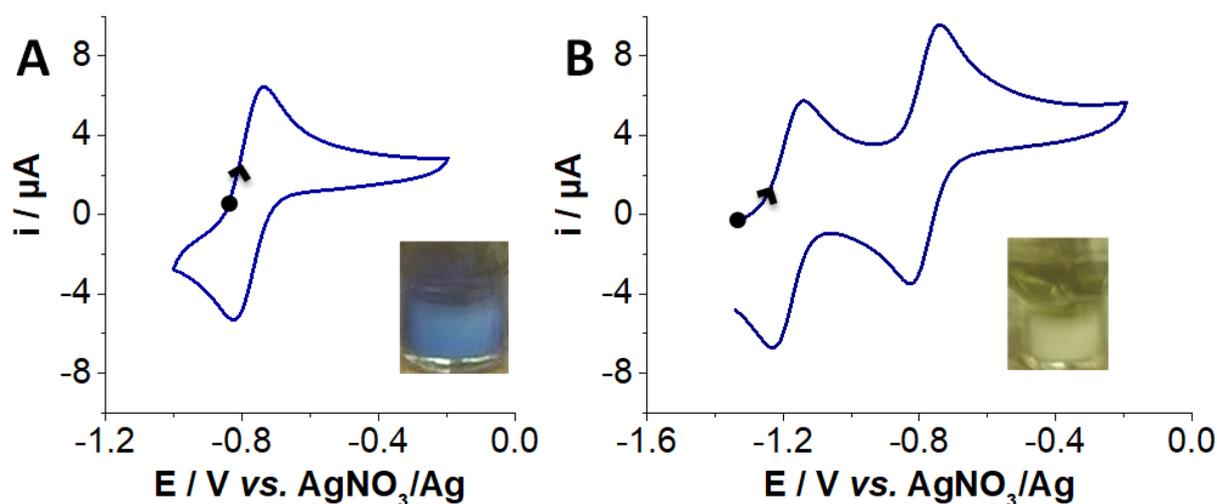


Figure 3 : CV d'Ad-V en solution organique après électrolyses successives exhaustive à $-0,85$ V (A) et $-1,3$ V (B). **Conditions :** électrodes de carbone vitreux, $[\text{Ad-V}^{2+}] = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, (DMF : MeCN 1:1), $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBAP, $[\text{O}_2] < 20 \text{ ppm}$, $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Les expériences réalisées (voltampérométries cycliques et électrolyses exhaustives) ont permis de mettre en évidence les différents degrés d'oxydation du viologène (V^{2+} , $\text{V}^{\bullet+}$ et V^0) représentés sur le Schéma 2.

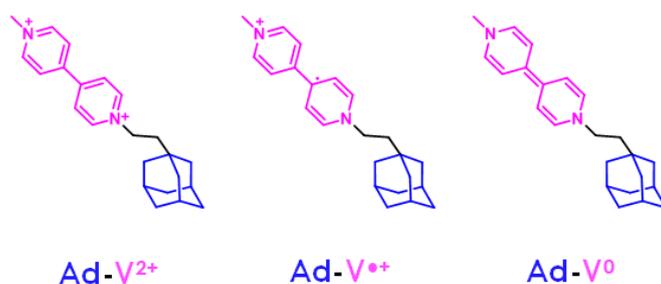


Schéma 2 : Structure chimique de l'adamantane-viologène et représentation des trois états d'oxydation différents mis en jeu.

II.2. Propriétés électrochimiques de Ad-V^{2+} en solution aqueuse

Afin de mieux appréhender les propriétés électrochimiques de GNPs fonctionnalisées par Ad-V^{2+} , le comportement électrochimique de Ad-V^{2+} a été étudié en solution aqueuse (Figure 4) en réalisant des courbes de voltampérométrie cyclique dans $\text{H}_2\text{O} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Dans cette partie, l'électrode de référence utilisée est une électrode au calomel saturé (ECS).

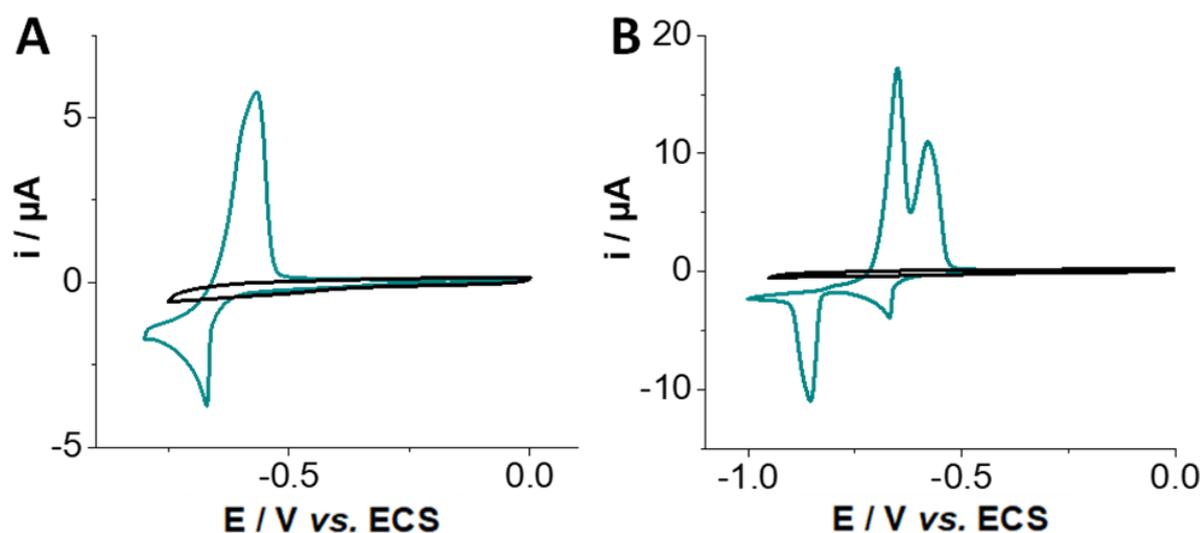


Figure 4 : CV de l' Ad-V^{2+} en solution aqueuse. Conditions : électrodes de carbone vitreux, $0,294 \text{ mg.mL}^{-1}$ de Ad-V^{2+} dans $\text{H}_2\text{O} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$, $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$, Ar.

Comme on peut l'observer sur les deux voltampérogrammes (Figures 4A et B), les signaux pour chacun des systèmes sont mal définis. Un pic cathodique pouvant correspondre à la réduction de V^{2+} en $\text{V}^{\bullet+}$ est détecté à $E_{\text{pc}} = -0,667 \text{ V}$. Le pic anodique détecté lors du balayage retour à $E_{\text{pa}} = -0,577 \text{ V}$, est très intense et pourrait être la conséquence de la dissolution d'espèces insolubles déposées sur l'électrode, générées par exemple par couplage de 2 radicaux $\text{V}^{\bullet+11}$. Le même phénomène est observé lorsque la voltampérométrie cyclique est réalisée jusqu'à un potentiel de $-1,00\text{V}$ avec la détection de 2 pics de réduction mal

définis associés au balayage retour à 2 pics d'oxydation intenses déformés pouvant être aussi attribués à une désorption d'espèces déposées à la surface de l'électrode. Afin de mettre en évidence ces phénomènes d'adsorption des viologènes réduits et de désorption à la surface des électrodes de carbone, 20 cycles ont été réalisés (Figure 5A) entre 0,000 V et -1,000 V dans une solution de tampon Britton Robinson à pH = 6 à une vitesse de balayage de 10 mV.s⁻¹. Au cours des différents cycles réalisés, une augmentation des courants de pic cathodique et anodique est observée attestant du dépôt d'espèces sur l'électrode.

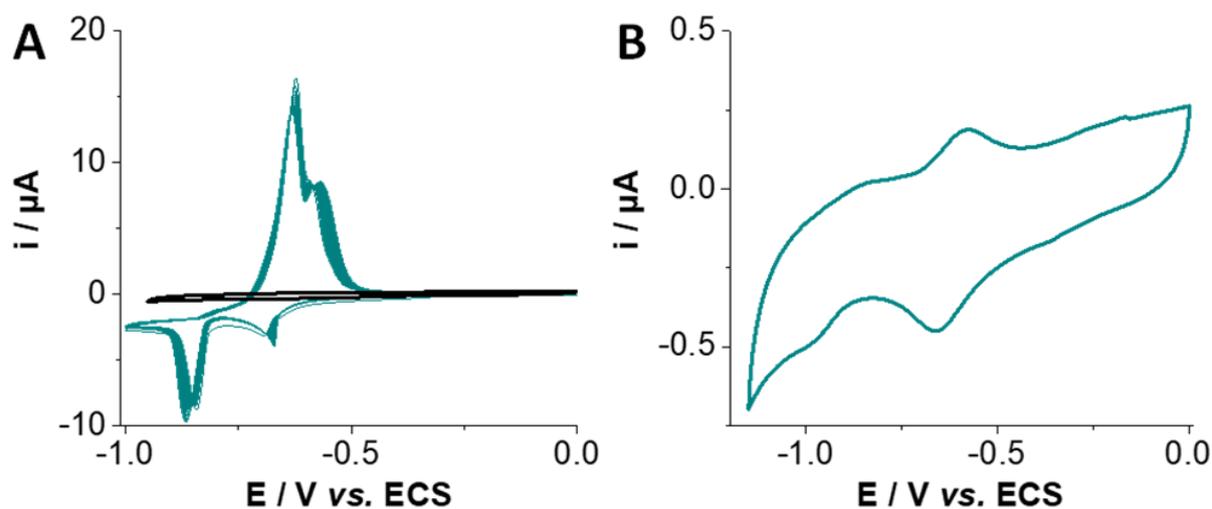


Figure 5 : (A) CVs de Ad-V²⁺ dans des conditions saturantes réalisées dans une solution de tampon Britton Robinson pH = 6 avec des électrodes de carbone vitreux, Ar, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, $[\text{Ad-V}^{2+}] = 0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ et (B) CV après transfert des électrodes de carbone vitreux modifiées dans la solution tampon sans Ad-V²⁺.

L'électrode ainsi modifiée est ensuite transférée dans une solution tampon dépourvue d'adamantane-viologène et analysée par voltampérométrie cyclique en réduction, Figure 5B. Par comparaison aux signaux obtenus en solution, le premier signal électrochimique détecté à $E_{1/2} = -0,622 \text{ V}$ est attribué au couple Ad-V²⁺/Ad-V^{•+}. Le deuxième système rédox, détecté à un potentiel cathodique de -0.8 V, est beaucoup moins bien défini, empêchant le calcul de $E_{1/2}$ peut être attribué au couple Ad-V^{•+}/Ad-V⁰. La concentration surfacique de Ad-V²⁺ déposé, Γ a été calculée par intégration du premier pic cathodique associé au système en considérant qu'un électron est échangé. Ainsi, en réalisant simplement 20 cycles de voltampérométrie cyclique, une adsorption du composé est possible avec un recouvrement surfacique de $0,21 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$, similaire à la valeur reportée de $0,16 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ pour une monocouche adsorbée pour des composés à base de viologène possédant une chaîne alkyle²⁰.

II.3. Assemblage de glyconanoparticules à base de PSCD en présence de Ad-V²⁺

De façon identique à celle déjà réalisée dans le premier chapitre, les glyconanoparticules à base de polystyrène et de cyclodextrine ont été auto-assemblées en présence de Ad-V²⁺ avec un rapport molaire Ad-V²⁺ : PSCD de 3 : 1. La description de l'auto-assemblage des glyconanoparticules est rappelée dans le chapitre expérimental. De par la solubilité du composé rédox dans l'eau, une dialyse pendant 72 h, a été réalisée afin de supprimer Ad-V²⁺ pouvant être resté libre en solution et ne conserver ainsi que le signal électrochimique des glyconanoparticules obtenues, notées par la suite GNP_{PSCD}/Ad-V²⁺.

II.3.1. Caractérisation morphologique des GNP_{PSCD}/Ad-V²⁺ obtenues

Les analyses par DLS des GNP_{PSCD} ainsi fonctionnalisées, Figure 6, attestent de la présence de trois distributions avec des diamètres moyens de 11 ± 3 nm, 425 ± 120 nm et 2487 ± 423 nm (diamètres moyens réalisés sur 5 mesures). La première distribution pourrait être attribuée à des chaînes uniques de polymère n'ayant pas été impliquées dans le processus de micellisation. La deuxième distribution, quant à elle, a un diamètre bien supérieur au diamètre des glyconanoparticules obtenus dans le chapitre II, pouvant attester de la présence de Ad-V²⁺ au cœur des glyconanoparticules. Il a d'ailleurs déjà été montré dans la littérature que la taille des GNPs est impactée par la concentration et par la nature de la molécule insérée lors de l'élaboration des nanoparticules par précipitation ²¹. Enfin, la troisième distribution correspond à des agrégats présents en solution, puisque les mesures de DLS ont été réalisées après homogénéisation des solutions de glyconanoparticules obtenues, permettant de remettre en solution les agrégats qui avaient précipité.

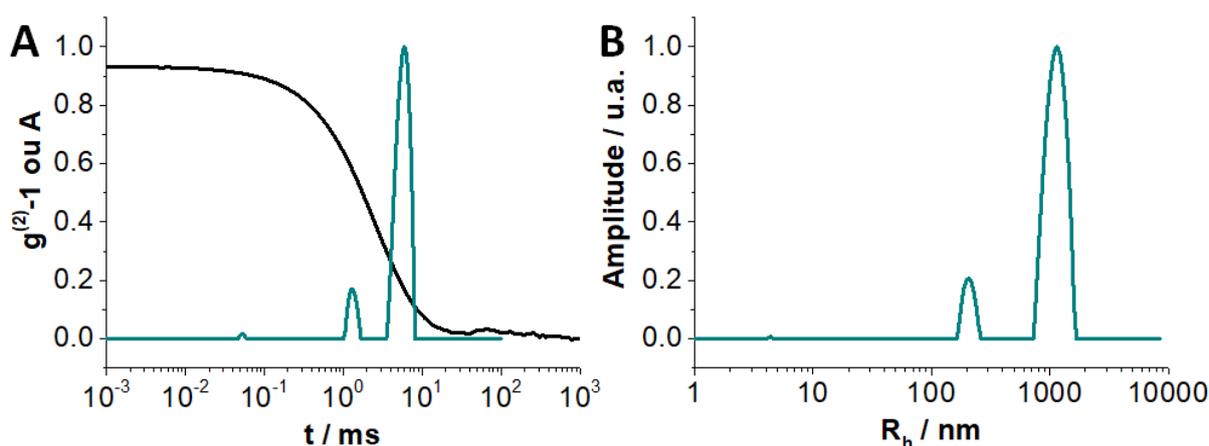


Figure 6 : (A) Courbe d'autocorrélation ($g^{(2)} - 1$, courbe noire) obtenue par DLS mesurée à 90° pendant 120 secondes et distribution du temps de relaxation (courbe verte) de suspensions aqueuses de GNP_{PSCD}/Ad-V²⁺₃ préparée par pré-fonctionnalisation et mesurée après dialyse. (B) Distribution en taille associée.

En complément de la DLS, les images de microscopie à balayage électronique attestent de la forme sphérique des glyconanoparticules ainsi obtenues (Figure 7A et B). En comptant les particules selon leur taille sur plusieurs clichés, comme expliqué dans le chapitre II, la courbe de distribution de la population en % en fonction du diamètre des particules a été obtenue (Figure 7C). On peut remarquer la polydispersité de l'échantillon puisque seulement 10 % des GNP_{PSCD} ont une taille de 45 nm et que la distribution en taille s'étale jusqu'à des valeurs de 280 nm. Nous pouvons constater que ces valeurs sont assez éloignées des valeurs obtenues par DLS. Ceci n'est pas étonnant puisque le comptage des particules a été réalisé sur un petit nombre de particules du fait de l'agglutination des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ et très peu d'images étaient exploitables. Ces 2 paramètres pourraient expliquer la différence entre les résultats obtenus.

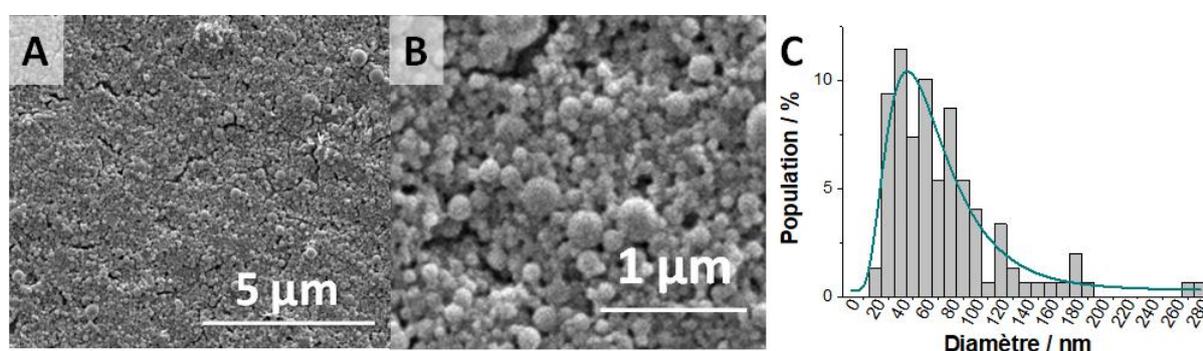


Figure 7 : Clichés obtenus par microscopie électronique à balayage (A) et (B) et courbe de distribution associée du diamètre des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}_3$ avant dialyse (C) (diamètre mesuré sur 149 GNPs).

II.3.2. Etude électrochimique en solution aqueuse des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$

Le comportement électrochimique des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ a été étudié par voltampérométrie cyclique, avant (Figure 8A) et après dialyse (Figure 8B).

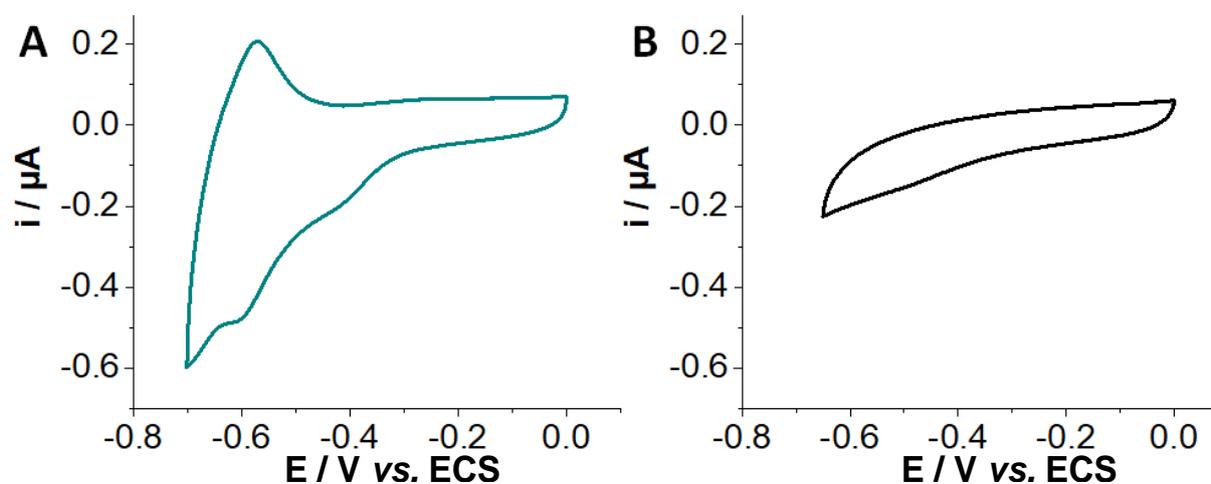


Figure 8 : CV de la solution de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ avant (A) et après dialyse (B). Conditions : électrodes de carbone vitreux, solution de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ dans H_2O , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, Ar, dialyse effectuée avec une membrane avec seuil de coupure de 3,5 – 5 kDa pendant 72 h à 300 rpm.

Le signal rédox de la réduction du viologène visible avant dialyse (Figure 8A) détecté à $E_{1/2} = -0,584$ V, potentiel légèrement supérieur à celui détecté pour Ad-V²⁺ en solution aqueuse, n'est plus détectable sur la courbe de voltampérométrie cyclique (Figure 8B) après avoir réalisé la dialyse pendant 72 h. Ces résultats montrent donc que l'étape de nanoprécipitation associée à la dialyse n'ont pas permis d'obtenir des GNPs électroactives. Le premier système visible sur la Figure 8A est dû à la réduction de O₂ dissous. A ce stade, pour expliquer l'absence de signaux après dialyse, plusieurs hypothèses pourraient être émises. La gêne stérique engendrée par le viologène, qui est séparée de l'adamantane par seulement quelques angströms pourrait expliquer l'échec de l'inclusion de l'adamantane dans les cyclodextrines des glyconanoparticules, et en effectuant la dialyse, l'adamantane-viologène, qui ne serait pas inséré dans les cavités des cyclodextrine serait ainsi éliminé. De plus, le composé Ad-V²⁺ a été synthétisé avec des contre-ions qui peuvent eux-mêmes s'insérer dans les cavités des cyclodextrines, même si la constante d'interaction entre eux et la cyclodextrine est beaucoup plus faible ($K = 18 \text{ L.mol}^{-1}$)²². On pourrait envisager que l'interaction entre l'adamantane et les cyclodextrines ait bien eu lieu mais que la dialyse ait « désassocié » l'entité adamantane-cyclodextrine, cette hypothèse semble être à privilégier, car dans la littérature, il existe des exemples mettant en évidence l'interaction adamantane-viologène-cyclodextrine même avec des chaînes relativement courtes séparant le viologène de l'adamantane²³.

II.3-3. Destruction de la morphologie sphérique des glyconanoparticules et caractérisation par DLS, MEB et par voltampérométrie cyclique

Dans la conception des GNP_{PSCD}/Ad-V²⁺, le composé rédox a été ajouté pendant l'auto-assemblage des GNP_{PSCD}. De par le caractère hydrophobe du groupement adamantane, il pourrait être aussi encapsulé dans les cœurs des micelles formées, comme déjà décrit par exemple pour la curcumine avec des glyconanoparticules à base de PSMH²⁴. Dans l'exemple issu de la littérature, la quantification de cette espèce a pu être déterminée par spectroscopie UV-visible à une longueur d'onde fixe de $\lambda = 426$ nm, longueur d'onde où les GNPs ne présentent aucune signature spectroscopique. Dans notre cas, les GNPs fonctionnalisées GNP_{PSCD}/Ad-V²⁺ ne possèdent pas de signature caractéristique dans le visible dans leur état oxydé, et pour détecter la présence de l'espèce rédox Ad-V²⁺ à l'intérieur des particules, nous avons voulu « détruire » les GNP_{PSCD} afin de libérer Ad-V²⁺ piégé dans les micelles formées. Pour cela, 9 mL de THF ont été ajoutés lentement dans 4 mL de solution de GNP_{PSCD}/Ad-V²⁺. Au fur et à mesure de l'ajout de THF dans la solution de GNP_{PSCD}/Ad-V²⁺, l'aspect laiteux des solutions disparaît au profit de l'apparition d'une solution limpide, attestant d'un changement de forme des GNP/Ad-V²⁺. Les solutions limpides ainsi obtenues sont agitées à 1000 rpm pendant 2 h. Afin de vérifier la disparition de la forme sphérique des GNP_{PSCD}, des mesures en DLS (Figure 9) des clichés en MEB (Figure 10) et ont été réalisés. L'intensité

diffusée après soustraction de l'intensité du solvant est très faible ($I = 2 \pm 2$ kHz), par comparaison aux $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ avant destruction ($I = 45 \pm 17$ kHz). Cette faible valeur d'intensité se rapproche de celle obtenue pour des solvants purs. Par ailleurs, la fonction d'autocorrélation obtenue (Figure 9) n'a pas la forme caractéristique de celle attendue pour une suspension d'objets nanométriques. Lors de la présence de glyconanoparticules en solution on note, comme l'atteste la Figure 6, la présence d'un plateau suivi d'une courbe décroissante. Ces observations concordent donc bien avec le fait que la solution prélevée pour réaliser les mesures ne contient plus de glyconanoparticules sphériques.

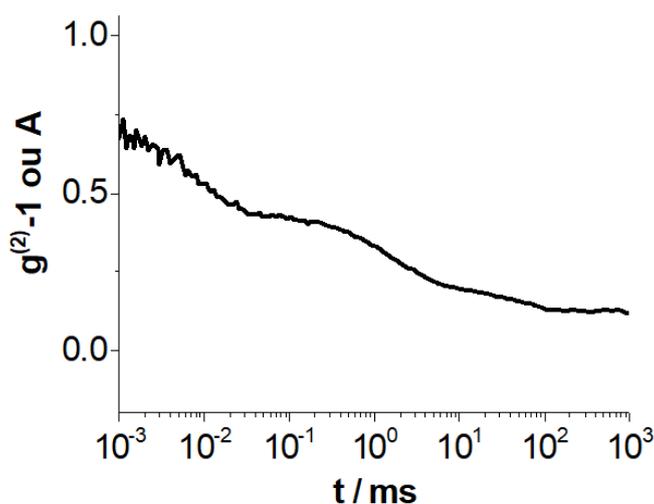


Figure 9: Courbe d'autocorrélation ($g^{(2)} - 1$, noir) obtenue par DLS mesurée à 90° pendant 120 secondes de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ détruites dans le THF. 5 mesures effectuées.

Des clichés réalisés en microscopie électronique à balayage ont été réalisés après homogénéisation de l'ensemble de la solution, dépôt d'une goutte et séchage sur plaque de carbone. Sur ces clichés, en fonction de l'endroit analysé sur la plaque de carbone (Figure 10A à C), de nombreuses formes indéfinissables sont observables. Sur la Figure 10D, les structures mieux définies sont visibles mais leur présence est assez rare sur les différents clichés réalisés. De ces images, nous pouvons ainsi déduire qu'aucune nanoparticule sphérique n'est visible, attestant bien de la destruction de la forme des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ et venant ainsi corroborer les résultats obtenus en DLS.

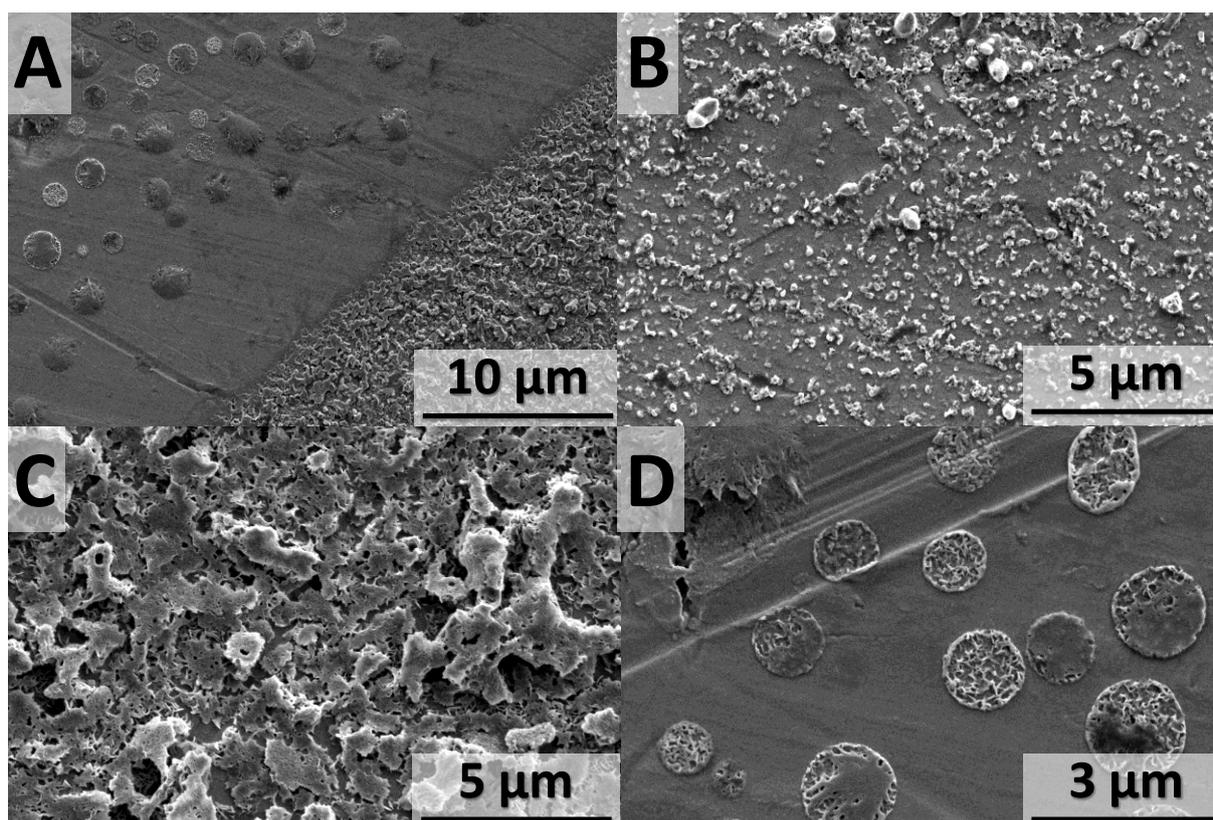


Figure 10 : Clichés obtenus à différentes échelles en SEM après destruction des GNP_{PSCD} en solution organique et séchage sur carbone.

Afin d'étudier le comportement électrochimique de la solution résultante dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites pour l'étude électrochimique de Ad-V^{2+} en milieu organique, les solvants (THF et H_2O) ont tout d'abord été éliminés par évaporation sous pression réduite. 3 mL d'un mélange $\text{DMF} : \text{MeCN}$ 1 : 1 sont ensuite ajoutés pour dissoudre conjointement les chaînes de polymères et l'espèce rédox Ad-V^{2+} . Le mélange de solvants $\text{DMF} : \text{MeCN}$ dans les proportions 1 : 1 a été choisi puisqu'il a été utilisé pour réaliser les études électrochimiques de Ad-V^{2+} en solution organique. Sur la Figure 11, plusieurs CV sont reportées (courbe a à d). En plus des CV caractéristiques du solvant utilisé (Figure 11, courbe a) et des glyconanoparticules PSCD redissoutes de la même façon que décrit précédemment (Figure 11, courbe d), sont ajoutées la courbe de voltampérométrie cyclique de la solution de nanoparticules $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ détruites et solubilisées dans la solution organique (Figure 11, courbe b) et celle de la solution d' Ad-V^{2+} à une concentration de $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 11, courbe c). Les voltampérogrammes (Figure 11 a et d) ne présentent aucune signature électrochimique dans la région des potentiels choisis, tandis que le voltampérogramme (Figure 11 b) est caractérisé par une vague de réduction commençant à un potentiel de $-0,688 \text{ V}$. Le signal de Ad-V^{2+} est, quant à lui détecté à un potentiel de $E_{\text{pc}} = -0,871 \text{ V}$ associé au balayage retour à un pic d'oxydation bien défini à $E_{\text{pa}} = -0,784 \text{ V}$. Sachant que le polymère PSCD redissous ne présente aucune signature électrochimique dans

cette gamme de potentiels (Figure 11, courbe d), nous pouvons en déduire que le signal électrochimique est dû à la présence de Ad-V^{2+} . La différence de la forme du signal électrochimique détecté au niveau de la diffusion est certainement due au fait que Ad-V^{2+} est lié aux chaînes de polymères par des interactions π -stacking par exemple, le polystyrène et les viologènes présentant tous deux des liaisons π .

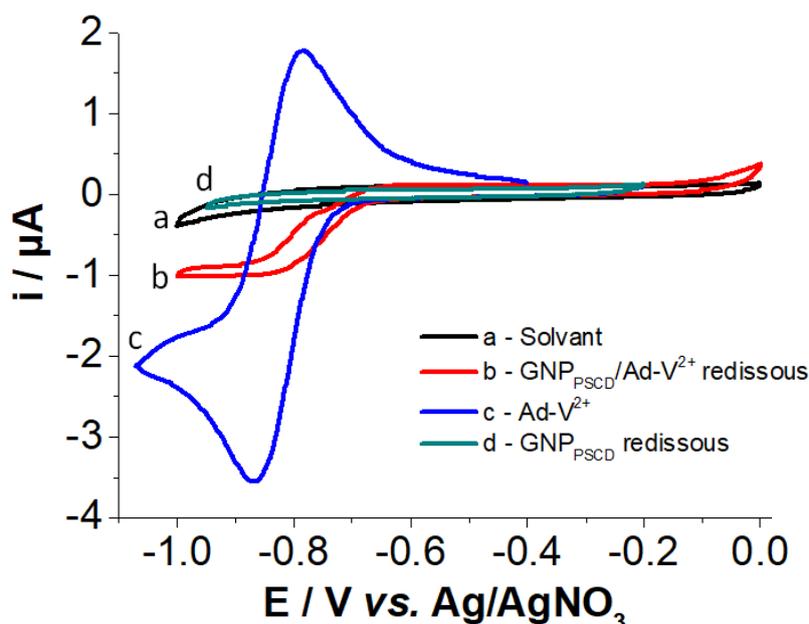


Figure 11 : CV du solvant (a) , de la solution de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ détruites et rediluées dans 3 mL de solvant (courbe b), d'une solution d' Ad-V^{2+} en solution organique (courbe c) et de GNP_{PSCD} détruites (courbe d). **Conditions :** électrodes de carbone vitreux, DMF : MeCN 1:1, TBAP 0,1 mol.L⁻¹, $[\text{Ad-V}^{2+}] = 0,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, $\nu = 10$ mV.s⁻¹, Ar.

En sachant que les courants mesurés sont proportionnels aux concentrations des espèces en solution, une estimation de la concentration d' Ad-V^{2+} contenue dans les GNP_{PSCD} peut être déterminée par comparaison des valeurs de courant de réduction mesurés à $-1,1$ V de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ détruites ($-0,90$ μA) et de Ad-V^{2+} ($-2,1$ μA) (respectivement Figure 11 b et c). En faisant l'approximation que les $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ détruites et Ad-V^{2+} ont les mêmes coefficients de diffusion, la concentration de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ est estimée à $0,21 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, soit $0,64$ μmol (volume de 3 mL). La quantité initiale d' Ad-V^{2+} pendant la formation des GNPs étant de $15,8$ μmol , la quantité se trouvant dans les micelles de GNP_{PSCD} représente 4 % de la quantité initiale d' Ad-V^{2+} . Il est à noter que la quantité calculée est certainement sous-estimée, du fait que le coefficient de diffusion des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$ détruites est beaucoup plus faible que Ad-V^{2+} , du fait de son association avec les brins de polymère, ayant pour conséquence l'augmentation du rayon hydrodynamique par rapport à Ad-V^{2+} .

III. Pyrène-viologène (PV²⁺)

La partie présentée ici est consacrée à l'auto-assemblage de GNP_{PSCD} en présence du composé pyrène viologène présenté en début de ce chapitre sur le Schéma 1, le groupement pyrène ayant déjà montré son efficacité à être inséré dans les cavités des cyclodextrines des GNP_{PSCD}²⁵. La synthèse, par comparaison à Ad-V²⁺, a été réalisée avec succès avec BF₄⁻, comme contre-ion et avec une chaîne carbonée séparant le viologène et le pyrène légèrement plus longue, pouvant ainsi favoriser l'interaction entre le pyrène et la cyclodextrine. De plus, ce composé présente une très faible solubilité dans l'eau, ce qui permettrait de s'affranchir de l'étape de dialyse.

III.1. Electrochimie de PV²⁺ en solution organique

Comme pour le composé Ad-V²⁺, les propriétés électrochimiques de PV²⁺ ont été étudiées en solution organique par voltampérométrie cyclique. La caractérisation électrochimique de PV²⁺ (2.10⁻³ mol.L⁻¹) a été réalisée en milieu organique (MeCN : DMF 80/20) par voltampérométrie cyclique et par voltampérométrie sur électrode de carbone vitreux à disque tournant (EDT). Lors d'un balayage vers les potentiels négatifs, Figure 12, les courbes de voltampérométrie cyclique présentent 2 systèmes quasi-réversibles détectés à des potentiels de demi-pic respectifs de E_{1/2} = - 0,73 V et E_{1/2} = - 1,24 V vs. Ag/AgNO₃ 10⁻² mol.L⁻¹. La différence de potentiel ΔE_p, est de 65 mV et 160 mV pour respectivement le premier et le second système rédox.

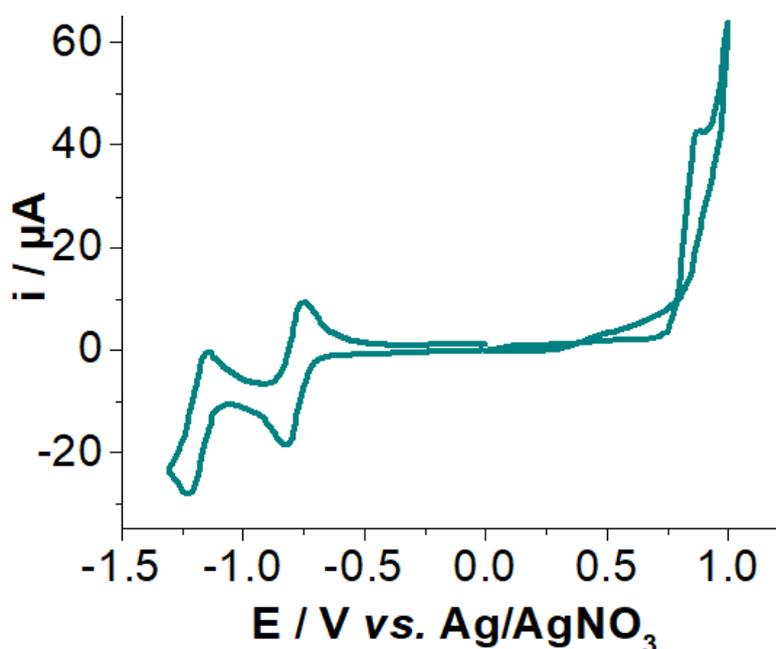


Figure 12 : CV de PV²⁺ en solution organique sur électrode de carbone vitreux de 3 mm de diamètre. Conditions : CH₃CN + DMF (80/20) + TBABF₄ 0,1 mol.L⁻¹, [PV²⁺] = 2.10⁻³ mol.L⁻¹, sous Ar, 50 mV.s⁻¹.

Conformément à ce qui est décrit dans la littérature, ces systèmes de réduction sont attribués aux deux réductions successives centrées sur les unités viologène (1 électron par unité viologène), conduisant respectivement au radical-cation ($V^{\bullet+}$) puis à l'espèce neutre (V^0), comme indiqué sur le Schéma 3. Une étude des propriétés électrochimiques avait déjà été réalisée au laboratoire en amont de la thèse.

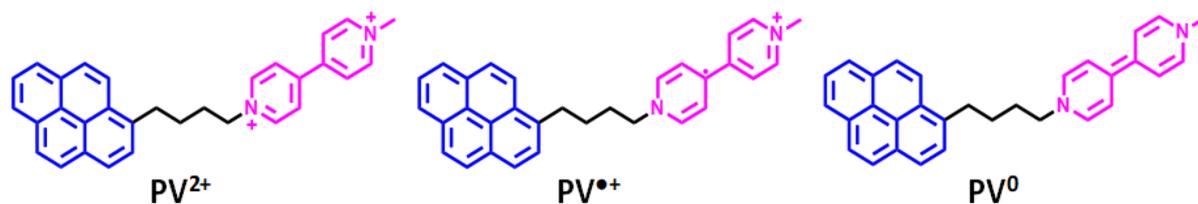


Schéma 3 : Représentation schématique des différents états d'oxydation de PV^{2+} .

De plus, dans la région des potentiels anodiques, une vague d'oxydation irréversible est détectée au potentiel de pic $E_{pa} = 0,86 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$ attribuée à l'oxydation de l'unité pyrène, comme déjà observé dans la littérature²⁶. L'intensité du pic anodique étant environ 2 fois plus élevée traduit d'un nombre d'électrons échangés de 2. L'étude sur EDT, Figure 13, permet d'observer deux réductions successives de même intensité, de $81 \pm 8 \mu\text{A}$ aux mêmes potentiels $E_{1/2}$ que ceux observés par CV, confirmant ainsi que pour chacun des processus électrochimiques le nombre d'électrons échangés est identique. De plus, dans la région des potentiels anodiques, est détectée une vague d'oxydation qui diminue fortement pour des potentiels supérieurs à 1 V, traduisant la formation d'un dépôt d'oligomères sur l'électrode de travail.

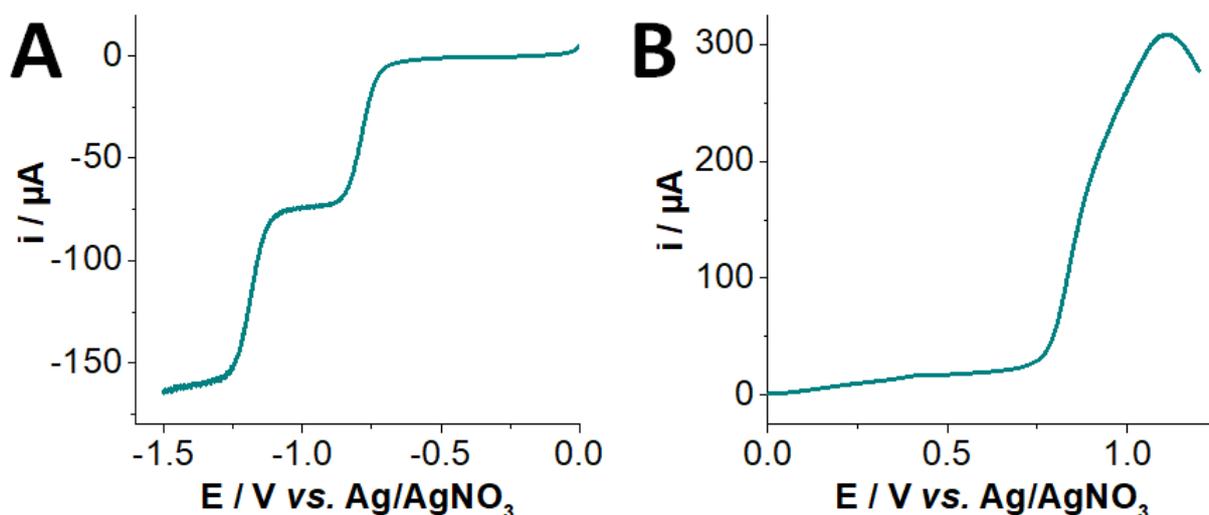


Figure 13 : CV de PV^{2+} en solution sur une électrode de carbone vitreux à disque tournant (3 mm) (A) et sur Pt (5 mm de diamètre) (B). Conditions : Ar, $\text{CH}_3\text{CN} + \text{DMF}$ (90/10) + TBABF_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\nu = 5 \text{ mV.s}^{-1}$, $\omega = 500 \text{ t.min}^{-1}$, $[\text{PV}]^{2+} = 1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

III.2. Electrochimie de PV^{2+} immobilisé sur électrodes de carbone vitreux et recouvertes de nanotubes de carbone

De par la présence du pyrène sur sa structure, PV^{2+} peut être immobilisé sur électrode par électropolymérisation ou via des interactions π -stacking avec les parois des nanotubes²⁷. Des essais d'électropolymérisation ont tout d'abord été réalisés sur électrode de carbone vitreux par voltampérométrie cyclique (CV) en effectuant 30 cycles entre 0,0 et 1,0 V, puisque les résultats précédents ont montré qu'en cyclant jusqu'à un potentiel de 1V, il y avait dépôt d'espèce insoluble sur l'électrode de carbone. L'oxydation du pyrène en radical cation, permet l'initiation de l'électropolymérisation. Les radicaux étant très réactifs, ils réagissent ensuite très rapidement pour former des espèces plus stables qui se déposent à la surface de l'électrode. Au fur et à mesure des cycles, le signal électrochimique caractéristique de l'oxydation du pyrène diminue, dû à l'accès restreint à l'électrode, qui est partiellement recouverte d'oligomères, Figure 14.

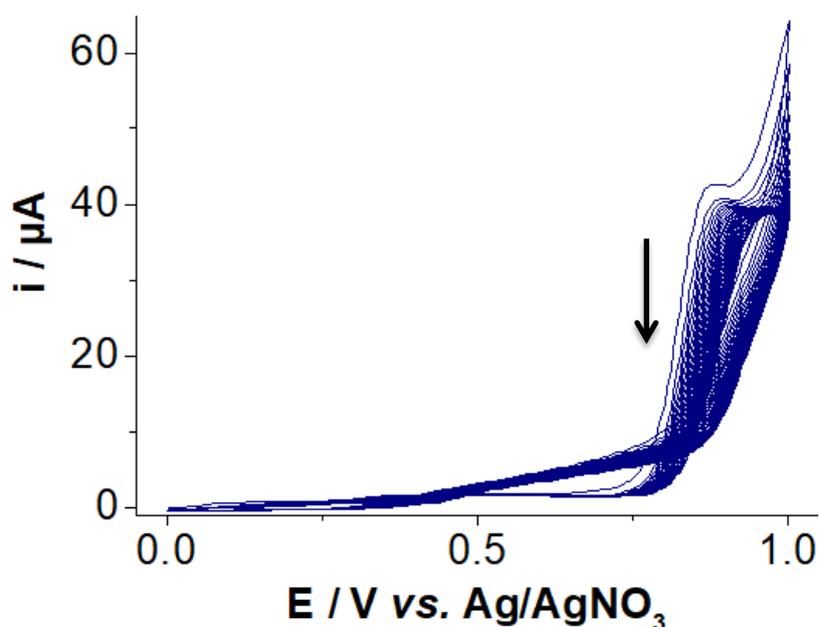


Figure 14 : Electropolymérisation de PV^{2+} sur électrode de carbone vitreux de 3 mm de diamètre par voltampérométrie. Conditions : $[PV]^{2+} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans MeCN/DMF (8 : 2) ; $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBABF₄. De 0 à 1 V vs. Ag/AgNO₃ pendant 30 cycles, $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, Ar.

Les électrodes ainsi obtenues sont transférées dans une solution organique (MeCN/DMF 8 :2 et TBABF₄ à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) exempte de monomères. Lorsque la fenêtre de potentiels est balayée de nouveau entre 0,0 à 1,1 V, Figure 15, un pic anodique irréversible est obtenu lors du premier cycle à $E_{pa} = 0,504 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$, pouvant être attribuée à l'oxydation du polymère. Lors du deuxième cycle, le premier pic anodique disparaît, certainement suite à sa suroxydation, en accord avec ce qui est décrit dans la littérature²⁸.

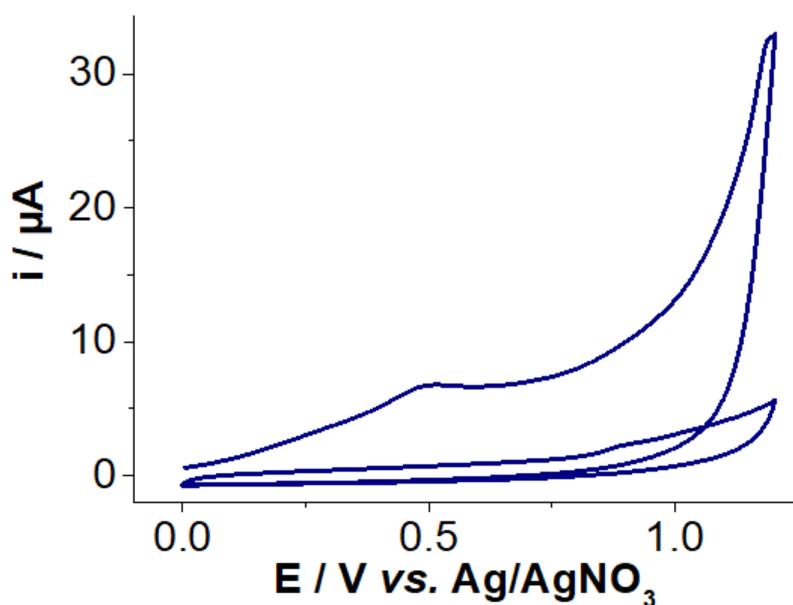


Figure 15 : CV en oxydation après électropolymérisation par voltampérométrie cyclique de PV^{2+} sur électrode de carbone vitreux. Conditions : MeCN/DMF (8 : 2) ; $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBABF₄, Ar, $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

De plus, le signal du viologène en réduction peut être détecté dans la région des potentiels négatifs. Un premier système est détecté (Figure 16) à $E_{1/2} = -0,730 \text{ V}$, au même potentiel que celui en solution, suivi d'un deuxième moins bien défini à $E_{pc} = -1,19 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$, ne permettant pas d'obtenir précisément la valeur de $E_{1/2}$. La présence de ces 2 signaux atteste de la réussite de l'immobilisation de PV^{2+} sur l'électrode par électropolymérisation du pyrène.

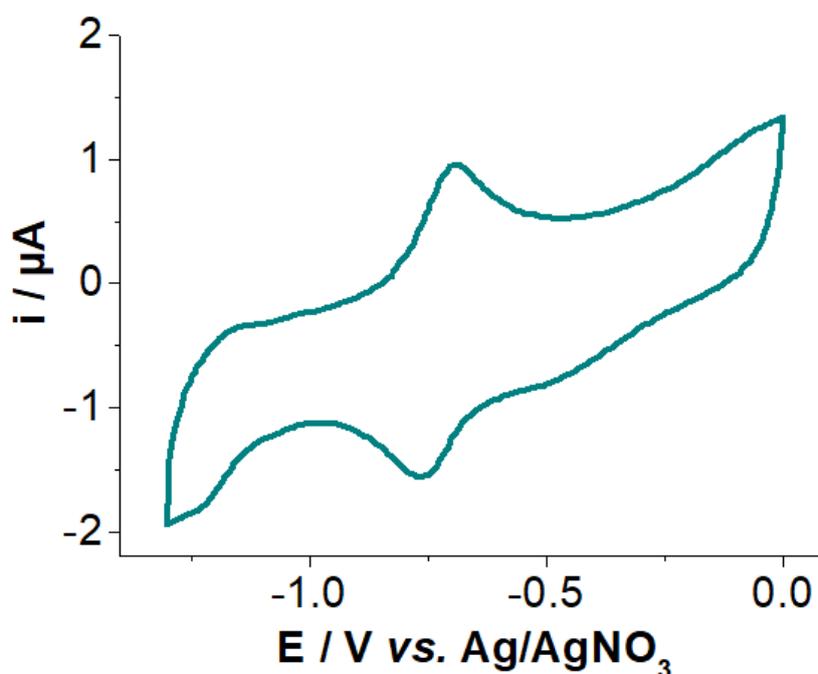


Figure 16 : CV en réduction après électropolymérisation par voltampérométrie du PV^{2+} sur une électrode de carbone vitreux. Conditions : MeCN/DMF (8 : 2) ; $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBABF₄, Ar, $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

La formation du film de polypyrène étant difficile à contrôler par CV, l'électropolymérisation de PV^{2+} a été réalisée par chronoampérométrie (CA) qui est une méthode connue pour contrôler la charge d'électropolymérisation et donc l'épaisseur du film électrogénéré²⁶. Ainsi, un potentiel de 1 V a été appliqué jusqu'à l'obtention d'une charge²⁶ de $2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, cette valeur de charge permettant d'obtenir des films fins de polymère. Il est à noter que la valeur de 1 V permet l'obtention d'une valeur de courant de $30 \mu\text{A}$, comme l'atteste Figure 17A. Cette valeur correspond bien à la valeur de courant mesuré sur la courbe de voltampérométrie cyclique pouvant être déterminée par CV. La génération du film de poly(pyrène) ($2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$) (Figure 17B) met en jeu 2,31 électrons par monomère de pyrène, avec 1,7 électrons pour les couplages radicalaires et 0,61 électrons pour l'oxydation du film de polymère formé²⁹.

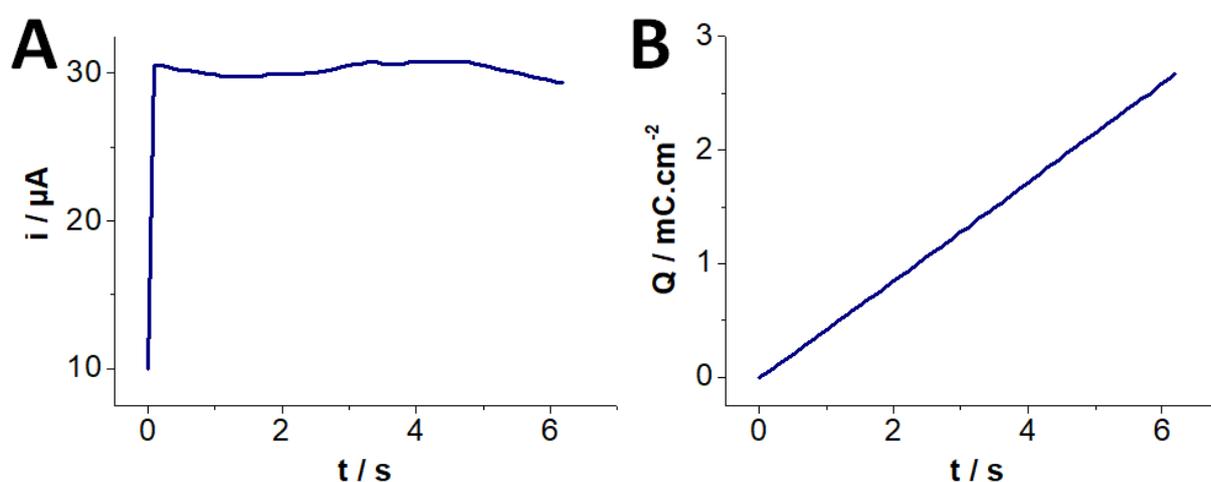


Figure 17 : Electropolymérisation de PV^{2+} sur électrode de carbone vitreux par chronoampérométrie. Conditions : $[PV]^{2+} = 2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans MeCN/DMF (8 : 2) ; TBABF₄, $E_{\text{appliqué}} = 1 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$ jusqu'à $2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, Ar,

Pour vérifier le succès de la polymérisation à potentiel imposé, la CV réalisée en réduction (Figure 18) atteste de la présence d'un pic cathodique à $E_{pc} = -0,798 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$, associé au balayage retour à un pic anodique à $E_{pa} = -0,712 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$, confirmant ainsi la présence du viologène en surface des électrodes et par conséquent le succès de l'électropolymérisation.

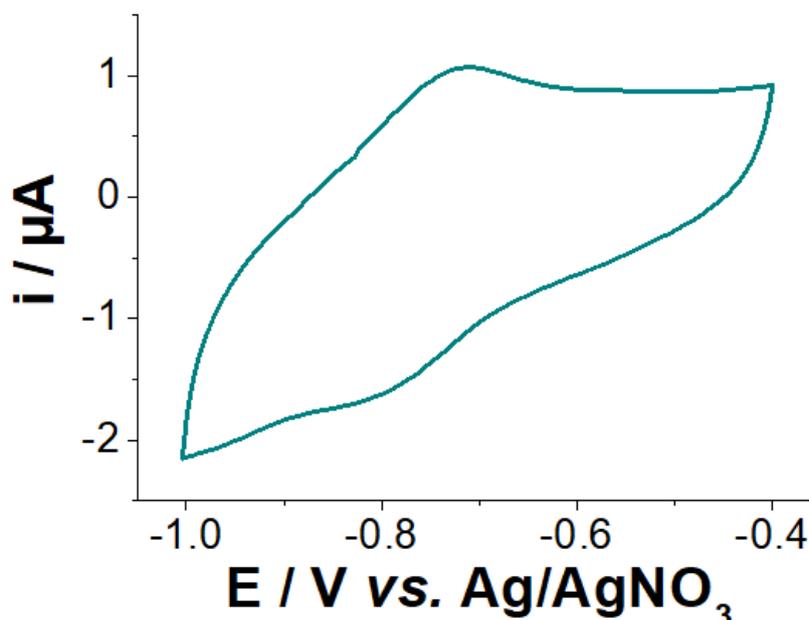


Figure 18 : CV en réduction après électropolymérisation par chronoampérométrie du PV^{2+} sur électrode de carbone vitreux. Conditions : MeCN/DMF (8 : 2) ; $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBABF₄, Ar, $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

Afin de savoir si l'électropolymérisation est efficace, le rendement de polymérisation, η , peut être calculé en utilisant la formule (1) :

$$\eta = \frac{\Gamma_{\text{réel}}}{\Gamma_{\text{théorique}}} \times 100 \quad (1)$$

Avec $\Gamma_{\text{réel}}$ et $\Gamma_{\text{théorique}}$ correspondant respectivement aux recouvrements surfaciques réel et théorique en mol.cm^{-2} . Ces valeurs sont calculées grâce aux formules établies dans les équations (2) et (3) :

$$\Gamma_{\text{théorique}} = \frac{Q_{\text{appliquée}}}{n'FS} \text{ et } \Gamma_{\text{réel}} = \frac{Q_{\text{intégrée}}}{nFS} \quad (2)$$

$$\text{Ainsi, } \eta = \frac{Q_{\text{intégrée}}}{Q_{\text{appliquée}}} \frac{n'}{n} \times 100 \quad (3)$$

Avec $Q_{\text{appliquée}}$ la quantité d'électricité utilisée lors de la polymérisation en Coulombs, n' le nombre d'électrons requis pour la polymérisation (soit 2,31), $n = 1$ étant le nombre d'électrons échangés et $Q_{\text{intégrée}}$ étant la charge sous le signal d'intérêt.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2. Après polymérisation, le recouvrement surfacique du PV^{2+} est de $1,88.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ associé à un rendement de polymérisation de 17 %, ces valeurs étant en accord avec les valeurs obtenues dans la littérature pour la polymérisation de pyrènes substitués³⁰.

Tableau 2 : Électropolymérisation par chronoampérométrie à $E = 1,0 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$ de PV^{2+} dans un mélange MeCN/DMF (8 : 2) + $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ TBABF₄ sur électrode de carbone vitreux ($0,071 \text{ cm}^2$).

$Q_{\text{appliquée}} / \text{C}$	$Q_{\text{intégrée}} / \text{C}$	$\Gamma_{\text{théorique}} / \text{mol.cm}^{-2}$	$\Gamma_{\text{réel}} / \text{mol.cm}^{-2}$	η
$1,775.10^{-4}$	$1,286.10^{-5}$	$1,123.10^{-8}$	$1,878.10^{-9}$	17 %

Le groupement pyrène du composé PV^{2+} est également mis à profit pour immobiliser le composé sur MWCNTs via des interactions « π - π stacking » fortes³¹. Après une première étape qui consiste à déposer les nanotubes de carbone sur électrode de carbone, comme décrit dans le chapitre II, la deuxième étape, quant à elle concerne la fonctionnalisation des MWCNTs par PV^{2+} . $40 \mu\text{L}$ de d'une solution de PV^{2+} à la concentration égale à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans DMF sont déposés sur les électrodes recouvertes de nanotubes, comme le montre le Schéma 4.

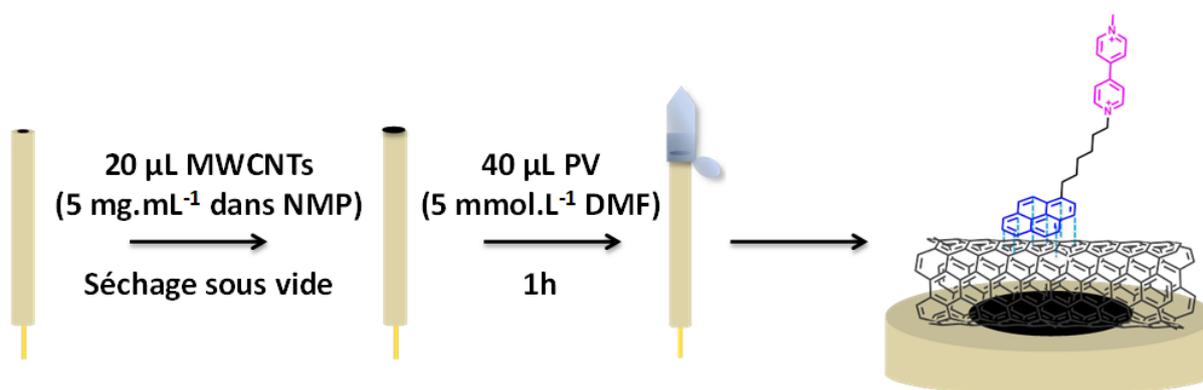


Schéma 4 : Fonctionnalisation des électrodes par dépôt de MWCNTs puis incubation du PV.

Comme déjà démontré précédemment²⁶, une incubation d'une heure est réalisée puisque un temps d'incubation supérieur à une heure ne permet pas d'augmenter le signal électrochimique. Après rinçage sous agitation pendant 10 minutes, les électrodes ainsi modifiées sont caractérisées par voltampérométrie cyclique dans un tampon phosphate à $\text{pH} = 7,5$ à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} afin de vérifier le succès de l'immobilisation de PV^{2+} sur les électrodes (Figure 19). Comme attendu, dans la région des potentiels négatifs, le système réversible caractéristique de la réduction de PV^{2+} en $\text{PV}^{\bullet+}$ est détecté à $E_{1/2} = -0,548 \text{ V vs. ECS}$, avec $\Delta E_p = 0,090 \text{ V}$.

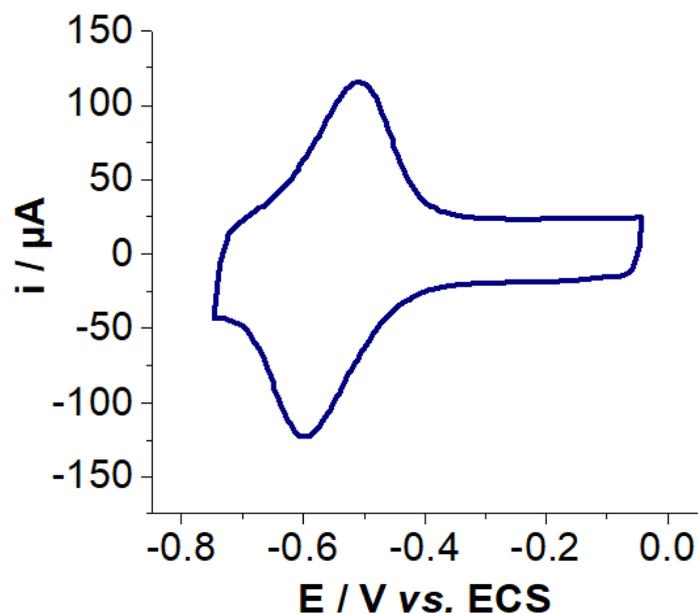


Figure 19 : CV d'une électrode de carbone vitreuse couverte de MWCNT-PV²⁺. Conditions : tampon phosphate pH = 7,5, sous Ar, électrodes couvertes de MWCNT (20 μL d'une solution de 5 mg.mL⁻¹ dans NMP), [PV²⁺] = 5.10⁻³ mol.L⁻¹, ν = 10 mV.s⁻¹.

Afin de confirmer l'immobilisation du pyrène viologène sur les électrodes de carbone recouvertes de nanotubes de carbone, des courbes de voltampérométrie cyclique (Figure 20A) ont été réalisées à différentes vitesses de balayage pour le premier système rédox. Comme on peut le constater sur la Figure 20B, les courants des pics anodiques et cathodiques varient linéairement avec la vitesse de balayage, confirmant ainsi l'immobilisation de PV²⁺ sur les nanotubes de carbone.

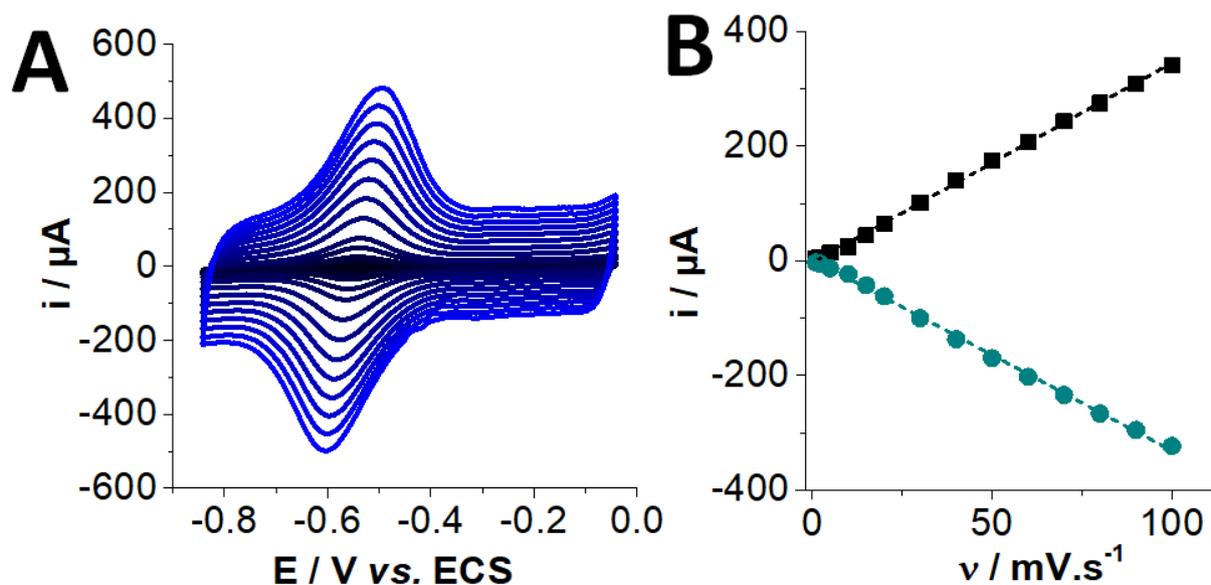


Figure 20 : (A) CVs et (B) évolution de l'intensité des courants de pics en fonction de la vitesse de balayage des électrodes de carbone vitreuses couvertes de MWCNT-PV²⁺. Conditions pour les CVs : tampon phosphate pH = 7,5, sous Ar, électrodes couvertes de MWCNT-PV²⁺, [PV²⁺] = 5.10⁻³ mol.L⁻¹, ν = 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 et 100 mV.s⁻¹.

De plus, afin de déterminer la constante d'interaction entre le composé PV^{2+} et les nanotubes de carbone ainsi que la concentration de PV^{2+} permettant une saturation de la surface par les groupements pyrène, les électrodes couvertes de MWCNTs sont incubées avec des solutions de concentrations croissantes de PV^{2+} entre $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. En adaptant la même procédure que celle précédemment décrite, des CVs (Figure 21A) sont réalisées pour étudier l'évolution des intensités des pics relatifs au couple $PV^{2+}/PV^{\bullet+}$, avec la concentration en PV^{2+} incubée (Figure 21B).

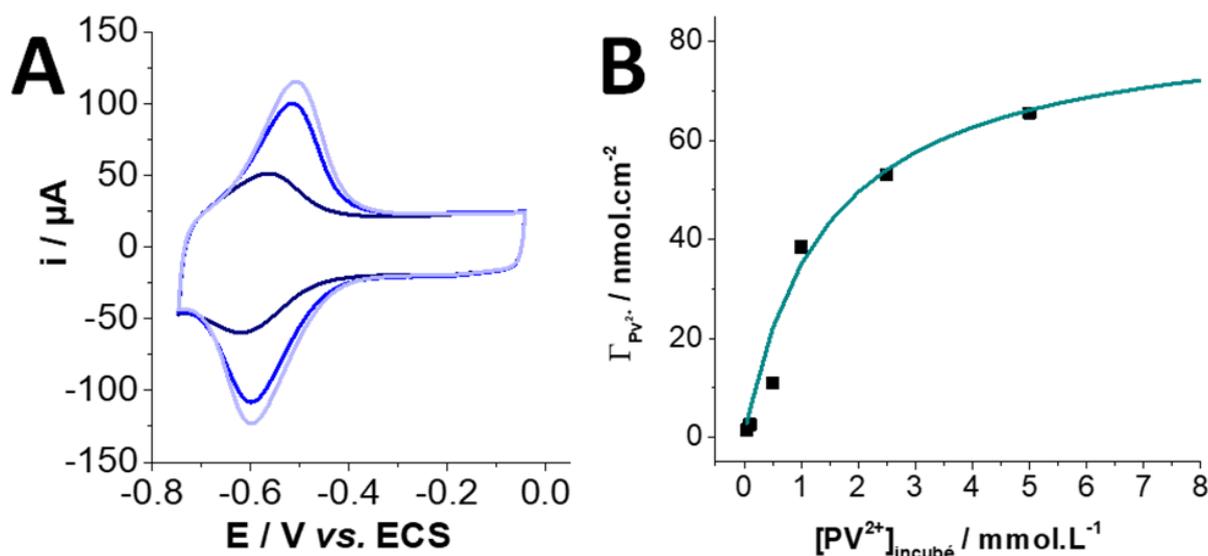


Figure 21 : CVs d'électrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNT- PV^{2+} à différentes concentrations (A) et évolution de la concentration surfacique en PV^{2+} en fonction de la concentration d'espèce incubée (B). Conditions : tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,5$, sous Ar, EGC couvertes de MWCNT- PV^{2+} , incubation de $40 \mu\text{L}$ pendant 1 h de $[PV^{2+}] = 0$ à $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans DMF, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Comme on peut le constater, le signal détecté à $E_{1/2} = -0,548 \text{ V}$ caractéristique du couple $PV^{2+}/PV^{\bullet+}$ augmente avec les concentrations croissantes en PV^{2+} . Après intégration des pics d'intérêts, les valeurs de recouvrements surfaciques $\Gamma_{PV^{2+}}$ en considérant 1 électron échangé sont rassemblées dans le Tableau 3, permettant ainsi, le tracé de la Figure 24B qui représente la concentration surfacique $\Gamma_{PV^{2+}}$ en fonction de la concentration en solution de PV^{2+} . La concentration de surface $\Gamma_{PV^{2+}}$ croît avec l'augmentation de la concentration en composé pour atteindre un plateau montrant ainsi que $\Gamma_{PV^{2+}}$ peut atteindre une valeur maximale notée $\Gamma_{PV^{2+}}^{\text{max}}$, attestant que la surface de l'électrode est saturée en PV^{2+} . L'isotherme de Langmuir, déjà utilisée pour des complexes de $[(1,10\text{-phenanthroline-5,6-dione})_2((4,4'\text{-bis(4-pyrène-1-ylbutyloxy)-2,2'-bipyridine})\text{Ru}^{\text{II}})] \text{ hexafluorophosphate}^{32}$, permet la simulation des données expérimentales selon l'équation (4) :

$$\Gamma_{PV^{2+}eq} = \frac{\Gamma_{PV^{2+}max} \times K_{PV} \times [PV^{2+}]}{1 + K_{PV} \times [PV^{2+}]} \quad (4)$$

Elle permet ainsi de déterminer $\Gamma_{PV^{2+}}^{\max}$ et $K_{PV^{2+}}$ la constante d'association entre PV^{2+} et l'électrode de carbone recouverte de nanotubes de carbone.

Tableau 3 : Variation de la concentration surfacique en fonction de la concentration en PV^{2+} incubée.

$[PV^{2+}] / \text{mmol.L}^{-1}$	$\Gamma_{PV^{2+}} / \text{nmol.cm}^{-2}$
0,05	1,51
0,1	2,54
0,5	10,93
1	38,48
2,5	52,99
5	65,53

Grâce au modèle établi, la concentration surfacique saturante de PV égale à 85 nmol.cm^{-2} et la constante d'association de 700 L.mol^{-1} entre PV^{2+} et les MWCNTs ont pu être déterminées. Cette constante d'affinité de 700 L.mol^{-1} entre MWCNTs et les groupement pyrène est plus faible que celle précédemment reportée ³², les groupements viologène pouvant être responsables de la diminution d'affinité, ceux-ci pouvant éventuellement interagir avec les nanotubes de carbone, posant ainsi la limitation du modèle utilisé.

III.3. Fonctionnalisation des glyconanoparticules avec le pyrène viologène

III.3.1. Elaboration des GNP_{PSCD}/PV^{2+} par la méthode de pré-fonctionnalisation

De façon identique à celle présentée précédemment pour $GNP_{PSCD}/Ad-V^{2+}$, l'auto-assemblage des GNP_{PSCD}/PV^{2+} a été réalisé par pré-fonctionnalisation. Après dissolution de 30 mg de chaînes de PSCD dans 4 mL d'un mélange de 80 % de THF et 20 % d'eau, avec 15,1 mg de PV^{2+} , soit 5 équivalents en moles, la solution est exposée 10 minutes à des ultra-sons pour augmenter la solubilité de PV^{2+} , puis est agitée à 1000 rpm pendant 24 h. Cette solution est ensuite additionnée à 160 mL d'eau sous agitation à 500 rpm avec un débit de 10,2 mL par heure. Après évaporation de la solution pendant 30 minutes à $35 \text{ }^\circ\text{C}$, le volume final est mesuré et ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à 160 mL. Afin d'augmenter le signal électrochimique, la solution de GNP_{PSCD}/PV^{2+} a été concentrée par 5, le volume à la fin de l'évaporation ayant été minutieusement mesuré et ajusté avec de l'eau distillée afin d'obtenir une concentration en polymère de $0,938 \text{ mg.mL}^{-1}$.

III.3.2. Propriétés électrochimiques des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$ en solution

Les propriétés rédox des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$ ainsi obtenues ont ensuite été étudiées par voltampérométrie cyclique.

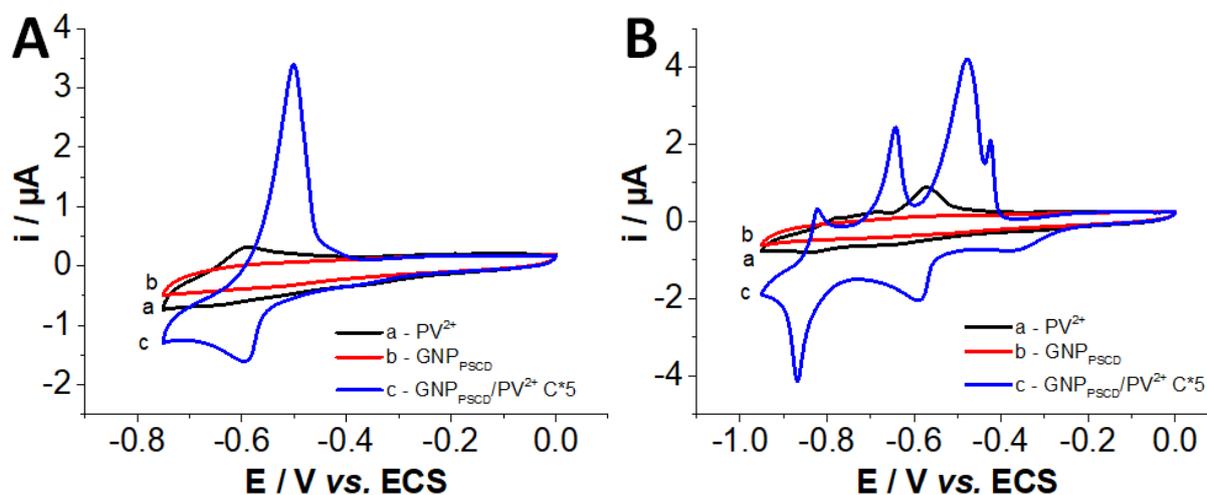


Figure 22 : CV du premier (A) et des deux (B) systèmes rédox du PV^{2+} en solution (courbe a), des GNP_{PSCD} (courbe b), et des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$ concentrés par 5 (courbe c) en solution aqueuse. **Conditions :** électrodes de carbone vitreux, (a) $[\text{PV}^{2+}]$ en solution = $0,094 \text{ mg.mL}^{-1}$ (solution saturée), sous Ar, 1 mL des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$ + 1 mL de tampon Britton Robinson à $\text{pH} = 6$, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Les voltampérogrammes obtenus pour le premier système rédox sont présentés sur la Figure 22A. Comme on peut le constater, la CV obtenue pour PV^{2+} en solution (Figure 25A, courbe a) présente un pic en réduction à peine détectable. Lors de l'oxydation des espèces réduites formées, on observe un système plus visible. Dans cette même gamme de potentiels, les GNP_{PSCD} (Figure 22A, courbe b) n'ont pas de signature électrochimique. Les glyconanoparticules modifiées par des groupements viologène, $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$, sont caractérisées par des courants beaucoup plus intenses à $E_{1/2} = -0,546 \text{ V}$, montrant que les glyconanoparticules permettent une solubilisation de PV^{2+} en milieu aqueux.

Sur la Figure 22B, c'est-à-dire pour une gamme de potentiel plus étendue, les deux pics cathodiques correspondant aux deux réductions successives du viologène sont également visibles pour les $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$. En revanche, le signal retour en oxydation est très complexe, avec de nombreux pics, pouvant correspondre à la fois à l'oxydation des espèces réduites générées, mais aussi à la désorption d'espèces ayant pu s'adsorber pendant le processus de réduction, comme nous l'observons aussi pour PV^{2+} seul. Les analyses en DLS et microscopie MEB permettront par la suite de déterminer la morphologie et la taille de ces glyconanoparticules.

IV. Conclusion

Les propriétés électrochimiques en milieu organique et milieu aqueux de deux dérivés du viologène, modifié par un groupement adamantane ou un groupement pyrène, ont été étudiées. Leur immobilisation sur électrode de carbone et de carbone recouvertes de nanotubes de carbone a été réalisée par différentes méthodes dépendant de la nature du groupement fonctionnel associé à l'entité viologène. Des essais de fonctionnalisation de GNP_{PSCD} ont été effectués avec ces deux composés mais les résultats les plus prometteurs pour l'obtention des GNP_{PSCD} modifiées par des dérivés du viologène ont été obtenus avec le pyrène-viologène. Nous avons pu cependant montrer que les glyconanoparticules obtenues avec le composé viologène modifié par l'adamantane permettaient d'encapsuler une quantité détectable par voie électrochimique après destruction de la forme sphérique des particules. La destruction de la forme sphérique des glyconanoparticules a été pour la première fois réalisée au laboratoire et a pu être mise en évidence par différentes techniques telles que la DLS ou par microscopie à balayage. Ce résultat est intéressant puisque l'on peut imaginer que les espèces rédox pourraient être libérées en fonction des applications visées. Les glyconanoparticules pourraient ainsi servir de « réservoir » de sonde rédox pour l'alimentation de biopiles par exemple, en remplaçant les chaînes de polymère par un autre polymère qui pourrait, en fonction des conditions expérimentales, libérer en milieu aqueux de façon progressive les espèces rédox.

En perspective de ce travail, l'étude des propriétés électrochimiques de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$ doit être approfondie en réalisant des électrolyses à potentiel imposé et pouvoir ainsi caractériser les glyconanoparticules à l'état réduit par spectroscopie UV-visible et par RPE. Les mesures en DLS et par MEB permettront aussi de déterminer la morphologie et la taille de ces objets. Il serait également intéressant par la suite de « détruire » la forme sphérique des $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{PV}^{2+}$ afin de déterminer si une quantité de PV^{2+} se trouve aussi piégée à l'intérieur des particules, comme nous avons pu le faire avec les $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{Ad-V}^{2+}$.

Au niveau des applications, comme rappelé dans l'introduction de ce chapitre, nous nous intéresserons tout d'abord à la réalisation de biocapteurs à nitrate, en élaborant des collaborations pour avoir les enzymes avec des activités élevées car les nitrates réductases commerciales proposées à ce jour ont une faible activité, paramètre constituant un frein à la poursuite de ce travail.

Références

1. Balzani, V., Credi, A., Francisco M. Raymo & Stoddart, J. F. Artificial molecular machines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3348–3391 (2000).
2. Liu, Y. *et al.* Linear Artificial Molecular Muscles. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9745–9759 (2005).
3. Saha, S. & Stoddart, J. F. Photo-driven molecular devices. *Chem Soc Rev* **36**, 77–92 (2007).
4. Da Silva, S., Shan, D. & Cosnier, S. Improvement of biosensor performances for nitrate determination using a new hydrophilic poly(pyrrole-viologen) film. *Sens. Actuators B Chem.* **103**, 397–402 (2004).
5. Cosnier, S., Da Silva, S., Shan, D. & Gorgy, K. Electrochemical nitrate biosensor based on poly(pyrrole-viologen) film-nitrate reductase-clay composite. *Bioelectrochemistry* **74**, 47–51 (2008).
6. Cosnier, S., Galland, B. & Innocent, C. New electropolymerizable amphiphilic viologens for the immobilization and electrical wiring of a nitrate reductase. *J. Electroanal. Chem.* **433**, 113–119 (1997).
7. Ramsay, G. & Wolpert, S. M. Utility of Wiring Nitrate Reductase by Alkylpyrroleviologen-Based Redox Polymers for Electrochemical Biosensor and Bioreactor Applications. *Anal. Chem.* **71**, 504–506 (1999).
8. Xuejiang, W. *et al.* Conductometric nitrate biosensor based on methyl viologen/Nafion®/nitrate reductase interdigitated electrodes. *Talanta* **69**, 450–455 (2006).
9. Wang, X. *et al.* Development of a conductometric nitrate biosensor based on Methyl viologen/Nafion® composite film. *Electrochem. Commun.* **8**, 201–205 (2006).
10. Da Silva, S., Cosnier, S., Gabriela Almeida, M. & Moura, J. J. G. An efficient poly(pyrrole-viologen)-nitrite reductase biosensor for the mediated detection of nitrite. *Electrochem. Commun.* **6**, 404–408 (2004).
11. Badalyan, A. *et al.* An Efficient Viologen-Based Electron Donor to Nitrogenase. *Biochemistry* **58**, 4590–4595 (2019).
12. Milton, R. D. *et al.* The In Vivo Potential-Regulated Protective Protein of Nitrogenase in *Azotobacter vinelandii* Supports Aerobic Bioelectrochemical Dinitrogen Reduction In Vitro. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 9044–9052 (2017).
13. Patel, J., Cai, R., Milton, R., Chen, H. & Minter, S. D. Pyrene-Based Noncovalent Immobilization of Nitrogenase on Carbon Surfaces. *ChemBioChem* **21**, 1729–1732 (2020).
14. Eng, L. H. *et al.* Viologen-Based Redox Polymer for Contacting the Low-Potential Redox Enzyme Hydrogenase at an Electrode Surface. *J. Phys. Chem.* **98**, 7068–7072 (1994).
15. Qian, D.-J. *et al.* Electrochemical hydrogen evolution by use of a glass carbon electrode sandwiched with clay, poly(butylviologen) and hydrogenase. *Mater. Lett.* **57**, 1130–1134 (2003).
16. Oughli, A. A. *et al.* Viologen-modified electrodes for protection of hydrogenases from high potential inactivation while performing H₂ oxidation at low overpotential. *Dalton Trans.* **47**, 10685–10691 (2018).
17. Shown, I., Ujihara, M. & Imae, T. Sensitizing of pyrene fluorescence by β -cyclodextrin-modified TiO₂ nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **352**, 232–237 (2010).
18. Chen, G. & Jiang, M. Cyclodextrin-based inclusion complexation bridging supramolecular chemistry and macromolecular self-assembly. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2254 (2011).

19. De Simone, B. C., Marino, T. & Russo, N. TDDFT investigation on methylviologen, 3,7-diazabenzophosphole, and helical helquat electrochromic systems. *Theor. Chem. Acc.* **135**, 118 (2016).
20. Lee, C.-W. & Bard, A. J. Comparative electrochemical studies of N-methyl-N'-hexadecyl viologen monomolecular films formed by irreversible adsorption and the langmuir-blodgett method. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **239**, 441–446 (1988).
21. Hammond, J. L. *et al.* Solubilized Enzymatic Fuel Cell (SEFC) for Quasi-Continuous Operation Exploiting Carbohydrate Block Copolymer Glyconanoparticle Mediators. *ACS Energy Lett.* **4**, 142–148 (2019).
22. Leclercq, L. Etude de la capacité d'inclusion de la beta-cyclodextrine vis-a-vis de divers polyélectrolytes. (L'université des sciences et technologies de Lille, 1997).
23. Contreras Carballada, P. *et al.* Variation of the Viologen Electron Relay in Cyclodextrin-Based Self-Assembled Systems for Photoinduced Hydrogen Evolution from Water. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6729–6736 (2012).
24. Caldas, B. S. *et al.* Drug carrier systems made from self-assembled glyconanoparticles of maltoheptaose-b-polyisoprene enhanced the distribution and activity of curcumin against cancer cells. *J. Mol. Liq.* **309**, 113022 (2020).
25. Gross, A. J. *et al.* Redox-Active Glyconanoparticles as Electron Shuttles for Mediated Electron Transfer with Bilirubin Oxidase in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 16076–16079 (2017).
26. Hosu, O. *et al.* Nanostructured photoactivatable electrode surface based on pyrene diazine. *Electrochem. Commun.* **80**, 5–8 (2017).
27. Goff, A. L. *et al.* Facile and tunable functionalization of carbon nanotube electrodes with ferrocene by covalent coupling and π -stacking interactions and their relevance to glucose bio-sensing. *J. Electroanal. Chem.* **641**, 57–63 (2010).
28. Mazur, M. & Blanchard, G. J. Photochemical and Electrochemical Oxidation Reactions of Surface-Bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Phys. Chem. B* **108**, 1038–1045 (2004).
29. Waltman, R. J. The Electrochemical Oxidation and Polymerization of Polycyclic Hydrocarbons. *J. Electrochem. Soc.* **132**, 631 (1985).
30. Haddad, R. Fonctionnalisation de Nanotubes de Carbone pour le Développement de Bio-architectures Affines: Application aux Biocapteurs. (Université de Monastir et Université de Grenoble, 2011).
31. Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, S. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. *Electrochimica Acta* **82**, 179–190 (2012).
32. Reuillard, B. Elaboration de bioélectrodes à base de nanotubes de carbone pour la réalisation de biopiles enzymatiques Glucose/O₂. (Université de Grenoble, 2014).

Chapitre V

Utilisation des glyconanoparticules pour la réalisation de biocapteurs et de biopiles

Sommaire

I. Introduction.....	152
II. Biocapteurs à glucose à base de glyconanoparticules à base de cyclodextrine et de maltoheptaose.....	152
II.1. Choix de l'enzyme.....	152
II.2. Configuration du biocapteur $\text{GNP}_{\text{PCSD}}/\text{GOx}$	153
II.2.1. Caractérisation du matériau d'accroche.....	153
II.2.2. Détermination des caractéristiques de biocapteurs à glucose à base des différents types de GNPs.....	155
II.3. Configuration du biocapteur $\text{GNP}_{\text{PCSD}}/\text{GOx}/\text{GNP}_{\text{PCSD}}/\text{GOx}$	159
II.3.1. Détermination des caractéristiques	159
III. Réalisation de biocathodes à base de glyconanoparticules	162
III.1. Introduction	162
III.2. Biocathode à base de $\text{GNP}_{\text{PCSD}}/\text{AQ}$	163
III.3. Biocathode à base de $\text{GNP}_{\text{PCSD}}/\text{AQS}$	166
IV. Conclusion-Perspectives	168
Références	169

I. Introduction

Dans ce chapitre, les glyconanoparticules obtenues dans les chapitres précédents II et III sont utilisées pour concevoir des bioélectrodes pour des applications analytiques et énergétiques. Ainsi, ce chapitre est tout d'abord consacré, dans une première partie, à la réalisation de biocapteurs en utilisant les glyconanoparticules conçues, à partir des copolymères PSCD, PSMH ou à partir d'un mélange de ceux-ci, comme matériaux d'ancrage pour les biomolécules. La deuxième partie de ce chapitre, est quant à elle, consacrée à la réalisation de biocathodes avec une première sous-partie dédiée à l'utilisation des glyconanoparticules à base d'antraquinone pour orienter la laccase et une deuxième sous-partie, qui explore la capacité des glyconanoparticules à base d'antraquinone sulfonate à orienter la bilirubine oxydase. Dans chaque partie, quelques rappels sont effectués sur les trois enzymes utilisées qui font toutes les trois parties de la famille des oxydoréductases.

II. Biocapteurs à glucose à base de glyconanoparticules à base de cyclodextrine et de maltoheptaose

II.1. Choix de l'enzyme

Pour la réalisation des biocapteurs, nous avons choisi une enzyme modèle, la glucose oxydase (GOx, EC 1.1.3.4) de poids moléculaire de 180 kDa modifiée par des groupements adamantane, l'interaction entre le groupement adamantane et la β -cyclodextrine dans l'eau ayant une constante d'association élevée ¹ ($K = 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$). De plus, la stabilité de la GOx dans le temps et son faible coût d'achat par rapport à d'autres enzymes, telle que la polyphénol oxydase par exemple, en font une candidate idéale pour valider de nouvelles stratégies d'immobilisation de biomolécules. Comme rappelé dans le chapitre bibliographique, l'oxydation du β -D-glucose catalysée par l'enzyme en D-gluconolactone en présence de dioxygène, s'accompagne de la production de peroxyde d'hydrogène qui peut être facilement détecté et quantifié par dosage ampérométrique en imposant à l'électrode de travail un potentiel de 0,7 V vs. ECS. Cette méthode de dosage du glucose par voie électrochimique est donc parfaitement adaptée pour évaluer la capacité des glyconanoparticules à constituer la couche d'ancrage de la glucose oxydase substituée par les groupements adamantane.



Schéma 1 : Schéma simplifié traduisant l'interaction entre l'enzyme et la cyclodextrine, via le groupement adamantane, via des interactions hôte-invité, $K = 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

II.2. Configuration du biocapteur GNP_{PSCD}/GOx

II.2.1. Caractérisation du matériau d'accroche

Pour réaliser les mesures ampérométriques, la première étape consiste à déposer 50 μL du matériau d'ancrage de l'enzyme, constitué de GNP_{PSCD} sur électrode de Pt, qui après séchage permet l'immobilisation de l'enzyme. Afin de mieux caractériser les dépôts sur les électrodes, les surfaces recouvertes de ces nano-objets sont tout d'abord analysées à l'échelle macroscopique à l'aide d'un microscope optique laser confocal Keyence Vega qui permet d'enregistrer des images des dépôts, sur des surfaces de quelques centaines de micromètres carrés. Après traitement des images, il est possible ensuite de déterminer l'épaisseur et la rugosité (R_a) des dépôts. Il existe différentes normes pour définir la rugosité R_a du dépôt et dans notre cas, nous avons utilisé la norme JIS 0601-1994 qui définit la rugosité comment étant « la moyenne des valeurs absolues des écarts entre le profil obtenu et une ligne moyenne de ce profil ». Pour réaliser les clichés en microscopie laser, les électrodes de platine de diamètre de 5 mm utilisées pour la caractérisation électrochimique des biocapteurs ne sont pas adaptées du fait de leur géométrie et de la longueur du corps de l'électrode. Nous avons donc utilisé la cellule montrée sur la Figure 1A, qui a permis par la suite d'insérer des électrodes de platine de géométrie plane et d'obtenir, via la géométrie de la cellule, une surface d'électrode bien définie.



Figure 1 : Cellule (A) permettant d'accueillir l'électrode de Pt (B).

Les électrodes de platine (Figure 1B) sont conçues au laboratoire en réalisant des dépôts successifs de 5 nm de chrome et de 50 nm de platine par pulvérisation cathodique sur une plaque de verre. Après dépôt d'une goutte de 200 μL de glyconanoparticules sur l'électrode de platine insérée dans la cellule et après séchage, les électrodes ainsi obtenues sont analysées 12 heures plus tard en microscopie. Le volume est calculé de façon à respecter le ratio des deux surfaces de Pt. Pour déterminer l'épaisseur du dépôt des glyconanoparticules, une rayure est réalisée sur le film à l'aide d'une aiguille, comme on peut le constater sur la Figure 2, l'épaisseur pouvant ainsi être déduite de la différence entre les deux niveaux. A l'aide du

grossissement de 50, différents profils sont effectués sur des surfaces carrées de 40 μm sur 40 μm et permet de remonter, à l'aide du logiciel, à la valeur de la rugosité Ra.

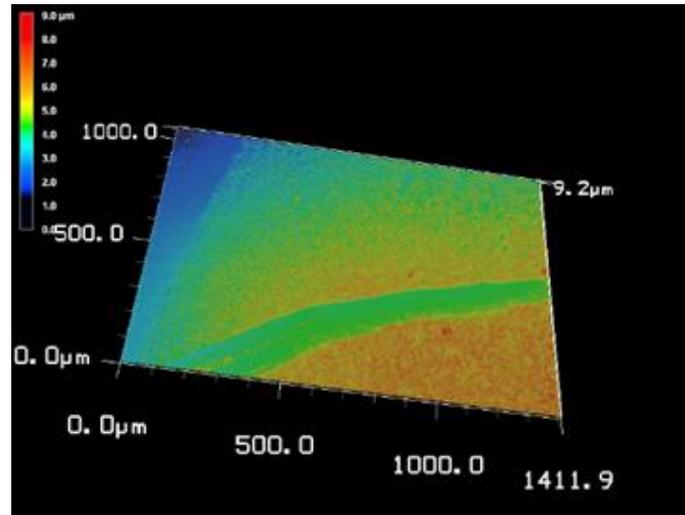


Figure 2 : Vue 3D des électrodes de Pt recouvertes par 200 μL de GNP_{PSCD}.

La différence entre les deux niveaux ne nous a pas permis d'accéder à une valeur d'épaisseur cohérente car la pression exercée a entraîné une détérioration des couches inférieures, engendrant une surestimation de l'épaisseur du dépôt. Afin de remédier à cette difficulté, les épaisseurs des films de GNPs ont été déterminées en réalisant des clichés avec un grossissement beaucoup plus élevé de 150 qui permet de visualiser certaines zones de l'électrode où aucune glyconanoparticule n'est observée (Figure 3).

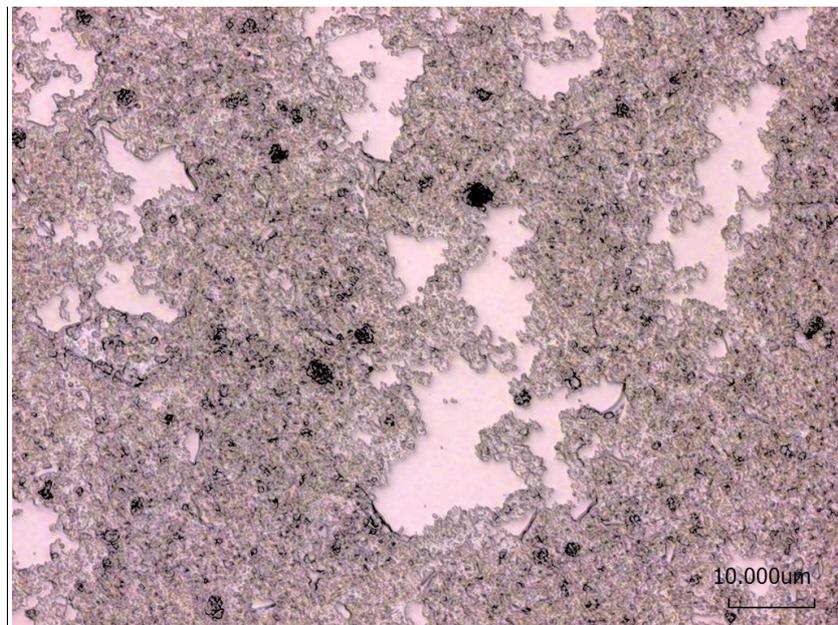


Figure 3 : Cliché obtenu avec un grossissement de 150 afin de déterminer l'épaisseur du dépôt

Grâce à la différence entre les deux niveaux, une épaisseur de 200 ± 20 nm avec une rugosité assez élevée de 46 nm sont déterminées. En tenant compte de la taille des GNPs déterminée par MET, l'épaisseur correspond à environ 8 couches de nanoparticules avec une rugosité de valeur équivalente à une couche de GNP_{PSCD} . De plus, les images MEB (Figure 4) permettent également de confirmer la forme sphérique des glyconanoparticules.

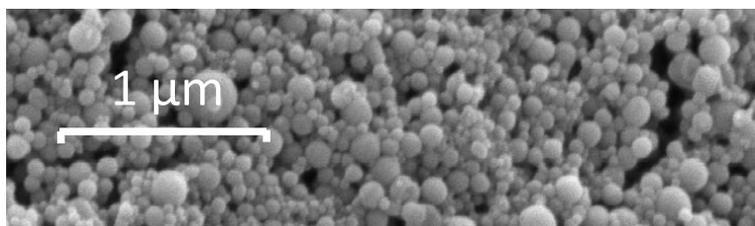


Figure 4 : Image MEB réalisée par dépôt de GNP_{PSCD} et après métallisation de la surface.

II.2.2. Détermination des caractéristiques de biocapteurs à glucose à base des différents types de GNPs

Les électrodes de Pt préparées avec un dépôt de 50 μL de GNP_{PSCD} , après séchage sont incubées avec 25 μL d'une solution d'enzyme ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) à 4°C pendant 7 h. Après rinçage pendant 10 minutes dans une solution de PBS de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,2$, les électrodes sont soumises à un potentiel de $0,7 \text{ V vs. ECS}$ dans une solution de PBS de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,2$ (Figure 5A). Après stabilisation du courant (environ 1 h), l'ajout de glucose à différentes concentrations permet d'enregistrer l'augmentation du courant qui est proportionnel à la concentration de H_2O_2 généré via la réaction enzymatique et donc à la concentration en glucose. Les mêmes expériences sont réalisées avec les matériaux constitués de particules hybrides ayant 50 % de PSCD, $\text{GNP}_{\text{PSCD}50}$, et à base de maltoheptaose uniquement, GNP_{PSMH} (respectivement Figure 5B et Figure 5C), ces dernières jouant le rôle d'électrodes témoins puisque les glyconanoparticules GNP_{PSMH} ne possèdent pas de structures permettant des interactions du type hôte-invité. De plus, afin d'évaluer éventuellement les phénomènes d'adsorption de l'enzyme sur le platine, les mêmes expériences ont été réalisées avec un dépôt de 25 μL de glucose oxydase sur l'électrode de platine dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 5D) citées ci-dessus. Pour plus de clarté, la glucose oxydase modifiée par des groupements adamantane est notée GOx.

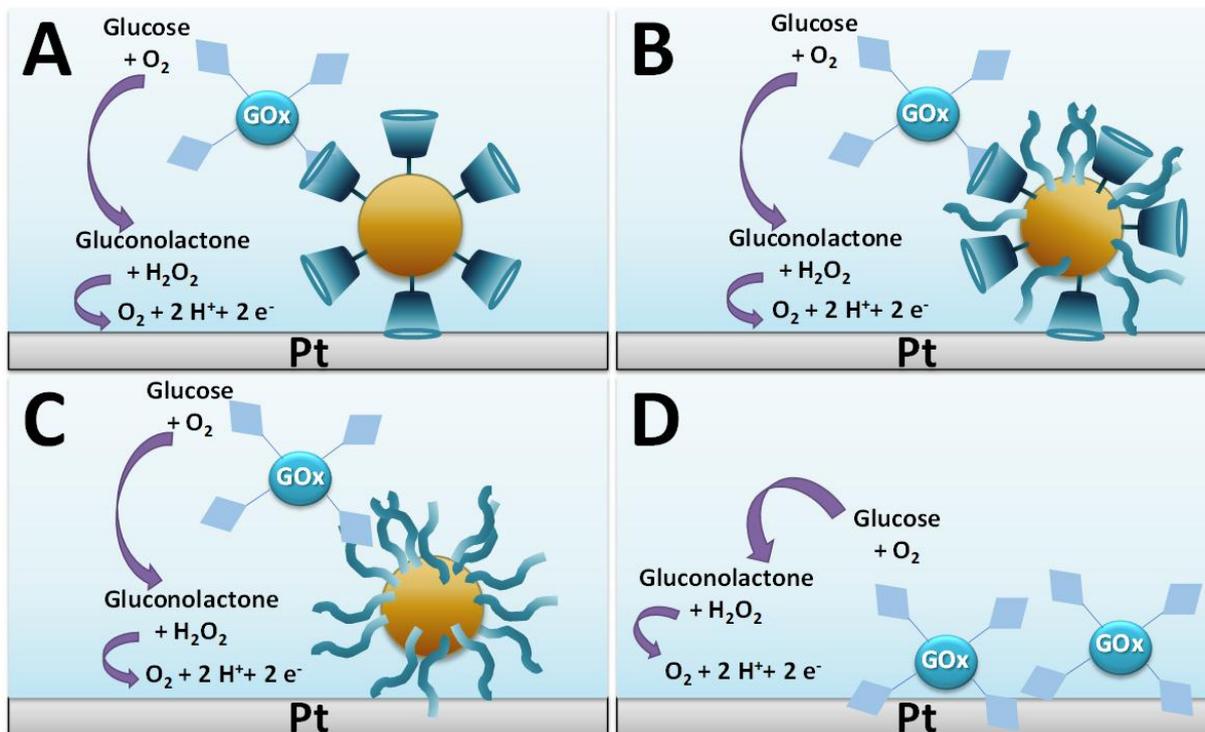


Figure 5 : Principe des biocapteurs réalisés avec l'adsorption de 50 µL de glyconanoparticules à base de GNP_{PSCD} (A), $\text{GNP}_{\text{PSCD}50}$ (B) et GNP_{PSMH} (C) après immobilisation de 25 µL d'enzyme et à partir de 25 µL de dépôt d'enzyme sur électrode de platine de 0,5 cm de diamètre, les configurations C et D étant des électrodes témoins.

La courbe d'étalonnage obtenue pour les électrodes recouvertes de GNP_{PSCD} est représentée sur la Figure 6A alors que celle obtenue pour les électrodes recouvertes de $\text{GNP}_{\text{PSCD}50}$ est représentée sur la Figure 6B. Sur chacune des Figures 6A et 6B, sont ajoutées les courbes d'étalonnage obtenues avec l'adsorption de 25 µL d'enzyme et avec les dépôts de GNP_{PSMH} , pour comparaison. Toutes les courbes sont réalisées après une incubation de 7 h de la Gox à 4 °C.

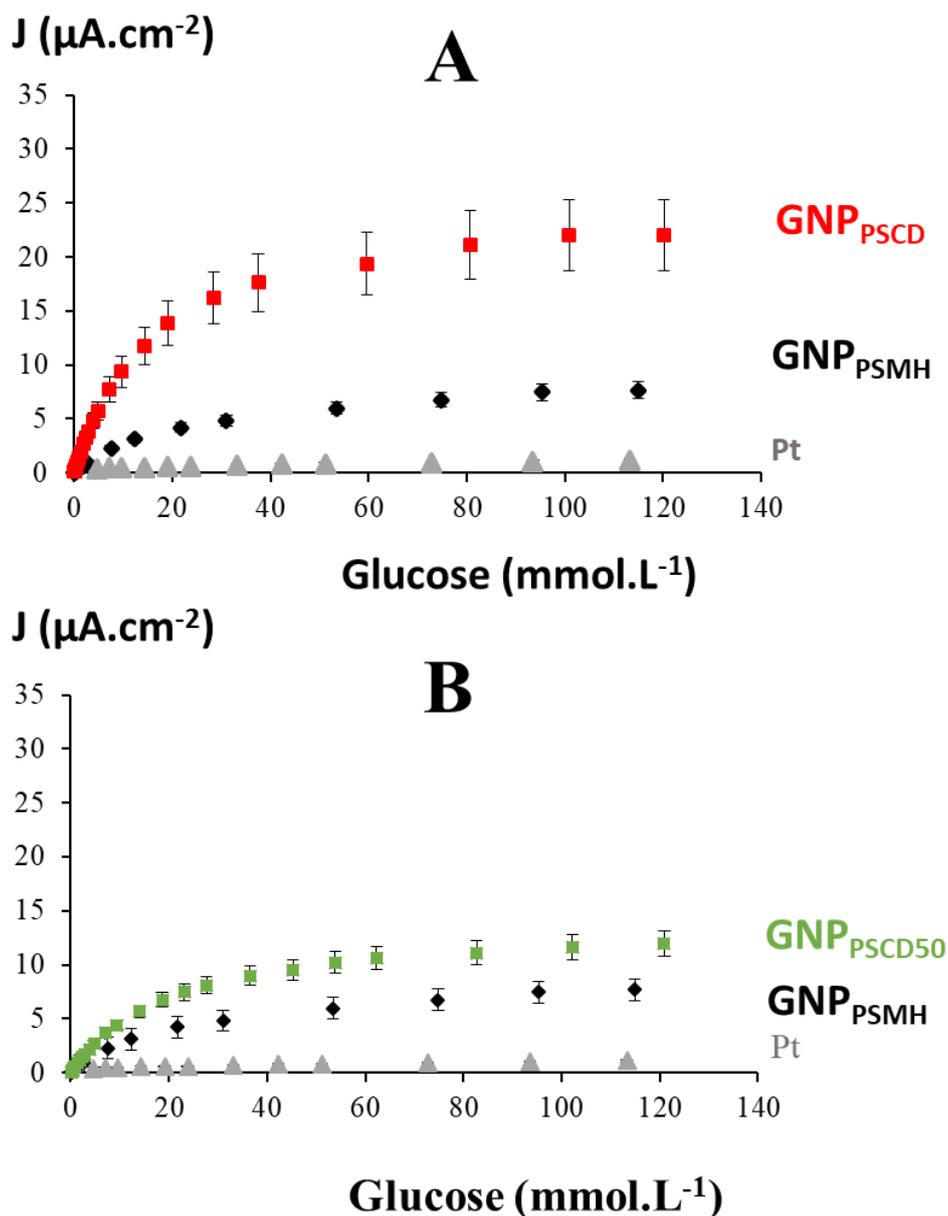


Figure 6 : Courbes d'étalonnage du glucose obtenues avec les électrodes modifiées par un dépôt de 50 μL de GNPs composés de GNP_{PSCD} (A), ou GNP_{PSCD50} (B), ou GNP_{PSMH} , suivie d'une incubation de 7 h à 4 °C de 25 μL de GOx et de Pt recouvertes de 25 μL de GOx. Conditions : $E_{\text{appliqué}} = 0,7 \text{ V vs. ECS}$. Solution PBS 0,01 mol.L⁻¹, pH = 7,2. T = 25 °C.

On peut noter que pour chacune des électrodes recouvertes de glyconanoparticules, les courbes d'étalonnage ont un comportement de type Michaelis-Menten avec une partie linéaire sur une gamme de concentrations suivie d'un plateau. Des expériences réalisées et des courbes d'étalonnage ainsi obtenues, peuvent être déduites le seuil de détection qui correspond à la concentration pour laquelle le signal mesuré est 3 fois celui du bruit, la sensibilité qui correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe d'étalonnage, le domaine de linéarité qui est la gamme de concentrations de la partie linéaire de la courbe d'étalonnage,

et enfin la densité de courant J_{\max} qui est directement liée à la quantité d'enzyme immobilisée sur électrode. Les caractéristiques des capteurs ainsi obtenus sont rassemblées dans le Tableau 1.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des biocapteurs obtenues avec les différents types de GNPs à base de cyclodextrine et de maltoheptaose GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$, temps d'incubation de 7 h avec 25 μL d'enzymes. Domaine de linéarité obtenu avec $R^2 = 0,999$. ND veut dire dans le tableau non déterminé.

Matériau d'électrode	Seuil de détection mol.L^{-1}	Sensibilité $\text{mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$	Domaine de linéarité mol.L^{-1}	J_{\max} $\mu\text{A.cm}^{-2}$
Pt/GNP_{PSCD}/GOx	$7,93.10^{-5}$	1,32	$7,93.10^{-5} - 2,89.10^{-3}$	23 ± 4
Pt/GNP_{PSMH}/GOx	$17,9.10^{-5}$	0,36	$17,9.10^{-5} - 2,39.10^{-3}$	7 ± 1
Pt/$\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$/GOx	$15,1.10^{-5}$	0,58	$15,1.10^{-5} - 2,23.10^{-3}$	12 ± 2
Pt/GOx	ND	ND	ND	inférieur à 2

Les caractéristiques des biocapteurs diffèrent selon le matériau utilisé. En effet, la valeur de J_{\max} de $23 \pm 4 \mu\text{A.cm}^{-2}$ obtenue avec les glyconanoparticules GNP_{PSCD} est environ 3 fois plus élevée que celle obtenue avec les glyconanoparticules GNP_{PSMH} ($7 \pm 1 \mu\text{A.cm}^{-2}$) en association avec une sensibilité plus élevée de $1,32 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ comparée à $0,36 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. De plus, le seuil de détection de $7,93.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ obtenu pour les matériaux à base de particules GNP_{PSCD} est plus sensible que celui mesuré avec les matériaux à base GNP_{PSMH} ($17,9.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) en association avec une gamme de linéarité légèrement plus étendue. La réponse du biocapteur élaboré à partir de GNP_{PSMH} pourrait s'expliquer par la formation de liaisons hydrogènes entre le maltoheptaose et l'enveloppe protéique de l'enzyme qui possède un degré de glycosylation élevé, variant entre 16 % à 25 % de son poids moléculaire ².

En ce qui concerne la courbe d'étalonnage obtenue avec les particules hybrides $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$, il ressort que la valeur de J_{\max} de $12 \pm 2 \mu\text{A.cm}^{-2}$ est plus faible que celle obtenue avec GNP_{PSCD} , attestant ainsi d'une plus faible quantité d'enzyme immobilisée. Même si l'on peut penser que les cyclodextrines des GNP_{PSCD} ne sont pas toutes impliquées dans le processus d'immobilisation des enzymes du fait de l'encombrement stérique généré par l'enzyme de taille de l'ordre $7,5 \times 5,5 \times 8 \text{ nm}^3$, les résultats expérimentaux montrent que cette configuration est à privilégier pour la réalisation de biocapteur à glucose puisque c'est celle-ci qui permet d'obtenir la valeur de J_{\max} la plus élevée, une sensibilité accrue et le plus faible seuil de détection.

Ces résultats regroupés attestent donc sans ambiguïté du succès de l'immobilisation via des interactions d'inclusion entre les cyclodextrines en surface des glyconanoparticules et les groupements adamantane de la glucose oxydase. De plus, en comparant les caractéristiques obtenues de cette configuration de bioélectrode à celles décrites dans la littérature, les valeurs de densité de courant maximal et de la sensibilité sont supérieures à celles obtenues avec des électrodes planes recouvertes de polymère substitué par des groupements adamantane permettant l'ancrage de la glucose oxydase-cyclodextrine ⁴ avec des valeurs respectives de $10 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et $0,175 \text{ mA}\cdot\text{mol}^{-1}\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$, montrant ainsi l'intérêt de l'utilisation des glyconanoparticules dans la conception de biocapteurs.

II.3. Configuration du biocapteur $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}/\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}$

II.3.1. Détermination des caractéristiques

Afin d'augmenter les caractéristiques du capteur obtenu, nous avons construit un nouvel édifice biomoléculaire (Figure 7) qui consiste à alterner par deux fois les couches de GNP_{PSCD} et d'enzyme, les sphères de GNPs jouant à la fois de rôle d'espaceur et de couche d'ancrage pour les enzymes.

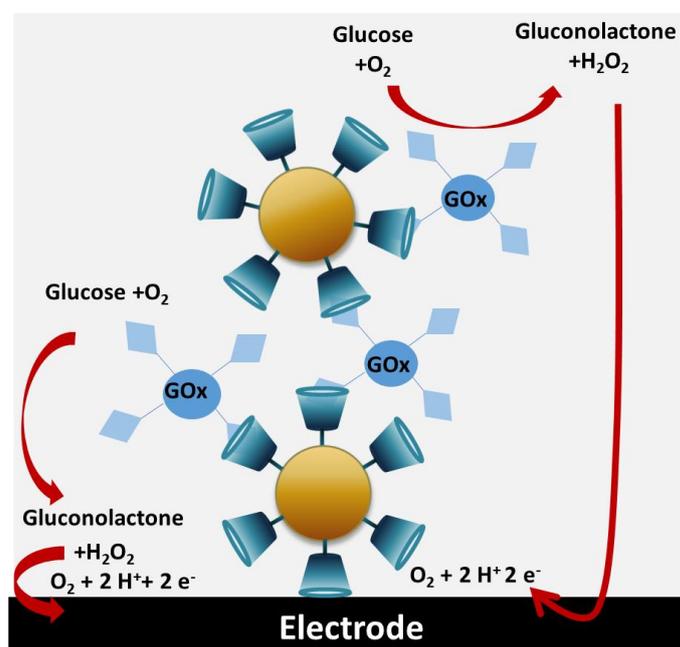


Figure 7 : Principe des biocapteurs réalisés avec alternance de couches de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}/\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}$ sur électrode de platine de 0,5 cm de diamètre.

Le temps d'incubation de 7 h à 4 °C ne nous permet pas de concevoir et de caractériser les bioélectrodes dans une même journée. Ainsi, afin d'accélérer la cinétique d'inclusion entre l'enzyme et les cyclodextrines, les incubations sont réalisées à température ambiante, avec un

temps d'incubation de l'enzyme diminué à 2 h 30 (au lieu de 7 h). La courbe d'étalonnage est représentée sur la Figure 8 avec les résultats rassemblés dans le Tableau 2. La réalisation du biocapteur ainsi décrit, dupliqué, permet de retrouver les caractéristiques du biocapteur réalisé précédemment en tenant compte des incertitudes ; c'est-à-dire un seuil de détection de $7,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, une sensibilité de $1,43 \text{ mA.mol}^{-1}\text{L.cm}^{-2}$ et un $J_{\text{max}} = 27 \pm 2 \mu\text{A}$ au lieu de $23 \pm 4 \mu\text{A}$. Ce résultat a permis de poursuivre le travail en effectuant un autre dépôt successif de GNPs et de GOx, dans le but, comme indiqué précédemment, d'améliorer les caractéristiques du biocapteur électrochimique.

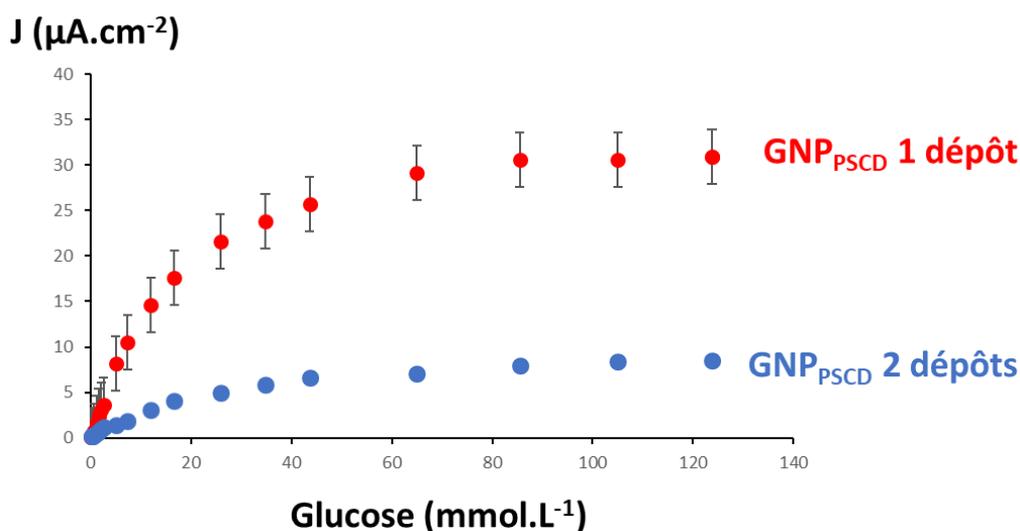


Figure 8 : Courbes d'étalonnage du glucose. Electrode modifiée par un dépôt $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}$ et par un dépôt alterné de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}/\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}$. Electrode Pt de 0,5 cm. incubation de 25 μL d'enzymes pendant 2h30 à température ambiante.

Tableau 2: Caractéristiques des biocapteurs obtenus avec les dépôts de GNP_{PSCD} incubés avec 25 μL de GOx. ^a pendant 7 h, $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$, ^b pendant 2h30, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Domaine de linéarité obtenu avec $R^2 = 0,999$.

Glyconanoparticules	Seuil de Détection mol.L^{-1}	Sensibilité $\text{mA.mol}^{-1}\text{L.cm}^{-2}$	Domaine de linéarité mol.L^{-1}	$J_{\text{max}} \mu\text{A.cm}^{-2}$
$\text{GNP}_{\text{PSCD}}^{\text{a}}$	$7,93 \cdot 10^{-5}$	1,32	$7,93 \cdot 10^{-5} - 2,89 \cdot 10^{-3}$	23 ± 4
$\text{GNP}_{\text{PSCD}}^{\text{b}}$	$7,43 \cdot 10^{-5}$	1,43	$7,43 \cdot 10^{-5} - 7,38 \cdot 10^{-3}$	27 ± 2

Concernant la configuration $\text{Pt}/\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}/\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}$, alternant les différentes couches la courbe d'étalonnage est représentée sur la Figure 8 en association avec celle de la configuration $\text{Pt}/\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{GOx}$. Dans ce cas, on peut noter une forte diminution de J_{max} qui passe de $27 \mu\text{A.cm}^{-2}$ à une valeur de $8 \mu\text{A.cm}^{-2}$. Ceci pourrait s'expliquer par une désorption

du matériau d'électrode entraînant ainsi une diminution de la quantité d'enzymes immobilisées. Pour vérifier cette dernière hypothèse, la stabilité des dépôts de glyconanoparticules sur l'électrode de platine a été étudiée dans le temps par spectroscopie RAMAN en milieu aqueux. Ainsi, deux dépôts successifs de 150 μL de PSCD sur une plaque de platine de 0,6 cm^2 sont effectués. Des images enregistrées sous lumière blanche des électrodes juste après séchage du dépôt de GNP_{PSCD} (Figure 9A) et après immersion dans une solution de tampon phosphate pendant plus de 12 h (Figure 9B) ont été réalisées. On peut noter sur la Figure 9B la présence sur toute l'électrode d'un nombre beaucoup plus important de zones claires par rapport à la Figure 9A, témoignant de l'absence de ces particules à ces endroits.

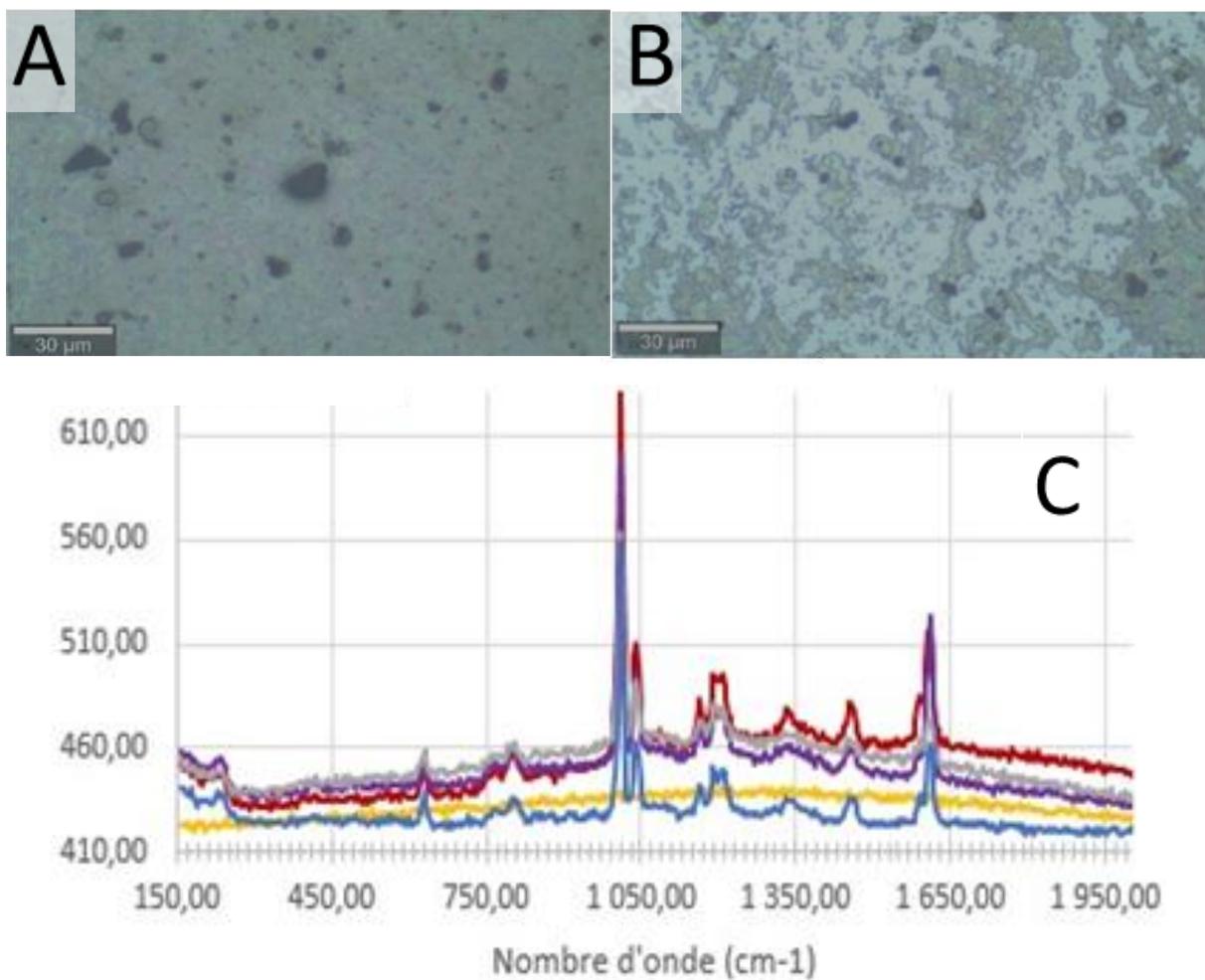


Figure 9 : Images réalisées au microscope sous lumière blanche de la plaque de platine nue recouverte de glyconanoparticules après séchage (A) et après immersion de plus de 12 h en solution aqueuse PBS (B) et spectres RAMAN associés (C).

Ces résultats sont corroborés par l'enregistrement des spectres RAMAN (Figure 9C) où aucune bande RAMAN n'est détectée sur les zones claires (représenté en jaune) attestant bien de l'absence de GNP_{PSCD} . En revanche, sur les zones plus foncées, les spectres RAMAN

(représentés en rouge, gris, violet, bleu) enregistrés, caractéristiques de GNP_{PSCD} , attestent bien de la présence des nano-objets sur la surface de Pt. En conclusion, la désorption de GNP_{PSCD} de la surface de l'électrode, pourrait être un des paramètres expliquant la diminution de J_{max} . Même si cette configuration ne permet pas d'augmenter les caractéristiques des capteurs, les résultats obtenus, notamment avec la conception de la première configuration d'électrode, démontrent la capacité des glyconanoparticules à base de cyclodextrines à être utilisées comme matériau d'ancrage d'enzymes.

III. Réalisation de biocathodes à base de glyconanoparticules

III.1. Introduction

Les enzymes utilisées dans cette sous-partie sont la laccase de *Trametes versicolor* (E.C.1.10.3.2) et la bilirubine oxidase de *Myrothecium verrucaria* (BOD) (EC 1.3.3.5) issues de champignons. Elles font partie des oxydases à centre cuivre multiples (Multicopper Oxidases, MCOs) et sont largement utilisées pour réaliser des biocathodes dans la conception de biopiles⁵⁻¹⁹. De par leurs propriétés catalytiques variées, elles sont également utilisées dans des applications industrielles diverses ou encore pour réaliser des biocapteurs. La bilirubine oxydase, dont le substrat naturel est la bilirubine, a d'ailleurs tout d'abord été utilisée pour réaliser des biocapteurs à bilirubine puis pour concevoir des biocathodes. La laccase et la bilirubine oxydase sont des enzymes qui possèdent des caractéristiques communes ; ce sont des enzymes avec des tailles relativement petites, à faible poids moléculaire possédant au moins 4 ions de cuivre (II) classés en 3 types, T1, T2 et T3 (Figure 10). Il est d'ailleurs établi que le centre de mononucléaire cuivre T1 est responsable du transfert d'électrons entre le substrat, ou la surface d'électrode, et le groupe trinuéaire où le dioxygène est réduit en eau.

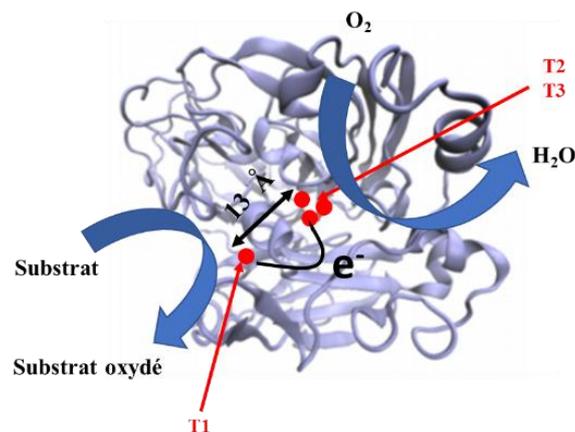


Figure 10 : Représentation des sites T1, T2, T3 de la BOD (non représentés à l'échelle par rapport à la structure de l'enzyme).

Le site T1 de la BOD proche de l'enveloppe protéique (de 5 à 8 Å), tout comme la laccase permet des transferts d'électron direct¹⁵. Différentes stratégies d'immobilisation de ces enzymes à la surface de l'électrode, permettant une meilleure orientation, sont reportées. En revanche, les méthodes d'immobilisation à l'électrode peuvent différer puisque la laccase possède une cavité hydrophobe à proximité du site T1, de dimension approximative 10 × 10 × 20 Å à contrario de la BOD, qui possède, quant à elle, une poche hydrophile. Ainsi, de nombreux exemples décrits dans la littérature permettent le DET de la laccase en utilisant des groupements hydrophobes tels que l'anthracène, l'anthraquinone ou encore le pyrène par exemple²⁰⁻²⁵. La BOD, qui est chargée positivement à pH acide ou neutre, en concevant des électrodes chargées négativement, peut interagir grâce à des interactions électrostatiques avec la surface et ainsi favoriser le transfert d'électrons. Dans la littérature, des groupements carboxylate, sulfonate sont reportés par exemple pour réaliser un DET efficace²⁶⁻²⁷.

C'est donc dans ce cadre que les sous-parties de ce chapitre s'inscrivent avec l'utilisation des glyconanoparticules fonctionnalisées pour orienter le site T1 de la laccase en premier lieu et la bilirubine oxydase dans un second temps, afin de favoriser le DET.

III.2. Biocathode à base de GNP_{PSCD}/AQ

Les performances des électrodes préparées par immobilisation des GNP_{PSCD}/AQ sur des électrodes recouvertes de nanotubes de carbone sont évaluées en tant que biocathode, pour orienter la laccase via des interactions hydrophobes entre la partie non insérée de AQ dans la cyclodextrine et la poche hydrophobe de la laccase.

Pour confectionner les bioélectrodes, 20 µL de solution de laccase sont déposés sur l'électrode modifiée MWCNT recouverte à 27 % de GNP_{PSCD}/AQ (concentration surfacique égale à 5.10⁻⁹ mol.cm⁻², d'après le chapitre II) et incubée pendant 12 h à 4 °C. Après rinçage pendant 10 minutes des bioélectrodes dans une solution de tampon phosphate à pH = 5, en changeant 1 fois la solution de rinçage, les propriétés électrocatalytiques de ces électrodes sont évaluées par voltampérométrie cyclique sous argon et en présence de dioxygène (Figure 11A, respectivement courbes a et b). Le bullage de O₂ pendant 10 minutes et pendant les expériences de voltampérométrie cyclique permettent d'obtenir une concentration saturée en dioxygène dans la solution d'étude. Les propriétés électrocatalytiques de ces électrodes de MWCNTs/GNP_{PSCD}/AQ sont comparées à celles obtenues pour des électrodes de même surface recouvertes de nanotubes de carbone sur lesquelles ont été adsorbées la même quantité d'enzyme après dégazage des solutions (Figure 11B, courbe a) et par barbotage de O₂ dans la solution (Figure 11B, courbe b).

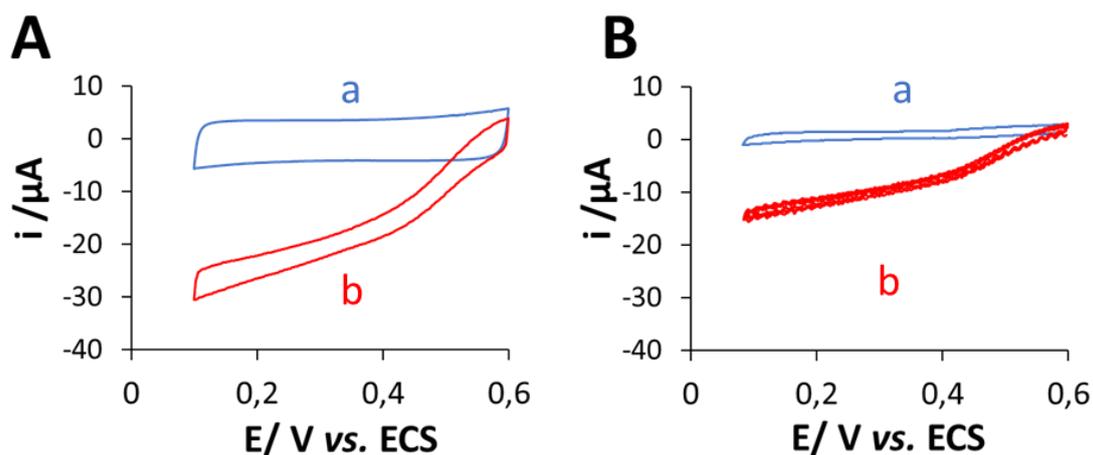


Figure 11 : Electrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNTs fonctionnalisées avec $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ et la laccase (A) et de MWCNTs recouverts de laccase (B) sous atmosphère saturée en argon (a-courbe représentée en bleu) et sous atmosphère saturée en dioxygène (b-courbe représentée en rouge). Conditions : Solution de tampon phosphate pH = 5 dans TP ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5), $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Comme on peut le constater, les courbes de voltampérométrie cyclique débutent au potentiel d'abandon de $0,6 \text{ V vs. ECS}$, valeur proche du potentiel estimé pour le centre T1 de l'enzyme puisqu'il est établi que le potentiel du cuivre T1 varie entre 430 et 780 mV vs. ESH ¹⁵. Cette observation permet de démontrer que l'enzyme est connectée électriquement à l'électrode via son site actif T1 pour les deux configurations d'électrodes. En revanche, en présence de dioxygène, à $0,1 \text{ V vs. ECS}$ la valeur du courant mesuré (Figure 11A, courbe b) de $25 \pm 5 \mu\text{A}$ est beaucoup plus importante que celle mesurée sur les électrodes témoins de $13 \pm 2 \mu\text{A}$ (Figure 11B, courbe b) dans les mêmes conditions expérimentales. Il est à noter que les essais ont été réalisés avec 2 électrodes, la valeur du courant mesuré étant la moyenne des valeurs obtenues avec les deux électrodes différentes. La multiplication par un facteur de 2 de la valeur du courant catalytique en présence de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$ atteste d'une meilleure orientation de l'enzyme, favorisant ainsi le transfert direct d'électron de l'enzyme, bien que cette valeur de courant reste inférieure à celle reportée dans la littérature¹⁵. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les enzymes immobilisées ne soient pas toutes disponibles pour effectuer un transfert d'électron à l'électrode de par leur éloignement à l'électrode. Pour améliorer les valeurs de courants, il serait intéressant d'utiliser un médiateur rédox tel que ABTS, qui permettrait de connecter les enzymes « éloignées de la surface de l'électrode ».

Les propriétés électrocatalytiques d'électrodes de nanotubes recouvertes de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQ}$, conservées pendant un an à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ont été également évaluées puisque par CV, le signal électrochimique est conservé avec seulement une perte de 12% (Figure 12, courbes a et b).

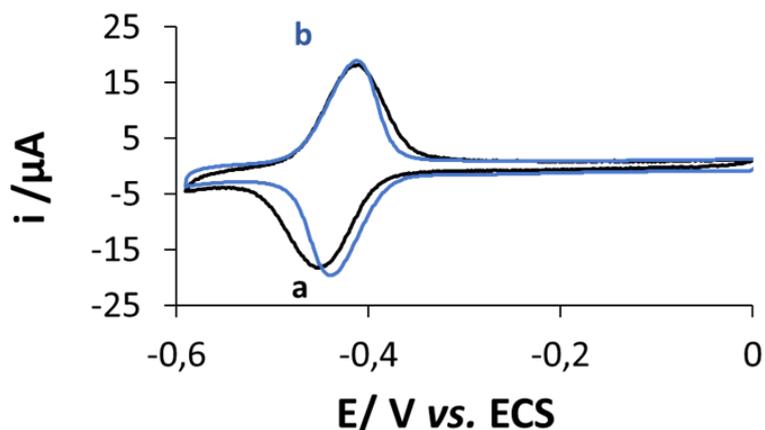


Figure 12 : Courbes de voltampérométrie cyclique réalisées dans une solution de tampon phosphate pH = 5 des électrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNTs fonctionnalisées avec la laccase sous atmosphère saturée en argon (a) juste avant le dépôt et (b) un an après.

Comme l'atteste la Figure 13A, en présence de O_2 , un courant catalytique de réduction de O_2 de $-30 \mu A$ est mesuré à $0,1 V$, la valeur étant proche de celle mesurée avec des électrodes MWCNT/ GNP_{PSCD}/AQ fraîchement préparées. Afin de savoir si la morphologie des GNPs était conservée sur ces électrodes stockées un an à $4^\circ C$, l'électrode MWCNT/ GNP_{PSCD}/AQ avec la laccase immobilisée a été analysée par MEB en utilisant une chambre d'analyse adaptée permettant l'analyse directe des dépôts des électrodes de carbone ainsi modifiées sur le plateau MIEL de l'ICMG. Les clichés MEB enregistrés (Figure 13B) attestent, comme attendu de la présence d'un réseau de nanotubes de carbone recouvert par un film assez hétérogène. Il est à noter qu'il est difficile d'observer la forme sphérique des glyconanoparticules de façon uniforme, du fait de la présence de la laccase recouvrant le film de glyconanoparticules. Il aurait été intéressant de réaliser les mêmes images en l'absence d'enzymes pour mieux visualiser la forme sphérique des glyconanoparticules après un an de stockage à sec. Ayant maintenant la possibilité d'effectuer des images MEB des électrodes de carbone avec un corps d'électrode de quelques centimètres, les analyses seront facilitées et permettront dans le futur d'obtenir des clichés des électrodes utilisées en électrochimie car jusqu'à présent au laboratoire nous réalisons les dépôts sur des disques de carbone de 5 mm de diamètre.

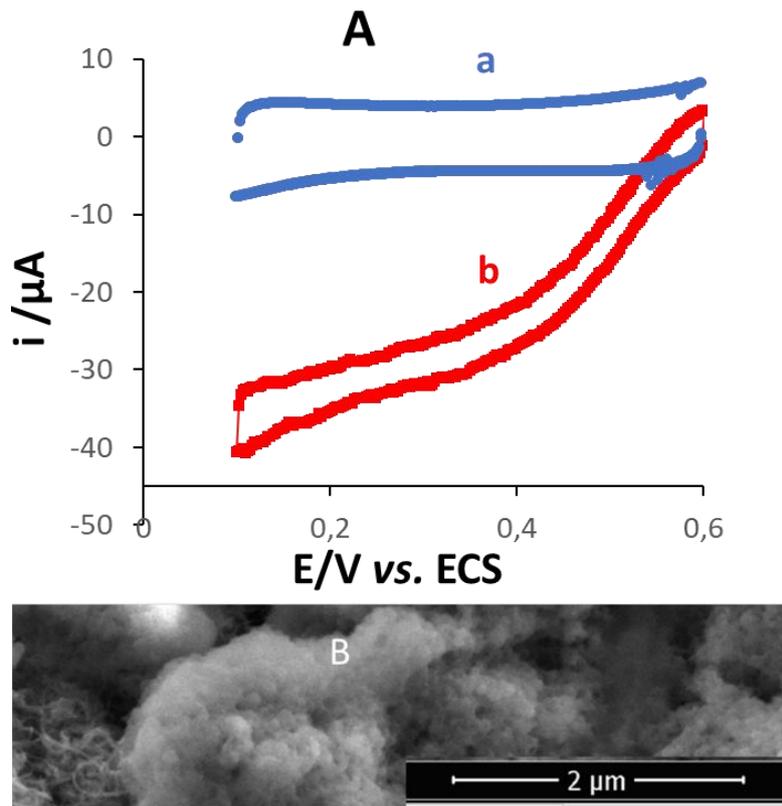


Figure 13 : (A) Electrodes de carbone vitreux couvertes de MWCNTs fonctionnalisées avec $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQ}}$ et la laccase sous atmosphère saturée en argon (a-courbe représentée en bleu) et sous atmosphère saturée en dioxygène (b-courbe représentée en rouge). (B) Cliché MEB. Conditions : Solution de tampon phosphate $\text{pH} = 5$ dans TP ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 5$), $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, électrode conservée pendant 1 an.

III.3. Biocathode à base de $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQS}}$

La capacité des glyconanoparticules $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQS}}$ à orienter la BOD a été explorée dans cette partie en utilisant les groupements chargés sulfonate de l'anthraquinone par interaction électrostatique. Pour cela, les électrodes de nanotubes de carbone recouvertes de 39 % de $\text{GNP}_{\text{PSCD/AQS}}$ ($\Gamma = 8.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$) ont été incubées à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant une nuit avec $25 \text{ } \mu\text{L}$ de BOD (5 mg.mL^{-1}) puis rincées pendant 10 minutes dans une solution de tampon phosphate $\text{pH} = 7$. Les bioélectrodes ont été ensuite caractérisées successivement par CV dans une solution saturée en argon (Figure 14A, courbe a) et en présence de dioxygène (Figure 14A, courbe b). En parallèle, des mesures de chronoampérométrie ont également été effectuées dans le même milieu d'étude à un potentiel imposé de $0,1 \text{ V}$ avec désaération de la solution pendant plus de 15 minutes et enregistrement du courant pendant 400 secondes sous N_2 puis sous bullage de O_2 de 400 secondes à 1000 secondes (Figure 14B). On peut noter que le potentiel d'abandon mesuré de $0,5 \text{ V}$ est un peu plus faible que celui mesuré avec la laccase, ce qui est en accord avec la littérature²⁸. Des courants catalytiques de $165 \pm 30 \text{ } \mu\text{A}$ pour les CV et de $140 \text{ } \mu\text{A} \pm 10 \text{ } \mu\text{A}$ pour les chronoampérométries sont mesurés. Les valeurs de

courant associées à leurs incertitudes résultent de la moyenne de 3 essais réalisés avec 3 électrodes différentes.

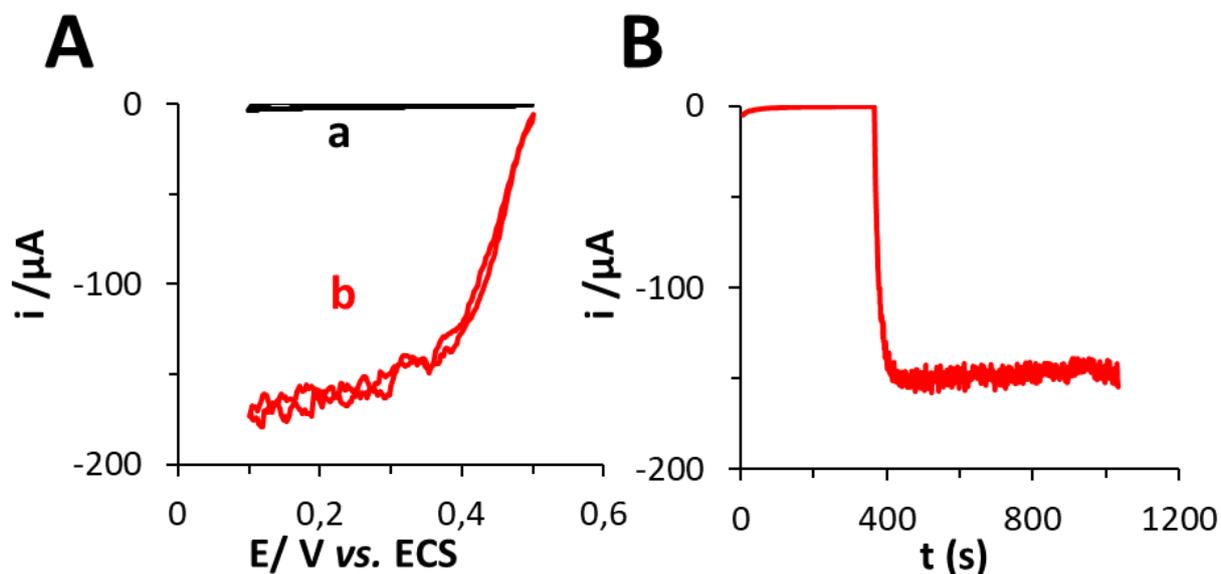


Figure 14 : (A) Courbes de voltampérométrie cyclique sur électrode de carbone vitreux couvertes de MWCNTs fonctionnalisées avec $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$ et la bilirubine oxydase, sous atmosphère saturée en argon (a-courbe représentée en noir) et sous atmosphère saturée en dioxygène (b-courbe représentée en rouge). Courbe de chronoampérométrie réalisée à 0,1 V vs. ECS (B) sous atmosphère saturée en argon jusqu'à 400 secondes puis bullage de O_2 après ces 400 secondes. **Conditions :** $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, solution de tampon phosphate $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$. ($\Gamma = 8.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$).

Les courants ont été comparés à ceux mesurés sur électrodes de MWCNTs incubées de manière identique avec la BOD (Figure 15B, courbe a) et avec les électrodes recouvertes par la même quantité de glyconanoparticules GNP_{PSCD} non modifiées par l'antraquinone sulfonate (Figure 15B, courbe b). Comme l'attestent les différents voltampérogrammes tracés, le courant catalytique le plus élevé est obtenu avec la configuration d'électrode recouverte par les glyconanoparticules $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$ avec une valeur de courant de $165 \mu\text{A}$ à $0,1 \text{ V vs. ECS}$ par comparaison à des valeurs faibles de courant pour les 2 autres configurations d'électrode respectivement de $-10 \mu\text{A}$ et de $-5 \mu\text{A}$ pour les configurations MWCNT/BOD et MWCNT/ $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{BOD}$, attestant de l'importance du groupement sulfonate, comme déjà rapporté dans la littérature ²⁶, pour orienter l'enzyme. Afin de montrer l'utilité de la géométrie tridimensionnelle des glyconanoparticules, les expériences de catalyse ont été réalisées avec des électrodes recouvertes de nanotubes de carbone et d'antraquinone sulfonate avec un même recouvrement surfacique ($\Gamma = 9.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$). Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales (dépôt de $25 \mu\text{L}$ de BOD durant une nuit). Après rinçage, le courant de catalyse mesuré à $0,1 \text{ V}$ dans les mêmes conditions expérimentales d'une valeur de $-25 \mu\text{A}$ est beaucoup plus faible que celui obtenu avec la configuration d'électrode avec le dépôt de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$. Ces résultats montrent donc bien l'intérêt de la

structure tridimensionnelle de $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$ par rapport à l'utilisation de AQS qui aurait une conformation moins adaptée pour former des liaisons électrostatiques avec les groupements sulfonate, une fois immobilisé sur nanotubes de carbone.

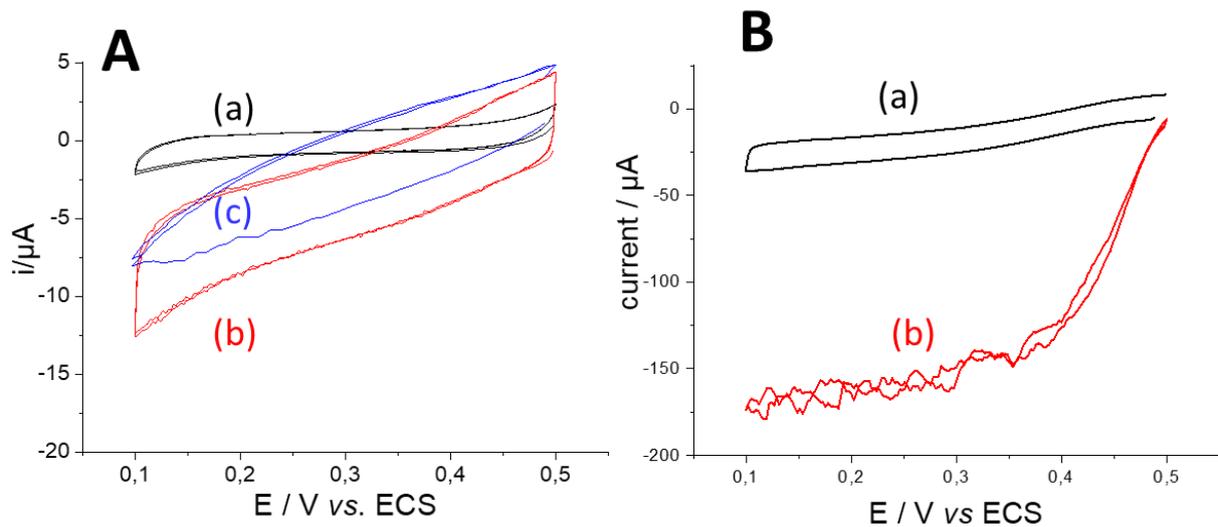


Figure 15 : (A) Courbes de voltampérométrie cyclique sur électrode de carbone vitreux fonctionnalisées avec MWCNTs/ BOD sous N_2 (a-courbe représentée en noir) et sous O_2 (b-courbe représentée en rouge) et MWCNTs/ $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{BOD}$ sous O_2 (courbe c-représenté en bleu). (B) Courbes de voltampérométrie cyclique sous O_2 sur électrode de carbone vitreux fonctionnalisées avec MWCNTs/AQS/BOD (a-courbe noire) et MWCNTs/ $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}/\text{BOD}$ (b-courbe rouge). **Conditions :** $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, solution de tampon phosphate $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les courants mesurés avec $\text{GNP}_{\text{PSCD}}/\text{AQS}$ pourraient être augmentés en optimisant la concentration surfacique et en rajoutant ABTS en solution de façon à connecter à l'électrode les enzymes éloignées de l'électrode via un transfert électronique médié.

IV. Conclusion-Perspectives

Dans ce chapitre, les glyconanoparticules GNP_{PSCD} , GNP_{PSMH} , $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$ ont été utilisées avec succès pour la première fois comme matériaux d'ancrage d'enzyme, la glucose oxydase ayant été choisie comme modèle. En réalisant deux configurations d'électrode différentes nous avons pu démontrer que la configuration la plus performante est celle obtenue avec une couche de GNPs et de glucose oxydase avec des valeurs de J_{max} de $27 \mu\text{A.cm}^{-2}$, une sensibilité de $1,43 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ et une limite de détection de $7,43.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Pour augmenter les performances du biocapteur ainsi conçu, nous proposons de réaliser des dépôts en réalisant une meilleure accroche des glyconanoparticules à la surface des électrodes en réalisant par exemple des dépôts homogènes de nanotubes de carbone recouverts de pyrène adamantane qui servira de matériau d'ancrage des glyconanoparticules via des interactions d'inclusion

adamantane/cyclodextrine. Des couches successives de glyconanoparticules et d'enzymes seront également réalisées.

De plus, dans ce chapitre, les glyconanoparticules modifiées par des groupements anthraquinone et anthraquinone sulfonate ont été mises à profit pour orienter le site T1 respectivement de la laccase et de la bilirubine oxydase. Les valeurs obtenues par rapport aux électrodes témoins montrent l'intérêt d'utiliser la structure tridimensionnelle des glyconanoparticules.

Références

1. Chen, G. & Jiang, M. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2254 (2011).
2. PrévotEAU A., Courjean. O, Mano N., *Electrochem. Commun.* **12**, 213 (2010).
3. Wong C.M., Wong.K.H., Chen, X.D. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **78**, 927 (2008).
4. Holzinger M., Bouffier L., Villalonga R., Cosnier S. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1128 (2009).
5. Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, S. *Electrochimica Acta* **82**, 179 (2012).
6. Le Goff, A., Holzinger, M. & Cosnier, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 941 (2015).
7. Habrioux, A., Servat, K., Tingry, S., Kokoh, K. B., *Electrochem. Commun.* **11**, 111 (2009).
8. Ciaccafava, A., De Poulpiquet, A., Techer, V., Giudici-Ortoni, M. T., Tingry, S., Innocent, C., Lojou, E. *Electrochem. Commun.* **23**, 25 (2012).
9. Lee, J. Y. Y., Elouarzaki K. , Sabharwal H. S., Fisher A. C., Lee J.-M., *Catal. Sci. Technol.* **10**, 6235 (2020).
10. Huang, X. *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* **124**, 40 (2019).
11. Pankratov, D. V. *et al. Electroanalysis* **25**, 1143 (2013).
12. Cosnier, S., J. Gross, A., Le Goff, A. & Holzinger. *J. Power Sources* **325**, 252 (2016).
13. Gentil, S. *et al.*. *Chem. - Eur. J.* **24**, 8404–8408 (2018).
14. Lalaoui, N., Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, *Chem. - Eur. J.* **22**, 10494 (2016).
15. N. Mano, A. de Poulpiquet, *Chem Rev.* **118**, 2392 (2018).
16. Xiao X., Xia H.-Q., Wu R., Bai L., Yan L., Magner E., Cosnier S., Lojou E., Zhu Z., Liu A. *Chem. Rev.* **119**, 9509 (2019).
17. Mano, N.; Edembe, L. *Biosens. Bioelectron.* **50**, 478–485 (2013).
18. Le T. X. H., Flaud V., Bechelany M., Cretin M., S. Tingry. *Electrochim. Acta* **230**, 373 (2017).
19. Bourourou, M., Elouarzaki, K.; Lalaoui, N., Agnès, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Maaref, A., Cosnier, S. *Chem. - Eur. J.* **19**, 9371(2013).
20. Blanford, C. F., Heath, R. S., Armstrong, F. A. *Chem. Commun.*, 1710 (2007).
21. M. T. Meredith, M. Minson; D. Hickey; K. Artyushkova; D. T. Glatzhofer; S. D.Minteer. *ACS Catal.* **1**, 1683 (2011).
22. K. Stolarczyk, M. Sepelowska, D. Lyp, K. Z'elechowska, J. F. Biernat, J. Rogalski, K. D. Farmer, K. N. Roberts, R. Bilewicz. *Bioelectrochemistry* **87**, 154 (2012).
23. Lalaoui, N.; David, R.; Jamet, H.; Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *ACS Catal.* **6**, 4259 (2016).
24. M. Sosna; L. Stoica; E. Wright; J. D. Kilburn; W. Schuhmann; P. N.Bartlett. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 11882 (2012).

25. M. Bourourou, K. Elouarzaki, N. Lalaoui, C. Agnes, A. Le Goff, M. Holzinger, A. Maaref, S. Cosnier, *Chem. Eur. J.* **19**, 9371 (2013).
26. Ogawa Y., Yoshino S., Miyake T., Nishizawa M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 13059 (2014).
27. Jönsson-Niedziolka M., Kaminska A., Opallo M. *Electrochim. Acta* **55**, 8744–8750 (2010).
28. Chritenson, A., Shleev, S., Mano N., Heller N., Gorton L. *Biochimica Biophysica Acta-Bioenergetics* **1757**, 1634 (2006).

Conclusion Générale - Perspectives

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé conjointement au Département de Chimie Moléculaire (DCM) et au Centre de Recherches sur les MACromolécules Végétales (CERMAV) avec pour objectif de concevoir des glyconanoparticules rédox, de les caractériser par différentes méthodes physico-chimiques et électrochimique et de les utiliser en bioélectrochimie.

Après un chapitre de synthèse bibliographique sur les différents domaines abordés dans la thèse ainsi que sur la description de quelques méthodes de caractérisation de nano-objets, les chapitres II à V ont été consacrés à la présentation des résultats expérimentaux obtenus.

Le chapitre II a été dédié à la conception de glyconanoparticules (GNPs) rédox obtenues par précipitation du copolymère amphiphile le polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine (PSCD) en présence d'anthraquinone. Cette méthode de pré-fonctionnalisation, qui consiste à mélanger le copolymère avec l'espèce rédox, a permis d'obtenir des glyconanoparticules de taille nanométrique. La taille ainsi que la morphologie sphérique des glyconanoparticules a pu être mise en évidence par différentes techniques telles que la DLS, le MEB et le MET. Les propriétés électrochimiques de ces glyconanoparticules ainsi fonctionnalisées en solution ont été étudiées en détail. De plus, leur immobilisation sur électrode de carbone et de carbone recouvert de nanotubes a permis la conservation des propriétés électrochimiques en solution de ces nano-objets et ainsi de développer de nouveaux matériaux d'électrode.

Le chapitre III a été consacré à la préparation de glyconanoparticules originales obtenues à partir d'un mélange de deux copolymères : le polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine (PSCD) et le polystyrène-*bloc*- β -maltoheptaose (PSMH) dans différentes proportions, permettant ainsi d'obtenir des glyconanoparticules avec un nombre différent de cyclodextrines en surface. Afin de mettre en évidence les propriétés d'inclusion des nanoparticules obtenues, leur fonctionnalisation a été réalisée en milieu aqueux avec l'anthraquinone sulfonate. Les études électrochimiques réalisées mettent en évidence le succès de la formation de l'interaction hôte-invité avec des signaux électrochimiques différents en fonction de la nanoparticule étudiée. Une caractérisation de la taille a été effectuée avant et après fonctionnalisation en utilisant différentes méthodes d'analyse. La méthode de fonctionnalisation dans ce chapitre est versatile et pourrait être utilisée ultérieurement pour fonctionnaliser les glyconanoparticules dans des conditions plus douces en remplaçant l'usage des ultrasons par une agitation à plus basse température par exemple.

Le chapitre IV a été dédié à la formation de glyconanoparticules à base de viologène en utilisant deux composés substitués par une chaîne alkyle comportant à son extrémité un groupement pyrène ou adamantane. Avant de présenter les différentes stratégies d'auto-assemblage des glyconanoparticules, une étude détaillée en solution de ces espèces a été

réalisée en milieu organique et aqueux mettant en évidence, par voltampérométrie cyclique et par électrolyses exhaustives pour le composé adamantane-viologène, les différents degrés d'oxydation de la fonction viologène. La présence du groupement pyrène a également permis l'obtention d'électrodes modifiées sur carbone par électropolymérisation ou en utilisant les interactions de « π -stacking » entre les groupements pyrène et les parois des nanotubes de carbone. Différents essais ont été réalisés pour concevoir les glyconanoparticules à base de viologène et les tests les plus concluants ont été obtenus avec le pyrène-viologène. Avec le temps imparti pour réaliser la thèse, les caractérisations complémentaires devront être réalisées pour clore cette étude.

Le dernier chapitre est consacré à l'utilisation de glyconanoparticules conçues et caractérisées dans les chapitres II et III pour réaliser des biocapteurs et des biocathodes. La glucose oxydase a été choisie comme modèle pour la conception des biocapteurs. Différentes configurations à base de mélanges de glyconanoparticules ont été testées vis à vis de l'oxydation du glucose et les meilleures caractéristiques ont été obtenues avec un simple dépôt sur électrode de platine de glyconanoparticules à base de cyclodextrine. Les autres configurations offrent un J_{\max} plus faible et des seuils de détection moins sensibles. Les résultats obtenus démontrent les capacités des glyconanoparticules à être utilisées comme matériaux d'ancrage d'enzyme. La principale faiblesse de ces matériaux reste la stabilité dans le temps en milieu aqueux qui peut être contournée en réalisant au préalable un dépôt permettant l'ancrage des glyconanoparticules. Ces expériences sont en cours au laboratoire. De plus, dans ce chapitre, les glyconanoparticules à base d'anthraquinone et d'anthraquinone sulfonate ont été utilisées pour réaliser des biocathodes enzymatiques à base de laccase et de bilirubine oxydase pour la réduction électrocatalytique du dioxygène. Il serait intéressant par la suite d'optimiser les configurations décrites en changeant par exemple la concentration surfacique des glyconanoparticules et de réaliser les mêmes études en présence de médiateurs rédox.

Experimental section

Content

I. Synthesis and characterizations of block copolymers.....	179
I.1. Material	179
I.1.1. Reagents	179
I.1.2. Solvents.....	179
I.1.4. characterizations	180
I.2. Synthesis of hydroxyl-terminated polystyrene (PS-OH)	180
I.3. Synthesis of Azido-Functionalized polystyrene (PS-N ₃).....	180
I.4. Synthesis of Polystyrene- <i>block</i> -Maltoheptaose (PSMH) block copolymer.....	181
I.5. Synthesis of Polystyrene- <i>block</i> - β -cyclodextrin (PSCD) block copolymer.....	181
II. Synthesis and characterizations of viologen derivatives	182
II.1. Material.....	182
II.2. Synthesis of adamantane-viologen	182
II.2.1. Synthesis of 1-iodo-2-(1-adamantyl)ethane	182
II.2.2. Synthesis of 1-(2-(1-adamantyl)ethyl)-4,4'-bipyridinium iodide.....	183
II.2.3. Synthesis of 1-(2-(1-adamantyl)ethyl)-1'-methyl-4,4'-bipyridinium diiodide	183
II.3. Synthesis of pyrene-viologen	184
III. Synthesis and characterizations of adamantane modified Glucose oxidase (GOx-Ad)	185
III.1. Materials.....	185
III.2. Synthesis.....	185
IV. Self-assembly of block copolymers to make glyconanoparticles and their characterizations.....	186
IV.1. Reagents	186
IV.2. Materials.....	186
IV.3. Methods.....	186
IV.3.1. Copolymers self-assembly to make glyconanoparticles (GNPs).....	186
IV.3.2. Functionalization of glyconanoparticles with anthraquinone (AQ) and anthraquinone sulfonate (AQS).....	187
IV.3.3. Functionalization of glyconanoparticles with viologen derivatives	187
IV.3.4. Dialysis.....	187
	177

IV.4. Characterizations	188
IV.4.1. UV-visible microscopy	188
IV.4.2. Dynamic and static light scattering (DLS and SLS)	188
IV.4.3. Nanoparticle tracking analysis (NTA)	188
IV.4.4. Scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM)	188
V. Electrochemical measurements	189
V.1. Reagents	189
V.2. Materials	190
V.3. Methods	191
V.3.1. Cyclic Voltammetry	191
V.3.2. Chronoamperometry	193
References	194

I. Synthesis and characterizations of block copolymers

The synthesis of polystyrene-block- β -cyclodextrin (PSCD) block copolymers were first carried out by Prof. Toyoji Kakuchi (Hokkaido University) ¹ using ATRP. Other strategy were used very recently in the group of Dr. Redouane Borsali “Self-Assembly of Glycopolymers – Centre de Recherche sur les MACromolécules Végétales” (PCG - CERMAV) to synthesis carbohydrate-block copolymer systems involving β -cyclodextrin (CD) and maltoheptaose (MH) using “click chemistry”. Regarding this specific PhD project, Dr. Muhammad Mumtaz has synthesized both blocks PSCD and PSMH. Below are the details about the synthesis which has already been used ^{2,3}.

I.1. Material

I.1.1. Reagents

Sigma Aldrich: *p*-toluenesulfonyl chloride (*regentPlus*, $\geq 99\%$), NaN_3 (*regentPlus*, $\geq 99.5\%$), trimethylamine (TEA, 99%), 1,4-dioxane (anhydrous, 99.8%), calcium hydride (CaH_2 , 95%), magnesium sulfate (anhydrous, *regentPlus*, $\geq 99.5\%$), ethylene oxide solution (2.5-3.3 mol L⁻¹ in THF), di-*n*-butylmagnesium solution (1.0 mol L⁻¹ in heptane), *sec*-butyllithium solution (1.4 mol L⁻¹ in cyclohexane), styrene (*ReagentPlus*, $\geq 99\%$).

Hayashibara Company: Maltoheptaose (MH).

Cyclolab: 6-Mono-O-(*p*-toluenesulfonyl)- β -cyclodextrin.

Alfa Aesar: Cu/CuO nanopowder (CuNP, 20-50 nm, 99.9 % metal basis).

I.1.2. Solvents

Fisher scientific: N,N-Dimethylformamide (DMF).

Biosolve: Toluene, CH_2Cl_2 (CP) stabilized by amylene, pyridine (extra dry), tetrahydrofuran (THF), absolute methanol, absolute ethanol.

Eurisotop: deuterated solvents.

Prior to use, solvents were distilled: toluene over CaH_2 and over polystyryllithium, styrene over CaH_2 and over di-*n*-dibutylmagnesium, CH_2Cl_2 (CP) stabilized by amylene and pyridine (extra dry) over CaH_2 at 35 °C. MH and 6-Mono-O-(*p*-toluenesulfonyl)- β -cyclodextrin were functionalized with alkynyl moiety as previously described in the literature ^{4,5}. A

Millipore Ultrapure system was used to purify water to obtain Milli-Q water (resistivity of 18.2 MΩ cm).

1.1.4. characterizations

NMR: A Bruker Avance 400 MHz spectrometer (frequency = 400.13 MHz) was used to record ^1H NMR spectra of polymer samples. The latter was calibrated with the signal of deuterated solvent.

SEC: The size exclusion chromatography (SEC) was performed using an Agilent390 MDS system (290 LC pump injector, ProStar 510 column oven, 390 MDS refractive index detector) equipped with Knauer Smartline UV detector 2500 and two Agilent Poly Pore PL1113–6500 columns (linear, 7.5×300 mm; particle size, 5 μm ; exclusion limit, 200–2000000) in DMF containing lithium chloride (0.01 mol L^{-1}) at the flow rate of 1.0 mL min^{-1} , at $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.2. Synthesis of hydroxyl-terminated polystyrene (PS-OH)

Anionic polymerization of styrene was used to prepare hydroxyl-terminated polystyrene and ethylene oxide was used for the termination.

Initiation of the polymerization: Introduction of sec-butyllithium ($\sim 1.4 \text{ mol L}^{-1}$ in cyclohexane, 10 mmol L^{-1} , 7.14 mL) in toluene (300 mL) containing styrene (40 g, 44.15 mL) under argon and with magnetic stirring.

Polymerization: An oil bath preheated at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 h was used for reaction.

Termination: Addition of ethylene oxide (5.0 mL, $\sim 3 \text{ mol L}^{-1}$ solution in THF) in the reaction mixture with degassed methanol in excess.

Finally, the solvent was eliminated under vacuum using rotary evaporator at $40 \text{ }^\circ\text{C}$. The polymer was resolubilised in appropriate amount of THF and precipitated twice in methanol (1 L). The precipitate of PS-OH was filtered through sintered glass funnel under vacuum and dried in a vacuum oven at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight, producing 39 g of solid, or 95 % yield.

Characterization: ^1H NMR ($M_n \sim 4500 \text{ g mol}^{-1}$), SEC ($M_n = 3800 \text{ g mol}^{-1}$).

1.3. Synthesis of Azido-Functionalized polystyrene (PS-N₃)

Two steps were required to prepare azido-functionalized polystyrene. In the first step, trimethylamine (9.3 mL, 66.7 mmol L^{-1}) was added after having dissolved polystyrene (10.00 g, 2.22 mmol L^{-1} , $M_n = 4500 \text{ g mol}^{-1}$) in dried dichloromethane (100 mL) under stirring. The

flask was immersed in an ice bath to cool down the reaction temperature to 0 °C. Finally, *p*-toluenesulfonyl chloride (4.24 g, 22.2 mmol L⁻¹) was adjoined in small amounts under argon flow. The system was left to warm up slowly to r.t. and the reaction mixture was left to react overnight under stirring. CH₂Cl₂ (100 mL) was added to the reaction mixture and the latter was transferred into separating funnel to remove residual salts by extraction with water. The organic part was then dried with MgSO₄ and the solvent was removed using a rotary evaporator. After having redissolve the ω -tosyl-terminated polystyrene (PS-OTs) in THF, the polymer was precipitated twice in methanol (500 mL). The precipitate was filtered using sintered glass funnel under vacuum and dried in a vacuum oven at 40 °C overnight, giving 9.3 g of solid product, or 90 % yield.

In the second step, PS-OTs (9 g, 1.94 mmol L⁻¹) was dissolved in DMF (60 mL) under stirring. NaN₃ (2.50 g, 38.7 mmol L⁻¹) was added in the mixture and was heated at 60°C overnight. The reaction was then left to cool down to r.t., CH₂Cl₂ (200 mL) was added and transferred into separating funnel. In order to remove residual tosylate salt, excess of NaN₃ and DMF, the solution was repeatedly washed with water. After having dried the organic part using anhydrous MgSO₄, CH₂Cl₂ was eliminated using rotary evaporator. Azido terminated polystyrene was redissolved in THF, precipitated in methanol (500 mL), and using sintered glass funnel under vacuum and dried in a vacuum oven at 40 °C overnight. 8.0 g of solid were produced, or ~ 89 % yield.

I.4. Synthesis of Polystyrene-*block*-Maltoheptaose (PSMH) block copolymer

Click chemistry was performed to prepare polystyrene-*b*-maltoheptaose, with ω -azido polystyrene (1 eq, 6.0 g, ~1.33 mmol L⁻¹) and propargyl-maltoheptaose (1.2 eq, 2.0 g, 1.6 mmol L⁻¹) in DMF (40 mL), using copper nanopowder (2 eq vs. acetylene group, 205 mg, 3.20 mmol L⁻¹) as catalyst, at 65 °C for 72 h. 6.5 g of solid were produced, ~85 % yield, and was characterized by ¹H NMR (M_n ~5700 g mol⁻¹) and SEC (M_n = 13750 g mol⁻¹, \bar{D} = 1.06).

I.5. Synthesis of Polystyrene-*block*- β -cyclodextrin (PSCD) block copolymer

PSCD was also synthesized by click chemistry, with azido functionalized polystyrene (1 eq, 4 g, 0.89 mmol L⁻¹) and mono-6-N-propargylamino-6-deoxy- β -cyclodextrin (1.2 eq, 1.25 g, 1.07 mmol L⁻¹) in presence of copper nanopowder (2 eq vs. alkynyl group, 136 mg, 2.13 mmol L⁻¹) in DMF (30 mL) at 65 °C for 72 h. 4.5 mg of solid were produced, ~85 % yield.

The resulting copolymer was characterized by ^1H NMR ($M_n \sim 5700 \text{ g mol}^{-1}$) and SEC ($M_n = 7820 \text{ g mol}^{-1}$, $\text{Đ} = 1.06$).

II. Synthesis and characterizations of viologen derivatives

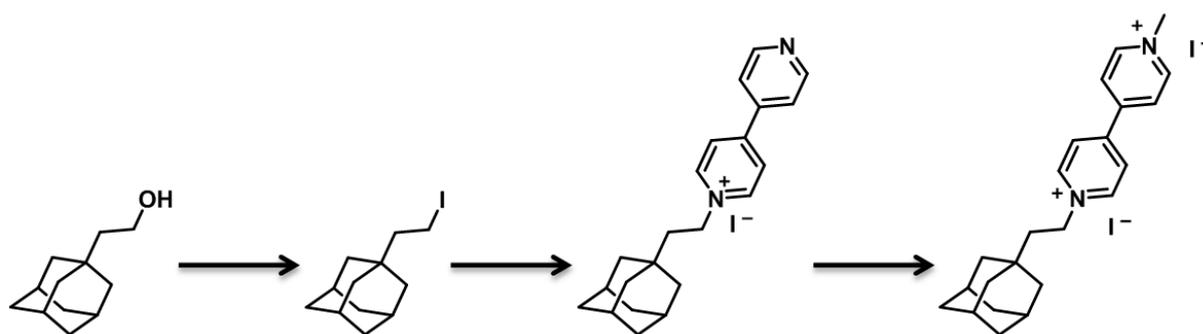
Viologen derivatives were synthesized and characterized by the team Synthèse et réactivité en Chimie Organique (SeRCO), Plateau Synthèse Organique (PSO) at the Département de Chimie Moléculaire de Grenoble (DCM). The replacement of hydroxyl moiety by viologen has been realized based on the synthesis previously described by Park *et. al.* ⁶.

II.1. Material

Microwave heating was performed using monomode CEM Discover® device.

II.2. Synthesis of adamantane-viologen

The synthesis route of the adamantane viologen (Ad-V²⁺) is depicted in Scheme 1.



Scheme 1: Synthesis route for the production of Ad-V²⁺.

II.2.1. Synthesis of 1-iodo-2-(1-adamantyl)ethane

Iodine (1.06 g, 4.16 mmol) was added in a triphenylphosphine (1.09 g, 4.16 mmol) in CH_2Cl_2 (25 mL) solution, under stirring at r.t. After 10 min, imidazole (472 mg, 6.93 mmol) was added under stirring and left for 5 min. 2-(1-adamantyl)ethanol (500 mg, 2.77 mmol) was then adjoined to the mixture. After 30 min, the total disappearance of alcohol was confirmed by thin-layer chromatography (TLC, pentane/EtOAc 8/2, $R_f = 0.25$). The reaction mixture was then filtered, and the filtrate was washed with HCl (1 mol L^{-1} in water) and with brine, dried using MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The product was dissolved in 50 mL of pentane and finally filtered through a pad of Celite to produce pure 1-iodo-2-(1-adamantyl)ethane (760 mg, 95 % yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.23 – 3.11 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.84 – 1.74 (m, 2H), 1.70 (d, *J* = 12.2 Hz, 3H), 1.62 (d, *J* = 11.9 Hz, 3H), 1.50 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 50.00, 41.96, 37.13, 35.48, 28.64, 1.20.

II.2.2. Synthesis of 1-(2-(1-adamantyl)ethyl)-4,4'-bipyridinium iodide

In a 30 mL microwave vial with magnetic stirring, 1-iodo-2-(1-adamantyl)ethane (760 mg, 2.62 mmol) and 4,4'-bipyridine (excess, 1.227 g, 7.26 mmol) were mixed in dry MeCN (8 mL). A monomode microwave oven was used to heat the preparation at 130 °C for 1 h. MeCN was evaporated under reduced pressure and the product was dissolved in toluene (50 mL). The solution was then heated to reflux, then cooled down to r.t. and filtered. The resulting solid was dissolved in isopropanol (80 mL), heated to reflux, cooled down to r.t. and filtered. The operation was repeated once with 50 mL of isopropanol. The filtrate was concentrated under reduced pressure, and 1.130 g (< 96 % yield) of 1-(2-(1-adamantyl)ethyl)-4,4'-bipyridinium iodide was produced and used as prepared for the next step.

¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 10.75 – 10.64 (m, 2H), 10.43 – 10.35 (m, *J* = 4.6, 1.7 Hz, 2H), 10.11 – 10.02 (m, 2H), 9.58 – 9.52 (m, *J* = 4.6, 1.7 Hz, 2H), 6.33 – 6.24 (m, 2H), 3.63 – 3.53 (m, 3H), 3.47 – 3.38 (m, 2H), 3.38 – 3.34 (m, 3H), 3.34 – 3.30 (m, 3H), 3.29 – 3.24 (m, 6H).

II.2.3. Synthesis of 1-(2-(1-adamantyl)ethyl)-1'-methyl-4,4'-bipyridinium diiodide

1-(2-(1-adamantyl)ethyl)-4,4'-bipyridinium iodide (506 mg, 1.134 mmol) was dissolved in a 30 mL microwave vial containing EtOH (10 mL). Methyl iodide (0.21 mL, 3.4 mmol) was adjoined and the preparation was heated at 130 °C for 45 min using a monomode microwave oven. 540 mg of 1-(2-(1-adamantyl)ethyl)-1'-methyl-4,4'-bipyridinium diiodide were produced after having filtered the mixture, washed the solid with EtOH (50 mL) and dried over P₂O₅ under reduced pressure.

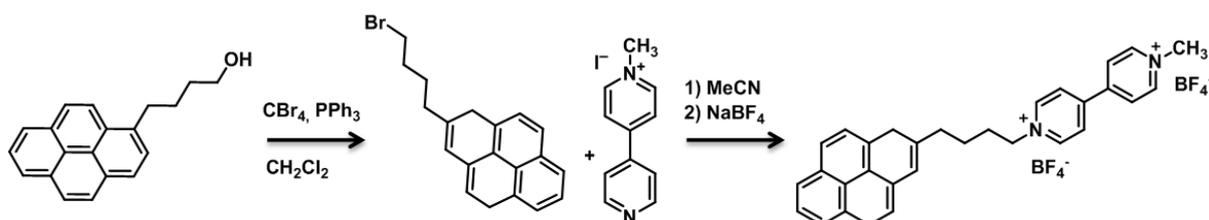
¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9.44 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 9.30 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.79 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H), 4.82 – 4.62 (m, 2H), 4.45 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.82 – 1.75 (m, 2H), 1.71 (d, *J* = 12.0 Hz, 3H), 1.64 (d, *J* = 12.2 Hz, 3H), 1.60 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ 148.37(C), 148.06(C), 146.57(CH), 145.91(CH), 126.50(CH), 126.07(CH), 56.94(CH₂), 48.04(CH₃), 44.98(CH₂), 41.54(CH₂), 36.35(CH₂), 32.14(CH₂), 27.85(CH).

NOTE: An ion exchange between diiodide and BF_4^- has been tried using an ion exchange resin but without success and with loss of material.

II.3. Synthesis of pyrene-viologen

The synthesis route of the pyrene-viologen (PV^{2+}) is depicted in Scheme 2.



Scheme 2 : Synthesis route for the production of PV^{2+} .

First, 3-(pyren-2-yl)butan-1-ol (753 mg, 2.68 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (20 mL) under magnetic stirring. After having added CBr_4 (1.77 g, 2 equiv) and PPh_3 (0.84 g, 1.2 equiv) at r.t., the mixture was stirred for 2 h. The solvent was then eliminated by evaporation and the products were dissolved in pentane (50 mL) and filtrated. The filtrate was separated by chromatography (gradient from CH_2Cl_2 to 10/90 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$), and 1.06 g of 2-(3-bromobutyl)pyrene was produced and characterized by ^1H NMR.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.28 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 8.05 – 8.00 (m, 2H), 7.99 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.70 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.37 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.00 – 1.86 (m, 2H), 1.81 – 1.67 (m, 2H).

Then, crude 2-(3-bromobutyl)pyrene (1.04 g, excess) and N-methyl viologen iodide (610 mg, 2.04 mmol) were mixed together in MeCN (14 mL). The solution was heated at 130°C for 40 min in a monomode microwave oven. The temperature of the mixture was cooled down and the suspension was filtered, and washed with CH_2Cl_2 (50 mL) and with aqueous HCl (0.1 mol L^{-1} , 10 mL), to produce 360 mg of solid. DMSO (15 mL) was used to dissolve the product, and a solution of NaBF_4 (2 g in 20 mL of water) was adjoined. The suspension was filtered, washed with water (2 x 2 mL), methanol (5 mL) and CH_2Cl_2 (5 mL), and pyrene-viologen tetrafluoroborate (430 mg, 36 %) was finally obtained and characterized by ^1H NMR and ^{19}F NMR.

^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9.37 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 9.26 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 8.78 – 8.62 (m, 4H), 8.36 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 8.31 – 8.17 (m, 4H), 8.17 – 8.09 (m, 2H), 8.06 (t, $J =$

7.6 Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.78 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.44 (s, 3H), 3.45 – 3.37 (m, 2H), 2.24 – 2.11 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 2H).

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO): δ -148.31.

III. Synthesis and characterizations of adamantane modified Glucose oxidase (GOx-Ad)

III.1. Materials

Glucose oxidase (GOx, Type VII, from *Aspergillus niger*, lyophilized min 60 % protein: Sigma–Aldrich G2 133-10 KU; Lot #: 086K2076; 179000 units g^{-1} solid).

III.2. Synthesis

The synthesis of the glucose oxidase modified by adamantane group was adapted of the synthesis previously described ⁷. 1-adamantylamine (2.5 mg, 0.016 mmol) and 1-ethyl3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimidhydrochloride (EDC, 3 mg, 0.016 mmol) were dispersed in phosphate buffer (3 mL, 0.1 mol L^{-1} , pH = 6.0), and placed in an ultrasound bath. GOx (1.6 mg) was added in this solution, and stirred for 2 h at r.t. and further 20 h at 4 °C. A AMICON ULTRA-15 15ML - 30 kDa was used to purify the GOx-Ad. The final concentration is 0.5 mg mL^{-1} .

The enzymatic activity of the GOx-Ad was evaluated by amperometric measurements and compared to the primary GOx activity. In presence of O_2 , glucose oxidation is catalyzed by GOx, producing hydrogen peroxide. Enzymatic activity of GOx-Ad was thus determined by amperometry, following H_2O_2 production. To this aim, a Pt-electrode was immersed in a glucose (50 mmol L^{-1}) containing phosphate buffer (0.1 mol L^{-1} , pH = 7) under stirring and potentiostated at 0.7 V. After addition of GOx in the media, an increase of anodic current is recorded against the time. The enzyme activity was calculated from the slope of the linear part of the graph current *versus* time, by comparison with the slope obtained with the unmodified GOx in same conditions. The activity for the GOx-Ad reached 119 U mg^{-1} .

IV. Self-assembly of block copolymers to make glyconanoparticles and their characterizations

IV.1. Reagents

Organic solvents: N,N-Dimethylformamide (DMF) (VWR Chemicals), Acetonitrile (MeCN) (VWR Chemicals), tetrahydrofuran (THF) (Biosolve). These solvents must be used very carefully.

Reagents: sodium anthraquinone-2-sulfonate (AQS) (Sigma-Aldrich), anthraquinone (AQ) (Sigma-Aldrich).

All reagents were used without any supplementary purification. All aqueous solutions were prepared with deionised water at 15 M Ω from a PURELAB® UHQ system.

IV.2. Materials

Dialysis membranes: 3.5 – 5 kDa Spectra/Por® Biotech Cellulose Ester (CE) dialysis membranes, wet in 0.05% sodium azide (Spectrum Laboratories Inc.), diameter 20 mm.

IV.3. Methods

IV.3.1. Copolymers self-assembly to make glyconanoparticles (GNPs)

30 mg of copolymer (or copolymer mixture, see Table 1) are dissolved onto 4 mL of a mixture of solvents (4:1 (w/w) THF/water). After 24 h under stirring, 1000 rpm, the mixture is added drop by drop with a syringe pump (10.2 mL h⁻¹) into 160 mL of distilled and filtered (0.2 μ m) water under stirring (5000 rpm). The THF is evaporated under vacuum at 35 °C for 30 minutes. The final volume is measured and adjusted with distilled and filtered water until 160 mL. Finally, 100 μ L of ethanol are added onto the solution. The GNP suspensions are stored at 4 °C, and exposed 20 minutes to ultrasounds before use.

Table 1: Weight composition of polymer mixtures to make the different kinds of glyconanoparticles

	GNP _{PSCD}	GNP _{PSMH}	GNP _{PSCD10}	GNP _{PSCD50}
m_{PSCD} / mg	30	0	3	15
m_{PSMH} / mg	0	30	27	15

IV.3.2. Functionalization of glyconanoparticles with anthraquinone (AQ) and anthraquinone sulfonate (AQS)

GNPs were functionalized with AQ by pre-functionalization and post-functionalization. 1 mg of AQ was used in the first case, directly added in the copolymer solution during the dissolution before the nanoprecipitation. In the second case, 2 mg of AQ were added in 10 mL of GNP solution and exposed to ultrasounds for 2 h.

AQS was used to functionalize GNP by post-functionalization. In this aim, 3 mg of AQS were added in 10 mL of the GNP solution and exposed to ultrasounds for 2 h.

IV.3.3. Functionalization of glyconanoparticles with viologen derivatives

Only GNP_{PSCD} were functionalized with viologen derivatives, they are named “GNP”.

IV.3.3.1. Copolymers self-assembly to make GNP/Ad-V²⁺: pre-functionalization method

For the pre-functionalization method, the redox molecule was added in the first step of preparation of GNPs, in the organic mixture of solvents with the PSCD copolymer. In order to make GNP/Ad-V²⁺ (molar ratio 3 Ad-V²⁺ for 1 PSCD), 9.3 mg of Ad-V²⁺ were added in the mixture.

IV.3.3.3. Copolymers self-assembly to make GNP/PV²⁺: pre-functionalization method

In order to make pre-functionalized GNP/PV²⁺ (molar ratio 5 PV²⁺ for 1 PSCD) 15.1 mg of PV²⁺ were dissolved in the mixture of solvents with the PSCD. The solution was exposed to ultrasounds for 10 minutes to solubilise the PV²⁺ before the stirring at 1000 rpm for 24 h.

IV.3.4. Dialysis

The dialysis membranes were rinsed prior to use with water to eliminate sodium azide traces. They were then filled with the different kinds of solutions or suspensions with 5, 10 or 20 mL. The filled membranes were immersed into 2 L of water under stirring (300 rpm) for 72 h. The water was changed the first time after 30 minutes, then 4 times every hour, and several times two hours later and left until 72 hours.

IV.4. Characterizations

IV.4.1. UV-visible microscopy

UV-visible spectra were obtained with a Perkin Elmer Lambda 650 spectrophotometer using a quartz cuvette (path length 1 cm or 1 mm). The wavelength step was set to 2 nm.

IV.4.2. Dynamic and static light scattering (DLS and SLS)

An ALV/CGS-8FS/N069 goniometer with an ALV/LSE-5004 multiple τ digital corrector with a 125 ns initial sampling time and a 35 mW red HeNe linearly polarized laser operating at $\lambda = 632.8$ nm was used. 10 mm diameter quartz cells thermally stabilized at 25 ± 0.1 °C was used. The digital ALV correlator control software was used to collect data at an observation angle relative to the transmitted beam between 160° and 230° for a counting time of 120 s. Relaxation time distribution and particle size distribution were established with the CONTIN analysis of the autocorrelation function. The Stokes-Einstein equation (1) was used to calculate hydrodynamic diameters (D_h), where K_B = Boltzmann constant ($1.38 \cdot 10^{-23}$ J K^{-1}), T = temperature (K), η = pure solvent viscosity (Pa s) and D = diffusion coefficient ($cm^2 s^{-1}$):

$$D_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

IV.4.3. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

A Nanosight LM10HS optical microscope equipped with a blue-purple laser ($\lambda_{ex} = 405$ nm), a camera and a chamber mounted on a modified microscope stage (Nanosight) was used to perform NTA experiments to obtain number-weighted hydrodynamic diameter distributions. The suspensions of GNPs were diluted with water ($[copolymer] = 0.02$ mg mL^{-1}) and introduced into the thermally controlled (25 °C) chamber using a syringe. Video clips were captured over 60 seconds and the natural Brownian motion of GNPs was analyzed using the analytical software version 2.1. to generate the number-weighted hydrodynamic distribution.

IV.4.4. Scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM)

Electron microscopy characterizations were performed by Christine LANCELON-PIN, Plateforme technologique Chimie Nanobio of the Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (PCN-ICMG).

IV.4.4.1. SEM

Clichés of GNPs were obtained using a ULTRA 55 FESEM based on the GEMINI FESEM column with beam booster (Nanotechnology Systems Division, Carl Zeiss NTS GmbH) with tungsten gun.

A drop of GNP solution was spread onto carbon substrate (diameter = 0.5 mm) and dry at r.t. before imaging and the volume can vary. In some cases, Chapter III, 120 μL were spread in the surface to respect the surface ratio of GNPs before doing the image.

IV.4.4.2. TEM

Pictures of GNPs were performed at 200 kV using a Phillips CM200 microscope equipped with a TEM-CAM 216 (TVIPS) camera and at 200 kV using a JEOL 2100 Plus microscope equipped with a RIO16 (GATAN) camera.

A drop (5 μL) of GNPs solution was deposited onto plasma treated carbon-coated copper microgrid. 5 μL of 2 w/v % UranylLess (Delta Microscopies) lanthanide-based negative stain was applied for a few minute and dry at r.t. Excess of liquid were removed by capillarity using blotting paper.

Diagrams of diameter distribution of GNPs, for both SEM and TEM images, were elaborated using ImageJ software by measuring GNP diameter onto multiple images and multiple places of the substrate.

V. Electrochemical measurements

V.1. Reagents

Organic solvents: anhydric N-methyl-2-pyrrolidinone anhydre 99% (NMP) (Sigma-Aldrich), N,N-Dimethylformamide (DMF) (VWR Chemicals), Acetonitrile (MeCN) (VWR Chemicals). These organic solvents must be used carefully.

Electrolytes: **Britton-Robinson buffer** in water (Preparation: 0.1 mol L⁻¹ boric acid (Euromedex), 0.1 mol L⁻¹ acetic acid (Aldrich), 0.1 mol L⁻¹ phosphoric acid (Carlo Erba) and 0.5 mol L⁻¹ potassium hydroxide (Aldrich) solutions. The same volume of each acid is mixed and KOH solution is added progressively to obtain the required pH); **McIlvaine buffer** in water (0.2 mol L⁻¹ sodium phosphate dibasic (Sigma Aldrich) with addition of 0.1 mol L⁻¹ citric acid trisodium salt (Sigma Aldrich) until the required pH); **Phosphate Buffer Saline**

(PBS) tablet (pH 7.4) (Sigma); tetra-*n*-butylammonium perchlorate (TBAP) (Sigma); tetra-*n*-butylammonium tertfluoroborate (TBABF₄) (Sigma); silver nitrate (AgNO₃) (Prolabo), lithium perchlorate (LiClO₄) (Sigma-Aldrich). The mixture must be done very carefully.

Reagents: Sigma-Aldrich: sodium anthraquinone-2-sulfonate (AQS) (Sigma), anthraquinone (AQ) (Sigma), β -D-glucose (Sigma), H₂SO₄ (Sigma).

Gases: argon (200 bars at 15 °C) (ALPHAGAZ); oxygen (200 bars at 15 °C) (AIR LIQUIDE).

Enzymes, Sigma-Aldrich: GOx-Ad, Laccase (E.C. 1.10.3.2 from *Trametes versicolor*, 13.6 U mg⁻¹ solid), Bilirubin oxidase (E.C.1.3.3.5 from *Myrothecium verrucaria*, 10.8 U mg⁻¹ solid). GOx-Ad and BOD were used as received, Laccase was purified by Dr. Fabien GIROUD (team Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques, BEA, DCM).

All reagents were used without any supplementary purification. All aqueous solutions were prepared with deionised water at 15 M Ω from a PURELAB® UHQ system.

V.2. Materials

Working electrodes (WE): glassy carbon (3 mm) or platinum (5 mm) electrode, rotating disk electrode (carbon, 3 mm and Pt 5 mm), **counter electrode (CE):** platinum, **reference electrode (RE):** in aqueous solvents: Ag/AgCl in saturated KCl solution ($E^0 = 0.222$ vs. standard hydrogen electrode, SHE at 25 °C) or Standard Calomel Electrode in saturated KCl solution (SCE, 0.241 V vs. SHE at 25 °C); in organic solvents: Ag/AgNO₃ 10⁻² mol L⁻¹ in MeCN + TBAP (0.1 mol L⁻¹).

Prior to use, glassy carbon electrodes or platinum electrodes were polished with a 2 μ m diamond paste on a polishing cloth and rinsed successively with acetone and ethanol. They were then cleaned in a water/ethanol mixture in ultrasonic bath for 20 minutes and rinsed again with water. Cyclic voltammetry was performed in PBS buffer (pH = 7.4) between 0.0 and 1.2 V vs. SCE and between - 0.9 and 0.0 V vs. SCE, scan rate = 100 mV s⁻¹, to verify the possible presence of impurities. When electrodes were contaminated, cyclic voltammetry in H₂SO₄ (0.1 mol L⁻¹) was performed between 0.6 and - 0.6 V vs. SCE. Thus, when H⁺ was reduced in H₂, H₂ bubbles were generated, allowing the removal of remaining impurities. After several scans, electrodes are rinsed with distilled water.

Measurements were performed using a PGSTAT100N potentiostat (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands, Metrohm AG) and using Nova 2.1.2 and 2.1.4 softwares.

All potentials referenced to SCE can be converted to Ag/0.01 mol L⁻¹ AgNO₃ by subtracting 298 mV.

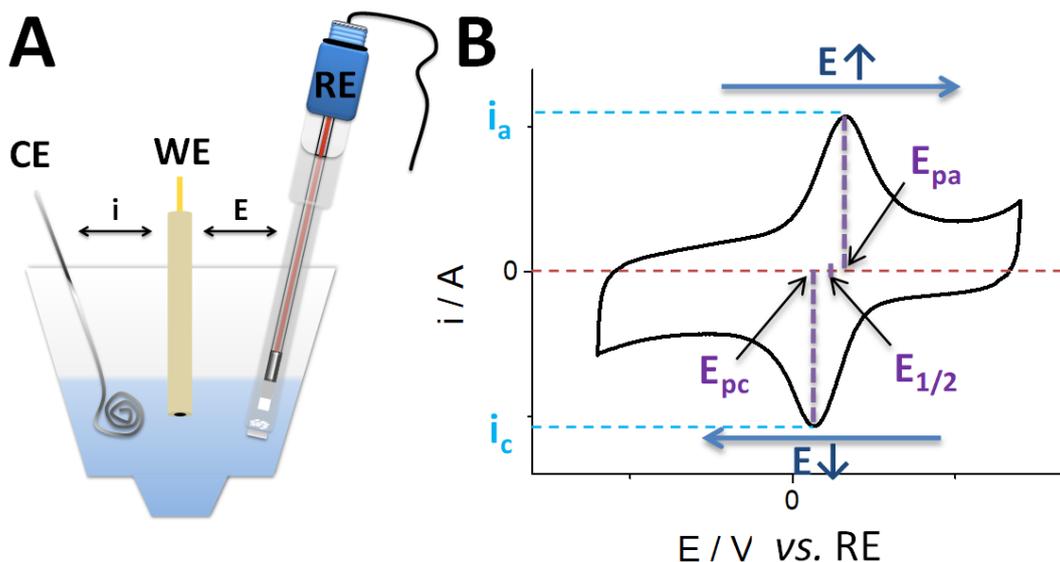
Carbon nanotubes: Commercial grade thin Multi-Walled Carbon NanoTubes (9.5 nm diameter, purity > 95 %) (Nanocyl); carbon nanotube, multi-walled sup 99% carbon basis, OD * L 6 – 13 mm * 2.5 – 20 μm , lot# MKBF1048V (ALDRICH).

Other: 2 μm diamond paste (Mercaprex PRESI), adhesive polishing clothes (PRESI), bath sonicator (Fisher scientific FB 15050, 37 kHz, 80 W power RMS, 320 W maximum peak power)

V.3. Methods

V.3.1. Cyclic Voltammetry

Electrochemistry is used to characterize different redox species immobilized onto electrodes surfaces or in solution. The first method used was cyclic voltammetry (CV). Every measure was performed at room temperature in a buffer electrolyte. A three electrode set-up, Scheme 3, was used for measurements, with a working electrode, a counter electrode, and a reference electrode. The WE is generally made of glassy carbon, platinum or gold, because of the passivity of those materials toward a broad range of solvents. Depending on the solvent, different references are used: Ag/AgCl (in saturated KCl) and standard calomel electrode (in saturated KCl) in aqueous media, and an Ag/AgNO₃ 0.1 mol L⁻¹ + MeCN + TBAP 0.1 mol L⁻¹ electrode in organic media. In order to measure the current passing through the WE, another electrode, the CE, must be associated. This generally consists on a platinum wire or grid, with a surface big enough to not limit the exchanges and make the WE the limiting electrode. A Pt wire in MeCN + TBAP 0.1 M or MeCN + TBABF₄ 0.1 M depending on the experiment (see Chapter III) was used in organic media. Every experiment was performed at r.t. or thermostatically controlled at 25 °C. O₂ was purged from solutions by bubbling Ar in a hermetic electrochemical cell for 20 minutes before the measure. Glove box ([O₂] <20 ppm) were also used for this purpose.



Scheme 3: (A) Illustration of the three electrodes set-up. (B) Typical voltammogram obtained by CV measurement.

Electrodes are immersed in an electrochemical cell filled with an electrolyte, and linked to a potentiostat connected to a computer. To perform CV measurements, a difference of potential is applied between the RE and the WE. Potentials are thus referred to the SCE and the Ag/AgNO₃ electrode in aqueous and organic media respectively. The current is measured between the CE and the WE. The current *versus* the RE potential is plotted on a voltammogram. As shown on the scheme, a potential window, in which the applied potential increases and decreases, is defined. The velocity of the scanned potential is called scan rate. When the WE potential is increased, redox species close to the electrode surfaces are oxidized. Hence, an electrochemical signal, described by an anodic peak is obtained. By scanning the potential in the reverse direction, species are reduced and described by a cathodic peak.

The important values shown in Scheme 3B are:

- the cathodic and anodic peak currents i_c and i_a respectively
- the cathodic and anodic peak potentials E_{pc} and E_{pa} respectively, when the absolute current is maximal
- the $E_{1/2}$ which is equal to:

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Another important parameter is the ΔE which is the difference between the E_{pa} and the E_{pc} . In the case of immobilized species, ΔE is ideally equal to 0 V for a fast electron transfer,

whereas for species in solution it is proportional to $59.5/n$ mV at 25°C , where n is the number of electrons⁸.

V.3.1.1. Electrode modification with carbon nanotubes

10 mg of MWCNT are dissolved onto 2 mL of NMP to make a 5 mg mL^{-1} solution, and stirred using an ultrasound bath for 2 h. 20 μL of this suspension are deposited onto glassy carbon electrode surface. The solvent is evaporated under vacuum using a desiccator.

V.3.1.2. Electrode modification with GNPs

As mentioned above, GNP suspensions were exposed to ultrasounds for 20 minutes before use. Different volumes of GNPs were deposited onto MWCNT electrode and GCE surfaces respectively and 50 μL on Platinum electrode for the biosensor electrode design, and left to dry at r.t.

V.3.2. Chronoamperometry

Glucose biosensors were studied by chronoamperometry (CA), where the same three electrode set-up is used. This consists to apply a potential between the RE and the WE and to measure the current between the CE and the WE as a function of time. This method is commonly used to study electrode current response after the addition of specie which is consumed at the electrode surface. Stability of electrodes can also be analysed.

V.3.2.1. Working electrode modification with Glucose oxidase

A 50 μL drop of GNP_{PSCD} or GNP_{PSMH} or $\text{GNP}_{\text{PSCD50}}$ was deposited onto a platinum electrodes surface (5 mm diameter) and dry at r.t. (3h). Glucose oxidase modified by adamantane (25 μL) was then incubated 2h30 at 4°C . The electrode was finally rinsed in phosphate buffer for 5 minutes.

V.3.2.2. Amperometric detection of glucose

A 0.7 V potential was applied between the RE and the WE during the experiment. Different volumes of different glucose concentrations prepared in PBS were progressively added in the electrochemical cell. After every addition of glucose, the current signal increases and stabilizes. This current was reported as a function of glucose concentration after every addition of glucose in the media to obtain the calibration curve.

References

1. Giacomelli, C. *et al.* Aqueous Self-Assembly of Polystyrene Chains End-Functionalized with β -Cyclodextrin. *Biomacromolecules* **10**, 449–453 (2009).
2. Gross, A. J. *et al.* Redox-Active Glyconanoparticles as Electron Shuttles for Mediated Electron Transfer with Bilirubin Oxidase in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 16076–16079 (2017).
3. Hammond, J. L. *et al.* Solubilized Enzymatic Fuel Cell (SEFC) for Quasi-Continuous Operation Exploiting Carbohydrate Block Copolymer Glyconanoparticle Mediators. *ACS Energy Lett.* **4**, 142–148 (2019).
4. Otsuka, I. *et al.* Thermoresponsive Vesicular Morphologies Obtained by Self-Assemblies of Hybrid Oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) Copolymer Systems. **26**, 2325–2332 (2010).
5. Guo, Z. *et al.* Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a “Click β -cyclodextrin” stationary phase. *J. Chromatogr. A* **1216**, 257–263 (2009).
6. Park, Y. S., Lee, E. J., Chun, Y. S., Yoon, Y. D. & Yoon, K. B. Long-Lived Charge-Separation by Retarding Reverse Flow of Charge-Balancing Cation and Zeolite-Encapsulated $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ as Photosensitized Electron Pump from Zeolite Framework to Externally Placed Viologen. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7123–7135 (2002).
7. Holzinger, M., Bouffier, L., Villalonga, R. & Cosnier, S. Adamantane/ β -cyclodextrin affinity biosensors based on single-walled carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1128–1134 (2009).
8. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. (2001).

Résumé – Abstract

Mots clés : électrochimie, bioélectrochimie, glyconanoparticules, copolymère à bloc, cyclodextrine, maltoheptaose

Cette thèse effectuée, en collaboration entre le Département de Chimie Moléculaire (DCM), et le Centre de Recherches sur les MACromolécules Végétales (CERMAV) est dédiée au développement de nouvelles glyconanoparticules (GNPs) rédox obtenues par auto assemblage de deux copolymères amphiphiles selon un procédé de nanoprécipitation: le polystyrène-*bloc*- β -cyclodextrine (PSCD) et le polystyrène-*bloc*-maltoheptaose (PSMH) ou d'un mélange en différentes proportions de ces deux copolymères. La morphologie et la taille nanométrique des GNPs ont pu être déterminées grâce à des caractérisations par diffusion dynamique de la lumière, microscopie électronique à transmission et à balayage. Selon la nature du composé rédox choisi, la fonctionnalisation des GNPs a été réalisée pendant leur formation ou après l'auto-assemblage de celles-ci en utilisant les propriétés d'inclusion des cyclodextrines. Un axe abordé pendant la thèse est l'étude des propriétés électrochimiques des glyconanoparticules rédox en solution ainsi qu'à la transposition de leurs propriétés rédox sur support carboné. Afin de mieux appréhender les propriétés électrochimiques des glyconanoparticules, une étude en amont des propriétés électrochimiques des composés rédox en solution comme pour l'entité viologène substituée par le groupement adamantane ou pyrène a été réalisée. Un dernier volet exploré est l'utilisation des glyconanoparticules en bioélectrochimie pour la réalisation de biocathodes enzymatiques et de biocapteurs enzymatiques à glucose, ce dernier étant choisi comme preuve de concept.

Key words: electrochemistry, bioelectrochemistry, glyconanoparticles, block copolymer, cyclodextrin, maltoheptaose

This thesis, carried out in collaboration between the Département de Chimie Moléculaire (DCM), and Centre de Recherches sur les MACromolécules Végétales (CERMAV) is dedicated to the development of new redox glyconanoparticles (GNPs). They are obtained by self-assembly of amphiphilic block copolymer systems using nanoprecipitation technique: polystyrene-*block*- β -cyclodextrin (PSCD) and polystyrene-*block*-maltoheptaose (PSMH) or a mixture of these 2 copolymers in different proportions. The morphology and the nanometric size of the GNPs were determined thanks to characterizations by dynamic light scattering, transmission and scanning electron microscopy. Depending on the nature of the chosen redox compound, the GNPs functionalization was carried out during their formation or after self-assembly using the inclusion properties of cyclodextrins. Another approach of the thesis is the study of the electrochemical properties of these redox glyconanoparticles in solution as well as their electrochemical transposition on carbon electrode. For a better understanding of the electrochemical properties of modified glyconanoparticles, a study of the electrochemical properties of redox compounds in solution, as for the viologen entity substituted by the adamantane or pyrene group, was carried out. A final aspect explored is the use of glyconanoparticles in bioelectrochemistry for the elaboration of enzymatic biocathodes and enzymatic glucose biosensors, this latter being chosen as proof of concept.