



**HAL**  
open science

# Etude des propriétés antibactériennes acquises par le dioxyde d'étain traité électrochimiquement en présence d'ions chlorure et de protéines.

Sanae Haskouri El Azzaoui

## ► To cite this version:

Sanae Haskouri El Azzaoui. Etude des propriétés antibactériennes acquises par le dioxyde d'étain traité électrochimiquement en présence d'ions chlorure et de protéines.. Autre. Université Paris VII - Denis Diderot, 2006. Français. NNT: . tel-04122204

**HAL Id: tel-04122204**

**<https://theses.hal.science/tel-04122204>**

Submitted on 8 Jun 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS 7 - DENIS DIDEROT**

*Spécialité : Chimie Physique et Chimie Analytique  
Option : Electrochimie*

*Présentée par*

**Melle HASKOURI EL AZZAOUI Sanae**

*Pour obtenir le grade de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7 - DENIS DIDEROT**

*Sujet :*

**Etude des propriétés antibactériennes acquises par le  
dioxyde d'étain traité électrochimiquement en présence  
d'ions chlorure et de protéines**

*Soutenue le 7 Novembre 2006, devant le jury composé de :*

M. M. Delamar, Professeur, Université Paris 7, Paris	Président
M. J. C. Block, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy	Rapporteur
M. A. Bergel, Directeur de recherche, CNRS, Toulouse	Rapporteur
M. D. FESTY, Ingénieur, Institut de la Corrosion, Brest	Examineur
M <sup>me</sup> . C. Debiemme-Chouvy, Chargée de recherche, CNRS, Paris	Co-directrice de thèse
M. H. Cachet, Directeur de recherche, CNRS, Paris	Directeur de thèse

## Remerciements

*Ce travail a été effectué dans le laboratoire des Interfaces et des Systèmes Electrochimiques, UPR 15 du CNRS. Je tiens tout particulièrement à remercier son directeur Monsieur Claude Deslouis de m'y avoir accueillie.*

*Je remercie Messieurs Jean Claude Block et Alain Bergel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que Messieurs Dominique Festy et Michel Delamar d'avoir accepté de l'examiner, je le remercie également d'avoir pris la présidence de ce Jury.*

*Madame Catherine Debiemme-Chouvy et Monsieur Hubert Cachet, mes co-directeurs de thèse, ont dirigé cette étude avec une grande disponibilité. Leurs précieux conseils, m'ont encouragée dans mon travail. Pour la confiance et la sympathie qu'ils m'ont témoignées durant ces trois années, ainsi que leurs efforts dans la dernière ligne droite, je les remercie chaleureusement.*

*Je suis particulièrement reconnaissante à Madame Rita Varocquier pour les expériences biochimiques. La réalisation des images par microscopie à fluorescence qui fut très enrichissante, n'aurait pu être possible sans la participation active de Monsieur Jean-Luc Duval, trouvent ici l'expression de ma vive reconnaissance.*

*Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide technique tout au long de ces trois années :*

- *Monsieur Guy Folcher pour sa disponibilité, les conseils et l'élaboration des films.*
- *Madame Françoise Pellier et Monsieur Stéphane Borensztajn, pour les images MEB et les analyses EDX.*

*Je tiens également à remercier les membres du laboratoire Biomécanique et Génie Biomédical pour leur accueil lors de mes séjours à Compiègne.*

*Le LISE est un laboratoire où il a été très agréable de travailler pendant quatre ans. Je tiens à remercier l'ensemble de ces membres, bien sur, je garderai un excellent souvenir des conversations amicales avec l'équipe féminine (Lila, Myriam, Nawel, Prescilla) du laboratoire durant ces dernières années.*

*Je n'oublierai pas le soutien de Lagrini Anass lors des moments douloureux. Ses petites attentions tout au long de ces quatre années m'ont particulièrement touchée et je garderai un excellent souvenir de nos discussions amicales à l'intérieur comme à l'extérieur du laboratoire.*

*Pour finir, j'aimerais remercier spécialement toute ma famille qui m'a toujours soutenu.*

*Enfin à Dilal qui depuis 4 ans m'encourage et me soutient, je voudrais dire merci. Merci pour ta patience, ton écoute et ton aide si précieuse durant les derniers mois malgré la distance.*

*Que les oubliés me pardonnent !*

# SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

## CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Dioxyde d'étain (SnO <sub>2</sub> ).....	7
I.1.1. Le choix du matériau.....	7
I.1.2. Propriétés de SnO <sub>2</sub> .....	10
I.1.2.1 Propriétés physico-chimiques du SnO <sub>2</sub> .....	10
a. Propriétés chimiques.....	11
b. Propriétés électriques et optiques.....	11
I.1.3. Domaines d'application de SnO <sub>2</sub> .....	11
I.1.4. Préparation du dioxyde d'étain.....	13
I.1.5. Comportement électrochimique du film dioxyde d'étain et sa stabilité...	13
I.2. Protéines.....	14
I.2.1. La structure native des protéines.....	14
I.2.1.1. Structure primaire.....	15
I.2.1.2. Structure secondaire .....	16
I.2.2. Adsorption des protéines sur une surface solide.....	17
I.2.3. Facteurs influençant l'adsorption des protéines.....	18
I.2.3.1. La nature du matériau.....	18
I.2.3.2. L'influence de la solution d'adsorption.....	19
a. pH.....	19
b. la composition de la solution.....	19
I.2.4. Caractérisation de la Sérum Albumine Bovine.....	19
I.2.4.1. La Sérum Albumine Bovine (SAB).....	19
I.2.4.2. Composition et structure de la SAB.....	20
I.2.4.3. Propriétés Physico-chimiques .....	21
I.3. Le biofilm et l'eau de mer.....	23
I.3.1. Biofilm.....	23
I.3.1.1. Conditions de formation d'un biofilm.....	23
I.3.2. Composition de l'eau de mer.....	24
I.4. les Biocides.....	26
I.4.1. L'acide hypochloreux .....	26
I.4.2. Biocide organique : les chloramines.....	27
I.5. Détection des chloramines et leurs dosages.....	28
Références du chapitre I .....	30

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels .....	35
II.1.1. Couches de SnO <sub>2</sub> .....	35
II.1.1.1. Electrodes sur lames de verre.....	38
II.1.1.2. Electrodes sur quartz piézoélectrique.....	38
II.1.2. Protéines.....	39

II.1.3. Bactéries.....	39
II.1.3.1. Protocole expérimental .....	40
II.1.3.2. Détermination de la viabilité des bactéries .....	40
<b>II.2. Méthodes.....</b>	<b>41</b>
II.2.1. Techniques électrochimiques.....	41
II.2.1.1. Techniques stationnaires.....	41
a. Suivi du potentiel en circuit ouvert.....	42
b. Courbes de polarisation.....	42
II.2.1.2. Techniques transitoires.....	42
a. Voltamétrie cyclique.....	42
b. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	43
1. Généralités.....	43
2. Détermination de la capacité et diagrammes de Mott-Schottky.....	44
2.1. Mesures de capacité.....	44
2.2. Etude des diagrammes.....	44
2.2.1. Densité de porteurs de charges .....	45
2.2.2. Potentiel de bande plate.....	45
II.2.1.3. Microbalance à cristal de quartz.....	46
a. Principe.....	46
b. Dispositif expérimental.....	47
II.2.2. Techniques d'observation.....	48
II.2.2.1. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	48
a. Les électrons secondaires.....	49
b. Les électrons rétro-diffusés.....	49
c. Les Rayons X (ou photons X).....	50
II.2.2.2. Microscopie à fluorescence .....	50
II.2.2.3. RHEED.....	50
II.2.2.4. La Spectroscopie de Photoélectrons X.....	51
a. Principe.....	51
b. Dispositif expérimental.....	52
II.2.3. Spectroscopie UV-Visible .....	53
II.2.3.1. Principe.....	53
II.2.3.2. Dispositif du spectrophotomètre UV/Visible.....	53
II.2.4. Dosage protéique en présence de SDS (kit Bio Rad).....	54
II.2.4.1. Principe.....	54
II.2.4.2. Protocole expérimental.....	54
II.2.5. Electrophorèse.....	55
II.2.5.1. Principe.....	55
II.2.5.2. Protocole expérimental.....	56
<b>Références du chapitre II.....</b>	<b>57</b>

## **CHAPITRE III : COMPORTEMENTS DE COUCHES SnO<sub>2</sub> DOPE DANS DIFFERENTS MILIEUX INORGANIQUES**

<b>III.1. Introduction.....</b>	<b>59</b>
<b>III.2. Effet de la nature du dopant sur le comportement de couches SnO<sub>2</sub> dans des solutions salines.....</b>	<b>60</b>
III.2.1. Electrode: SnO <sub>2</sub> :F /Sb2%.....	60

III.2.2. Electrode: SnO <sub>2</sub> :F.....	63
III.3. Influence de la vitesse de rotation de l'électrode de travail.....	65
III.4. Effet des ions présents dans l'eau de mer sur le comportement de couches SnO <sub>2</sub> .....	66
III.5. Analyses de surface.....	67
III.5.1. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS).....	67
III.5.2. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB).....	68
III.5.3. Observations par RHEED.....	70
III.6. Discussion.....	71
III.6.1. Comportement de l'électrode sous polarisation anodique.....	71
III.6.2. Evolution du potentiel de l'électrode après coupure de la polarisation anodique .....	76
III.7. Détermination de la viabilité des bactéries sur le film SnO <sub>2</sub> après polarisation anodique.....	77
III.8. Influence de molécules organiques.....	79
III.9. Conclusion.....	80
Références de chapitre III.....	81

## CHAPITRE IV : MISE EN EVIDENCE DE L'AGREGATION DE LA SAB SUR SNO<sub>2</sub>

IV.1. Introduction.....	83
IV.2. Réponses électrochimique et électrogravimétrique de films SnO <sub>2</sub> en présence de SAB.....	84
IV.2.1. Adsorption de la SAB sur le film SnO <sub>2</sub> en circuit ouvert.....	84
IV.2.2. Adsorption de la SAB sur le film SnO <sub>2</sub> sous polarisation anodique.....	85
IV.2.2.1. <i>La voltamétrie cyclique : influence de la borne supérieure du potentiel.....</i>	85
IV.2.2.2. <i>Effet du potentiel anodique en fonction du temps.....</i>	87
IV.2.2.3. <i>Effet de la concentration en NaCl.....</i>	91
IV.3. Analyse par XPS de la composition chimique de la surface de SnO <sub>2</sub> .....	92
IV.4. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB).....	97
IV.4.1. Milieu artificiel.....	97
IV.4.2. Eau de mer.....	100
IV.5. Méthodes biologiques.....	103
IV.5.1. Dosage des protéines adsorbées.....	103
IV.5.2. Electrophorèse SDS-PAGE.....	103
IV.5. Discussion.....	105
IV.6. Conclusion.....	108
Références du chapitre IV.....	109

## CHAPITRE V : ETUDE DES INTERACTIONS SAB/SnO<sub>2</sub> PAR MESURE DE LA CAPACITE INTERFACIALE

V.1. Procédure expérimentale.....	112
-----------------------------------	-----

V.1.1. Analyse des données d'impédance.....	113
V.1.2. Courbes capacité interfaciale – potentiel.....	114
V.1.3. Extraction de la capacité $C_{ss}$ liée aux états de surface.....	116
V.1.4. Modélisation de $C_{ss}$ par une distribution d'états.....	118
<b>V.2. Résultats expérimentaux.....</b>	<b>119</b>
V.2.1. Systèmes étudiés et courbes $C_{ss}(V)$ .....	119
V.2.2. Caractérisation des états de surface.....	119
V.2.3. Discussion.....	123
<b>V.3. Conclusion.....</b>	<b>127</b>
<b>Références du chapitre V.....</b>	<b>128</b>

## **CHAPITRE VI: MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES ACQUISES PAR $\text{SnO}_2$ APRES TRAITEMENT ELECTROCHIMIQUE**

<b>VI.1. Introduction.....</b>	<b>130</b>
<b>VI.2. Caractérisation des groupements chloramine.....</b>	<b>130</b>
VI.2.1. Mise en évidence des chloramines.....	130
VI.2.2. Approche quantitative.....	132
<b>VI.3. Propriétés antibactériennes de la surface <math>\text{SnO}_2</math>.....</b>	<b>134</b>
VI.3.1. Colonisation de surfaces “non modifiées”.....	134
VI.3.2. Adhésion de E. Coli sur un film $\text{SnO}_2$ polarisé en l'absence de protéines.....	136
VI.3.3. Adhésion de E. Coli sur un film $\text{SnO}_2$ en circuit ouvert en présence de SAB.....	136
VI.3.4. Adhésion de E. Coli sur des films $\text{SnO}_2$ ayant été polarisés anodiquement en présence de SAB.....	137
VI.3.4.1. Milieu artificiel en présence de l'albumine SAB.....	137
VI.3.4.2. Eau de mer en présence d'albumine SAB.....	139
VI.3.4.3. Effet des ions bromure sur l'adhésion bactérienne en présence de SAB.....	140
<b>VI.4. Conclusion.....</b>	<b>142</b>
<b>Références du chapitre VI.....</b>	<b>143</b>

**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....144**

**ANNEXES.....148**

# **CHAPITRE I**

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre est consacré à une revue bibliographique sur les propriétés générales, d'une part, du dioxyde d'étain ( $\text{SnO}_2$  : semiconducteur de type n) utilisé comme substrat, et d'autre part, sur les protéines, notamment l'albumine de sérum de bœuf (SAB) prise comme protéine modèle. Ce chapitre est complété par quelques rappels sur le biofilm et sa formation en eau de mer, ainsi que sur certains biocides.

### I.1. Le dioxyde d'étain ( $\text{SnO}_2$ )

#### I.1.1. Le choix du matériau

L'existence au sein du même matériau d'une bonne conductivité électrique combinée à une transparence optique élevée ouvre de très larges domaines d'applications. La coexistence de ces deux propriétés est un phénomène rare dans les matériaux. On connaît cependant deux catégories de matériaux qui y satisfont :

- les couches minces métalliques.
- les oxydes métalliques non stoechiométriques.

La première catégorie est très bien connue et a des applications spécifiques. La seconde possède des propriétés qui lui permettent de plus larges applications. Ces propriétés sont une excellente adhérence sur un grand nombre de substrats et une grande stabilité physique et chimique.

Ces oxydes ont en commun trois caractéristiques principales :

- (1) la largeur de la bande interdite (gap) est importante ( $> 2,5$  eV).
- (2) le composé stoechiométrique est isolant.
- (3) le matériau est transparent dans le visible. La fréquence d'absorption plasma due aux électrons de conduction se situe dans l'infrarouge, à la limite du visible.

Les semiconducteurs (SC) présentent la particularité d'être des conducteurs soit de charges négatives (électrons, SC type n) soit de charges positives (trous  $h^+$ , SC type p), alors que dans les métaux, la conduction est assurée uniquement par des électrons ( $e^-$ ).

Dans les métaux, la densité de porteurs est d'environ  $n \approx 10^{22} \text{ cm}^{-3}$  et pour les semiconducteurs, elle est variable entre  $10^{10}$  et  $10^{20} \text{ cm}^{-3}$ . Au-delà de ces différences fondamentales, dans les semiconducteurs, ce sont les densités de porteurs qui définiront les vitesses de réaction se produisant à l'interface alors que dans les métaux, c'est la chute de

potentiel dans la couche de Helmholtz (barrière du champ électrique de l'ordre de  $10^8 \text{ V.cm}^{-1}$ ) qui contrôle les vitesses de réaction. C'est le facteur énergie correspondant à la barrière de potentiel qui apparaît plus important dans le cas des électrodes métalliques. Sur une électrode semiconductrice, les vitesses des réactions électrochimiques sont liées à la concentration des porteurs à la surface <sup>[1]</sup>. Un semiconducteur est caractérisé fondamentalement par trois niveaux :

- le niveau du bas de la bande de conduction :  $E_c$
- le niveau du haut de la bande de valence :  $E_v$
- le niveau de Fermi :  $E_F$  proche de la bande de conduction (BC) pour un SC de type n.

En solution, à l'équilibre, l'égalité des niveaux de Fermi du semiconducteur et de l'électrolyte fait apparaître une zone de charge d'espace sous la surface du semiconducteur. Le champ électrique qui se forme dans cette région s'oppose au passage supplémentaire de charges à l'intérieur du semiconducteur, et se manifeste par une courbure des bandes de valence et de conduction.

L'un des plus utilisés de ces oxydes est, comme le montre le tableau I.1, le dioxyde d'étain. Le cristal pur de  $\text{SnO}_2$  est un isolant dont le gap est voisin de 3,8 eV <sup>[2-3-4-5-6]</sup>. La densité intrinsèque d'électrons libres pour un tel gap est de l'ordre de  $10^{15} \text{ cm}^{-3}$ . On peut cependant obtenir grâce à des écarts à la stoechiométrie idéale ou par dopage, des cristaux dont la densité de porteurs peut atteindre  $10^{18}$  à  $10^{21} \text{ cm}^{-3}$ . Ces écarts sont dus aux lacunes d'oxygène et aux atomes dopants antimoine ou fluor. Le dopage à l'antimoine permet d'atteindre  $10^{21} \text{ cm}^{-3}$  dans les films polycristallins, mais au prix d'une très forte diminution de la mobilité des porteurs, due à la présence de défauts cristallins.

$\text{SnO}_2$  a été le premier semiconducteur transparent à avoir été commercialisé à grande échelle. Bien que plus onéreux,  $\text{In}_2\text{O}_3$  est également produit massivement de nos jours, car, ce matériau possède les meilleures propriétés électroniques. En raison de son faible coût, de nouvelles études ont démarré sur  $\text{ZnO}$ , dont les propriétés sont intéressantes lorsqu'il est dopé au gallium ou à l'aluminium. Quant à  $\text{CdO}$  dopé à l'étain, il présente de très bonnes propriétés électriques, mais l'élimination des phases secondaires  $\text{CdO}$  et  $\text{CdSnO}_3$  nécessite des recuits à haute température, ce qui rend difficile l'élaboration de couches minces. De plus, le cadmium est un élément chimique toxique.

Applications	Propriétés exploitées	Couches utilisées
Cellules solaires photovoltaïques :		
1- SIS semiconducteur/isolant/semiconducteur	Absorption –UV Transmission optique	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Sn, SnO <sub>2</sub> , ZnO, MoO <sub>3</sub>
2- Hétérojonction	Transmission solaire/ conductivité	SnO <sub>2</sub> : F, In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Sn
3- Couches anti-reflet	Transmission solaire/ indice de réfraction $\approx 2$	SnO <sub>2</sub>
Dispositif opto-électronique (CID, CCD)	Transmission optique/ Conductivité	SnO <sub>2</sub> : F, In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Sn
Elément chauffant pour fenêtre d'automobile, d'avion et de bateau.	Transmission optique/ Conductivité	SnO <sub>2</sub> : Sb
Couche anti-gel	Transmission optique/ faible émittance thermique	SnO <sub>2</sub> : F,
Lampe à sodium	Transmission optique/ réflectivité de la chaleur	SnO <sub>2</sub> : F, SnO <sub>2</sub> : Sb, SnO <sub>2</sub> : In
Ecran pour micro-ondes	Transmission optique/ réflectivité des micro	SnO <sub>2</sub> : F,
Double vitrage	Transmission solaire/ faible émittance thermique	SnO <sub>2</sub> : F,
Couches spectralement sélectives déposées sur collecteur solaire	Faible réflectivité solaire/ faible émittance thermique	SnO <sub>2</sub> : F, In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Sn
FET –transistor	Semiconducteur	SnO <sub>2</sub>
Goulot de bouteille	Stabilité mécanique	SnO <sub>2</sub>
Capteurs de gaz, détecteurs de fumée	Instabilité chimique à haute température	SnO <sub>2</sub> , ZnO
Traitement électrochimique des eaux usées	Forte surtension anodique	SnO <sub>2</sub> : F, Sb

*Tableau I.1 : Applications pratiques de couches d'oxyde transparentes conductrices*

### I.1.2. Propriétés de SnO<sub>2</sub>

Le dioxyde d'étain, cassitérite, est le principal minerai d'étain. Il cristallise dans une structure de type rutile. C'est un semi-conducteur de type n à large bande interdite (entre 3,8 et 4,1 eV), selon les auteurs [7-8].

Il possède une structure rutile tétragonale, de groupe d'espace D<sup>14</sup>, dont les paramètres de maille sont  $a = b = 4,737 \text{ \AA}$  et  $c = 3,185 \text{ \AA}$ . Quinze modes de vibration optiques transverses sont actifs dans le moyen et le lointain infrarouge.

Un modèle de bande a été calculé par Robertson, conduisant à un gap direct théorique de 3,6 eV. Comme la majorité des oxydes semiconducteurs, le cristal de SnO<sub>2</sub> présente des ruptures de la périodicité du réseau: les auteurs [9-10-11] s'accordent pour désigner les lacunes d'oxygène comme étant les défauts intrinsèques prédominants dans SnO<sub>2</sub>, le rendant sous stœchiométrique en oxygène.

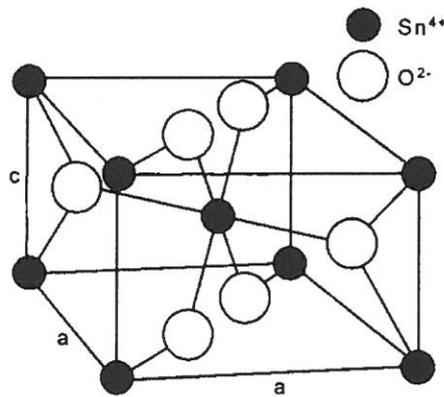
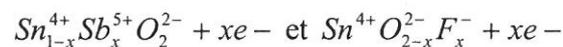


Figure I.1: Maille élémentaire de la structure rutile de SnO<sub>2</sub>

Les dopants les plus efficaces sont l'antimoine et le fluor, donnant les composés communément appelés ATO et FTO dont les notations ioniques respectives sont :



#### I.1.2.1 Propriétés physico-chimiques du SnO<sub>2</sub>

Depuis longtemps, le dioxyde d'étain est apparu comme un matériau ayant des caractéristiques très intéressantes. Il est utilisé en couches minces déposées sur un substrat de verre ou de quartz. Ces couches sont à la fois conductrices et transparentes dans le visible. SnO<sub>2</sub> présente une stabilité chimique et mécanique très élevée. De ce fait, il est utilisé dans divers domaines d'application (cellules solaires pour la conversion photovoltaïques),

électrodes transparentes, dispositifs d'affichage optoélectronique, fenêtres à transparence sélective, génie électrochimique (conversion photoélectrochimique, traitement des eaux polluées), capteurs de gaz.

#### a. Propriétés chimiques

Les films SnO<sub>2</sub> dopés à l'antimoine (Sb) ou au fluor (F) sont particulièrement stables dans un environnement corrosif. Ils sont très résistants à l'attaque chimique dans des solutions acides ou basiques.

#### b. Propriétés électriques et optiques

La conductivité électrique de SnO<sub>2</sub> est assurée par des défauts ioniques tels que les lacunes d'oxygène ou les atomes dopants en substitution. Elle dépend des conditions expérimentales de fabrication, notamment la concentration en précurseur d'étain, celle en éléments dopants et la température du substrat (voir paragraphe I.1.4). Les films SnO<sub>2</sub> sont dopés au fluor, au chlore ou à l'antimoine. Leur résistivité dépend de la nature et de la concentration du dopant <sup>[12]</sup>. Les couches les plus conductrices sont obtenues avec le dopage au fluor.

Pour les taux de porteurs (N) inférieurs à  $5.10^{18} \text{ cm}^{-3}$ , la résistivité est gouvernée par les effets de barrière au niveau des joints de grain. Dans le cas contraire ( $N \geq 5.10^{18} \text{ cm}^{-3}$ ), la résistivité ( $\rho$ ), *via* la mobilité, est directement liée aux propriétés en volume du semiconducteur, notamment la densité de défauts cristallins.

L'autre spécificité des films d'oxyde d'étain mise à profit est leur très bonne transparence dans le visible. Dans le cas des films dopés fluor, par la méthode de dépôt utilisée au laboratoire (pyrolyse d'aérosol), on peut atteindre une transparence moyenne de 90% pour  $N = 5.10^{20} \text{ cm}^{-3}$ , une résistivité de  $\rho = 4.10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$  et une mobilité des électrons  $\mu_e = 20 \text{ à } 30 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### I.1.3. Domaines d'application de SnO<sub>2</sub>

Le dioxyde d'étain est très utilisé dans l'industrie des céramiques comme opacifiant des vernis ou des émaux. Du fait de son insolubilité (ou faible solubilité) dans les vernis ou

les verres, il sert aussi de composé de base pour les pigments (par exemple  $\text{SnO}_2/\text{V}_2\text{O}_5$  jaune,  $\text{SnO}_2/\text{Sb}_2\text{O}_5$  bleu-gris,  $\text{SnO}_2/\text{Cr}_2\text{O}_3$  rose).

Des films très minces (100 nm), transparents, de dioxyde d'étain sont déposés sur des récipients en verre afin d'accroître leur résistance mécanique de surface. Des films plus épais (1  $\mu\text{m}$ ) fournissent des couches électriquement conductrices qui, après un dopage approprié avec de l'antimoine ou du fluor, peuvent être utilisées comme électrodes, dispositifs électroluminescents (pour des panneaux lumineux de faible intensité ou des panneaux d'affichage), lampes fluorescentes, double vitrage antistatique, pare-brise chauffants (principalement pour les avions), etc. Une autre propriété de ces films épais est leur capacité à réfléchir une grande proportion des radiations IR, tout en restant transparents aux radiations visibles (utilisation en double vitrage pour l'isolation thermique des fenêtres) <sup>[13-14]</sup>.

Les systèmes à base de  $\text{SnO}_2$  peuvent être utilisés en catalyse hétérogène. Les plus anciens et les plus brevetés sont les catalyseurs à base d'oxyde mixte de vanadium et d'étain pour l'oxydation de composés aromatiques dans la synthèse d'acides organiques et anhydrides d'acides. Plus récemment, des oxydes mixtes Sb-Sn ont été employés dans l'oxydation sélective de l'acide acrylique et de l'acrylonitrile <sup>[19]</sup>, et également actif dans la réaction d'oxydation de CO à des températures inférieures à 150°C <sup>[15]</sup>. Enfin, le dioxyde d'étain dopé ou non présente des propriétés intéressantes en catalyse de réduction des  $\text{NO}_x$ . Teraoka et coll <sup>[16]</sup> ont en effet montré son activité et sa stabilité dans la réduction sélective du NO par les hydrocarbures à 400°C en présence d'un excès d'oxygène.

De part ses propriétés semiconductrices,  $\text{SnO}_2$  est très utilisé comme matériau de base des capteurs à gaz. Il présente une sensibilité élevée à la détection de gaz inflammables ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ) ou toxique (CO,  $\text{H}_2\text{S}$ ). Le principe de ces capteurs est basé sur le suivi des variations de la résistance électrique du dioxyde d'étain en fonction de l'atmosphère gazeuse environnante. Le premier brevet a été déposé en 1962 par Tagushi <sup>[17]</sup>. Son exploitation a conduit à l'apparition du premier capteur semiconducteur commercial en 1968 (société Figaro) destiné à la détection des fuites de gaz domestiques <sup>[18]</sup>. En outre, le dopage de  $\text{SnO}_2$  par un élément approprié permet d'améliorer certaines de ses performances. Son imprégnation par du platine et du ruthénium diminue la sensibilité du capteur aux variations de température et d'humidité <sup>[19]</sup>. L'addition de palladium améliore la détection de  $\text{CH}_4$  à 400-450°C <sup>[20-21]</sup> et permet la détection de CO à basse température (50°C) tout en améliorant la sensibilité et la sélectivité <sup>[22]</sup>. On peut enfin citer l'utilisation d'un oxyde mixte tel que  $\text{CrO}_x/\text{SnO}_2$  pour une meilleure détection du monoxyde d'azote <sup>[23]</sup>. Les couches minces de  $\text{SnO}_2$  dopées en Sb augmentent de manière significative la performance de l'électrode dans une cellule de lithium-ion <sup>[24-25]</sup>.

En milieu aqueux, le domaine d'électroactivité s'étend sur environ 2 V <sup>[26]</sup>. La réaction de dégagement d'oxygène sur SnO<sub>2</sub> nécessite une très forte surtension anodique, supérieure d'environ un volt au potentiel thermodynamique. Cette particularité est mise à profit dans le traitement électrochimique des rejets industriels <sup>[27-28]</sup>.

#### I.1.4. Préparation du dioxyde d'étain

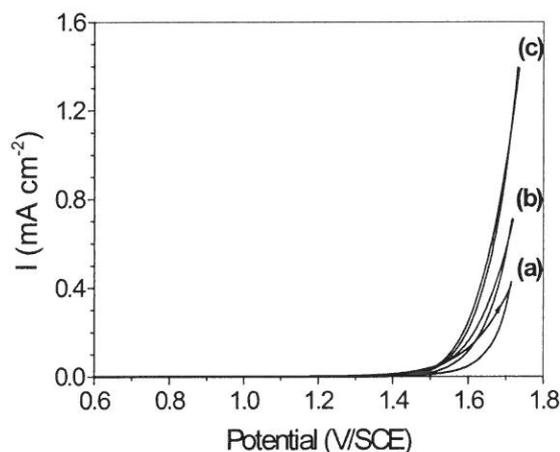
L'élaboration des films de SnO<sub>2</sub> sur des lames de verre et du quartz peut être obtenue par plusieurs méthodes qui sont le dépôt chimique en phase vapeur <sup>[29]</sup>, l'évaporation <sup>[30]</sup>, le sputtering <sup>[31]</sup>; etc. La première méthode utilisée est **l'évaporation** sur un substrat chauffé, d'une source d'oxyde ou métallique sous vide ou sous atmosphère réactive <sup>[32]</sup>. Parmi les autres méthodes de dépôt possibles, nous citerons brièvement :

- Le **sputtering** consiste à pulvériser le métal ou l'oxyde qui est pris comme cathode, sous atmosphère d'argon ou d'oxygène.
- Le **dépôt chimique en phase vapeur** est une technique très courante pour déposer des films d'oxyde. La couche mince est obtenue par réaction de surface sur un substrat solide.
- **L'immersion** <sup>[33]</sup> consiste à plonger le substrat dans la solution de sel du métal à déposer puis passer le substrat dans une atmosphère de vapeur d'eau chaude.
- **La croissance** <sup>[34]</sup> en solution forme, sous certaines conditions, des phases solides d'hydroxydes qui se transforment en oxydes métalliques. Ce mode de croissance peut être assisté électrochimiquement <sup>[35]</sup>.
- Enfin, la méthode la plus simple et pratique que nous avons utilisée dans notre travail est la **décomposition thermique d'un aérosol** ou « **spray** » <sup>[36-37-38-39]</sup>.

#### I.1.5. Comportement électrochimique du film dioxyde d'étain et sa stabilité

Des mesures électrogravimétriques (thèse de F. Zenia <sup>[50]</sup>) ont mis en évidence qu'en présence d'ions chlorure, une corrosion de SnO<sub>2</sub> avec perte de masse apparaissait dans une région limitée de potentiel, entre 1,0 et 1,3 V/ECS. Ces résultats ont été obtenus soit en milieu acide HCl, soit en milieu faiblement basique (tampon borate pH 8). En milieu électrolytique dépourvu d'ions chlorure, les courbes masse-potential ne sont associées à aucune perte de masse.

Les films SnO<sub>2</sub> dopés Sb sont plus actifs électrochimiquement que ceux dopés au fluor. Dans le cas du dopage Sb, la vague d'oxydation des chlorures se situe vers +1,4V/ECS, en se superposant au dégagement d'oxygène. Dans le cas du fluor par contre, cette même vague n'apparaît qu'à des potentiels d'au moins 2,5 V/ECS.



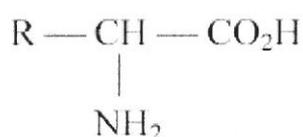
**Figure I.2:** Voltampérogrammes obtenus sur une électrode SnO<sub>2</sub>:Sb dans: (a) 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (b) 0,15M NaCl; (c) 0,5M NaCl à  $v = 5 \text{ mV/s}$ .

La différence de réactivité peut s'expliquer par la présence d'une forte densité d'états électroniques présents dans la bande interdite de SnO<sub>2</sub> créée par les atomes d'antimoine incorporés. L'usage du dopage Sb apporte d'emblée un gain d'au moins 1 Volt par rapport au dopage fluor vis-à-vis de la réaction d'oxydation des ions chlorure.

## I.2. Protéines

### I.2.1. La structure native des protéines

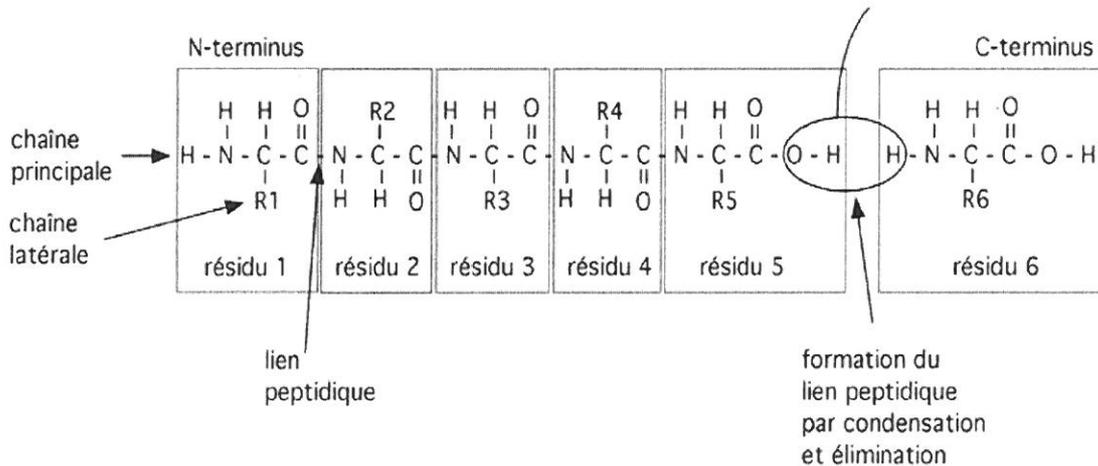
Les protéines sont des macromolécules constituées d'une ou plusieurs chaînes formées d'une succession d'acides aminés (AA) unis entre eux par des liaisons peptidiques. Il existe vingt acides aminés dans les protéines naturelles. Chaque acide aminé possède un groupement amine primaire-NH<sub>2</sub>, et un groupement carboxylique, CO<sub>2</sub>H, faiblement acide porté par le même atome de carbone asymétrique. La formule générale d'un acide aminé est :



où R représente la chaîne latérale, aussi appelée résidu.

**1.2.1.1. Structure primaire**

Chaque acide aminé est lié au suivant par une liaison peptidique, qui se forme par élimination d'une molécule d'eau entre le groupement carboxyle d'un AA et le groupement amine d'un autre AA. Quand les acides aminés sont incorporés dans une chaîne (qu'on appelle chaîne *polypeptidique*), on les appelle des *résidus*. La chaîne polypeptidique n'est pas branchée; elle forme un unique filament étiré. Par convention, on désigne le premier acide aminé de la chaîne comme étant celui dont le groupement aminé reste libre; on dit qu'il est en 5' ou encore qu'il constitue l'extrémité N-terminale. On désigne comme étant le dernier résidu de la chaîne celui dont le groupement carboxylique reste libre; on le dit en 3', ou à l'extrémité C-terminale [40].



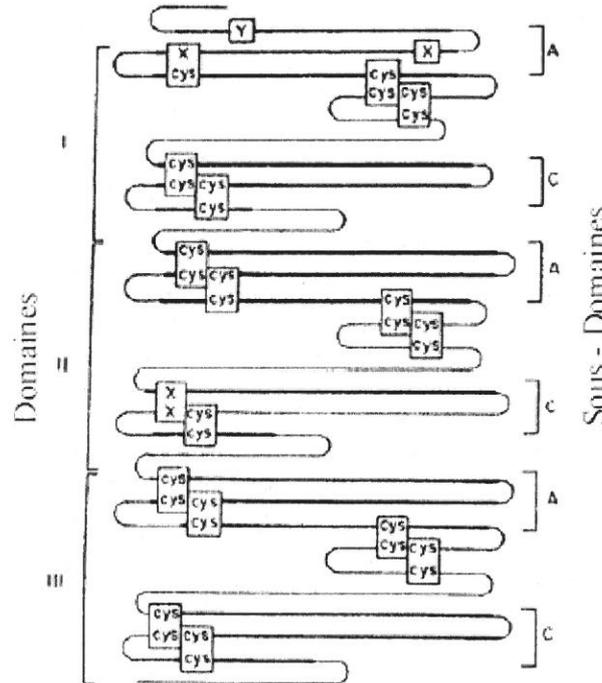
La séquence d'acides aminés de la SAB a été obtenue par Brown *et al.* en 1975 et est présentée sur la figure I.3.

D<sup>1</sup>THKSEIAHREFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEIHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLIHTLFGDELCK  
 VASLRETYGDMADCCEKEQPERNE<sup>100</sup>CFLSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLVEIARRHPYFYA  
 PPELLYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVLTSARQLRC<sup>200</sup>ASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPK  
 AEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLECCDKPLLEKSHICIAEVEKDAIPE<sup>300</sup>  
 DLPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCAKDDPHACYT<sup>400</sup>SVFDK  
 LKHLVDEPQNLKQNCQFEKLEGE<sup>400</sup>YGFQNAVIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTED  
 YLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK<sup>500</sup>AFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTA  
 LVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA<sup>582</sup>

**Figure I.3 : Structure primaire de la SAB**

### 1.2.1.2. Structure secondaire

La SAB est formée de trois domaines structuraux (I, II, III) homologues, chacun divisés en deux sous domaines A et C (chaque sous domaine étant homologue).



*Figure I.4 : Repliement de la SAB*

La séquence des acides aminés le long de la chaîne détermine la structure primaire. La structure secondaire résulte du fait que des liaisons hydrogène s'établissent entre l'oxygène d'un carboxyle et l'hydrogène d'un résidu aminé des liaisons peptidiques, formant ainsi des structures en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$ . La structure tertiaire résulte de l'organisation d'une chaîne peptidique en une configuration compacte mettant en contact des acides aminés éloignés dans la chaîne. Elle est maintenue par des forces de liaison non covalentes de faible énergie et parfois par des liaisons bisulfure entre résidus cystéine. Cette organisation dispose les radicaux actifs dans un ordre qui conditionne l'activité fonctionnelle de la protéine. La structure quaternaire correspond à l'assemblage de plusieurs unités de structure tertiaire pour former la protéine fonctionnelle. Cette association peut être covalente ou non. Elle est très souvent due à l'effet hydrophobe. C'est le cas des protéines fortement hydrophobes comme la lactoglobuline  $\beta$  qui s'associe en dimères ou en octamères selon la valeur du pH et les caséines qui forment des micelles. Le tableau I.2 résume les caractéristiques des interactions impliquées dans la stabilisation des structures protéiques <sup>[41]</sup>. D'un point de vue structural, il

est possible de distinguer deux types majeurs de protéines : les protéines fibreuses des tissus de soutien, comme le collagène ou la kératine, et des protéines globulaires possédant souvent une activité biologique, comme les hormones ou les enzymes. Les techniques les plus employées pour analyser la structure secondaire des protéines sont le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge. La cristallographie par rayons X et la résonance magnétique permettent de déterminer complètement la structure tridimensionnelle des protéines à l'échelle atomique. C'est la cristallographie qui a fourni les structures des protéines qui ont servi de références aux techniques spectroscopiques. Par contre, lorsqu'une protéine est très peu structurée les techniques précédentes deviennent peu utiles. Il faut alors recourir à la diffusion des neutrons ou des rayons X aux petits angles pour obtenir des informations sur sa configuration.

Types d'interaction	Energie de liaison (kJ.mol <sup>-1</sup> )	Distance d'interaction (nm)	Influence d'une élévation		
			de la température	du pH	de la force ionique
Covalente :					
Liaison bisulfure	320-380	0,1-0,2	aucune	oui	non
Non covalentes :					
Interactions électrostatiques	25-50	0,2-0,3	diminue	oui	oui
Liaison hydrogène	10-40	0,2-1,3	diminue	non	oui
Interactions hydrophobes	3-10	0,3-1	augmente	non	oui
Forces de Van der Waals	1-20	0,1-0,4	diminue	non	oui

**Tableau I.2:** Caractéristiques des interactions impliquées dans la stabilisation des structures protéiques <sup>[42]</sup>.

### I.2.2. Adsorption des protéines sur une surface solide

L'adsorption est le phénomène par lequel des molécules dissoutes s'accumulent sur une surface, à des concentrations supérieures à celles que l'on aurait si ces molécules étaient simplement réparties en volume de manière aléatoire.

De part leur composition, les protéines sont des molécules amphiphiles : elles comportent des parties hydrophobes et d'autres hydrophiles. De ce fait, lorsqu'elles sont dissoutes dans une phase aqueuse, elles s'adsorbent sur les surfaces.

L'adsorption des protéines est sensée se produire en trois étapes distinctes. La première étape est la diffusion de molécules de protéine dans la sous-surface juste au-dessous de l'interface. Puis ces molécules de protéine sont adsorbées après avoir surmonté diverses barrières d'énergie. Finalement, elles se réarrangent à l'interface <sup>[41]</sup>, ayant pour résultat un dépliement partiel des segments adsorbés.

### **I.2.3. Facteurs influençant l'adsorption des protéines**

De nombreux paramètres influencent l'adsorption des protéines. Parmi ceux-ci, on peut citer: la rugosité du matériau (nature), le caractère hydrophile/hydrophobe de sa surface, la composition de la solution (pH, la charge de la surface), et à la fin l'influence de la concentration en matière organique.

#### ***I.2.3.1. La nature du matériau***

Les protéines en général s'adsorbent sur tous les types de surface. La quantité adsorbée change considérablement selon le type de surface, les différentes forces appliquées telles que les forces de Van der Waals, les forces répulsives de la double couche, celles dues aux interactions hydrophobes.

La contribution des différentes forces est très variée selon la nature du matériau aussi bien que l'influence du type de molécule. Une généralisation largement admise est que plus la surface est hydrophobe, plus l'ampleur de l'adsorption est grande. L'adsorption des protéines dépend des caractéristiques énergétiques de surface. Elle semble plus importante sur des substrats hydrophobes que sur des substrats hydrophiles.

Le caractère hydrophobe ou hydrophile d'une surface joue un rôle sur l'adsorption des protéines, sur l'étalement cellulaire, et sur l'adhésion bactérienne. Le taux d'adsorption a été directement lié à l'hydrophobicité de sa surface, qui est une force d'entraînement principale pour l'adsorption de protéine à l'interface solide-liquide. De nombreuses études montrent qu'une surface hydrophobe telle qu'une électrode d'or favorise l'adsorption des protéines comme par exemple la SAB <sup>[43-44-45-46]</sup>.

Il est reconnu que la charge de surface influence l'adhésion des protéines. Les forces électrostatiques interviennent en effet dans l'adsorption des protéines sur différents substrats. R. Kurosch et al <sup>[47]</sup> ont montré que l'adsorption des protéines est due essentiellement à la charge de surface, sans oublier aussi que la topographie et la rugosité de la surface du

matériau conditionnent la facilité d'adsorption des macromolécules <sup>[48]</sup>. Fukuzaki *et al*<sup>[49]</sup> rappellent que l'adsorption des macromolécules organiques sur des oxydes métalliques (SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) dépend aussi du point isoélectrique de la surface considérée, de son degré d'oxydation. C. Rubio *et al* <sup>[50]</sup> montrent aussi que la quantité de protéine SAB dépend de la nature du matériau : sur le chrome et l'acier inoxydable AISI 304, après 120 min d'immersion, l'épaisseur de la couche est de l'ordre 64 Å pour le chrome et de 48 Å pour l'acier inoxydable.

### ***1.2.3.2. L'influence de la solution d'adsorption***

#### **a. pH**

Le pH de la solution influence fortement l'adsorption d'une macromolécule sur un substrat. D'une manière générale, les protéines s'adsorbent au maximum à leur point isoélectrique (PI) <sup>[51]</sup>. Dans le cas de l'adsorption de la SAB, de nombreux travaux montrent l'effet du pH sur son adsorption. Expérimentalement, les valeurs de saturation de l'adsorption de SAB varient avec le pH, et le maximum est enregistré autour du point isoélectrique de la SAB pour tous les substrats <sup>[52-53-54]</sup>.

#### **b. la composition de la solution**

Selon les travaux de C. Rubio <sup>[55]</sup>, les plus forts taux de recouvrement en protéine SAB, ou les épaisseurs les plus grandes, sont obtenus pour les couches adsorbées après immersion dans une solution NaCl+MgCl<sub>2</sub> ou dans l'eau de mer artificielle par rapport à celles adsorbées dans une solution contenant NaCl+CaCl<sub>2</sub> ou seulement NaCl.

## **1.2.4. Caractérisation de la Sérum Albumine Bovine**

### ***1.2.4.1. La Sérum Albumine Bovine (SAB)***

La sérum Albumine Bovine est couramment utilisée dans plusieurs domaines de recherche (médecine, agro-alimentaire, environnement). Son nom provient du latin *albus* qui signifie blanc, couleur du composé obtenu après précipitation.

C'est la protéine plasmatique la plus abondante de l'organisme. Elle joue un rôle essentiel dans le maintien de la pression oncotique intravasculaire et dans le transport de nombreuses substances endogènes <sup>[56]</sup>.

De façon empirique, elle est définie ainsi : « protéine soluble dans l'eau en absence de sels », définition qui permet de marquer l'opposition aux  $\gamma$ -globulines qui sont insolubles dans les mêmes conditions <sup>[57]</sup>. De façon un peu plus générale, Peters <sup>[58]</sup> avance comme critères de reconnaissance d'une sérum albumine : **a)** molécule soluble en solution aqueuse, **b)** molécule ayant un poids moléculaire d'approximativement 66000 Da, **c)** non glycoprotéine c'est-à-dire ne contenant pas de carbohydate dans sa constitution.

#### ***1.2.4.2. Composition et structure de la SAB***

Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique hydrosoluble de 582 acides aminés. La composition de la SAB a été publiée pour la première fois par Brown *et al* en 1975. Elle est présentée dans le tableau I.3 <sup>[59]</sup>.

<b>Acide aminé</b>	<b>Nombre de résidus</b>
Glycine : G	16
Alanine : A	46
Valine : V	36
Leucine : L	61
Isoleucine : I	14
Méthionine : M	4
Phénylalanine : F	27
Tryptophane : W	2
Proline : P	28
Serine : S	28
Thréonine : T	34
Cystéine : C	35
Tyrosine : Y	19
Asparagine : N	13
Glutamine : Q	20
Acide aspartique : D	41
Acide glutamique : E	59
Histidine : H	17
Lysine : K	59
Arginine : R	23
<b>Total</b>	<b>582</b>

***Tableau I.3 : Composition en acides aminés de la SAB.***

Son poids moléculaire est d'environ 66000 Da. Elle ne comprend pas d'hydrate de carbone et se caractérise par un taux bas de tryptophane (2 résidus) et de méthionine (4 résidus) et un nombre élevé de résidus cystéine et d'acides aminés chargés (acide aspartique, acide glutamique, lysine et arginine).

La structure secondaire comprend neuf boucles, chacune subdivisée en 3 (triplet) et 17 ponts disulfures assurent la stabilité de l'ensemble (voir figure I.4). Son extraction à partir du plasma est assez facile, sa cristallisation étant relativement simple à réaliser. Son pH isoélectrique est acide, mais dans la mesure où l'albumine a la capacité de se lier à de nombreuses molécules, il est difficile d'en donner une valeur exacte : il varie de 4,8 , lorsque les acides gras sont transportés, à 5,3 lors de liaisons avec des substances sans lipide. L'albumine est une protéine stable, qui ne se dénature pas facilement.

De la composition en acides aminés nous pouvons déduire la composition atomique de la protéine, c'est-à-dire le nombre d'atomes de carbone, d'azote, d'oxygène et de soufre par molécule de SAB Le tableau I.4 donne le nombre d'atomes pour chaque élément.

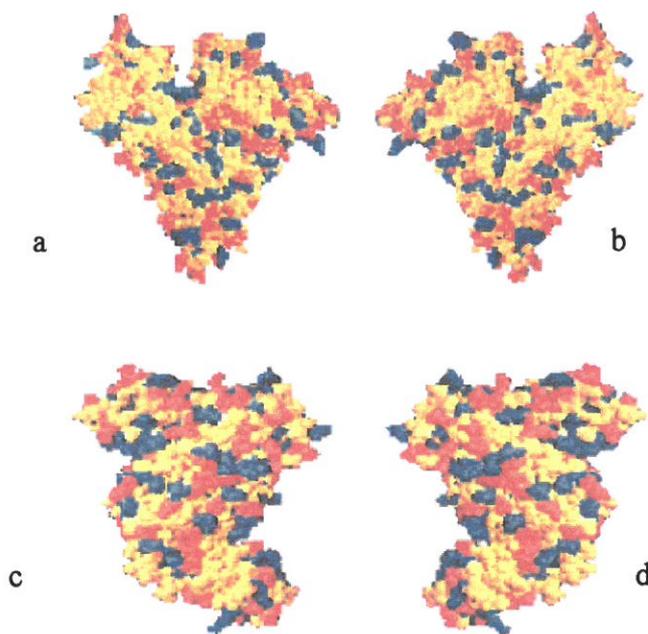
Nombres d'atomes	C	N	O	S
SAB	2926	779	897	39

**Tableau I.4 :** Composition atomique de la SAB (calculée à partir du Tableau I.3)

#### ***1.2.4.3. Propriétés physico-chimiques***

La molécule d'albumine SAB n'est pas uniformément chargée dans la structure primaire. Au pH neutre, Peters (1985) a calculé une charge nette de -10, de -8, et de 0 pour les domaines I, II, et III respectivement. La distribution de charge extérieure est montrée sur le schéma en dessous.

À la différence de la distribution asymétrique de charge sur la structure primaire, la distribution sur la structure tertiaire semble assez uniforme.



**Figure I.5 :** Modèle de la molécule d'albumine de sérum bovin avec les résidus basiques colorés en bleu, acides en rouge, et neutres en jaune. (a) Vue de face, (b) vue arrière, (c) côté gauche, et (d) côté droit <sup>[60]</sup>.

Les constantes physiques de la SAB sont rapportées dans le tableau I.5:

<b>SAB</b>	
Poids moléculaire	66000 g/mol
Point isoélectrique	4,5
Constante de diffusion, D	$5,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$
Volume partiel spécifique, V	$0,733 \text{ cm}^3/\text{g}$

**Tableau I.5:** Constantes physiques de la SAB à pH = 7 (à 20°C dans l'eau)

Enfin, il est à noter que la viscosité d'une solution de protéine dépend de ses caractéristiques intrinsèques, telles que la masse moléculaire, la taille, le volume, la forme, la charge extérieure et la facilité de la déformation. En outre, la viscosité est influencée par des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la concentration ionique, le type d'ion, les états de cisaillement et le traitement thermique. La viscosité des solutions de SAB augmente linéairement avec la concentration jusqu'à  $65 \text{ mg.mL}^{-1}$  et exponentiellement pour des concentrations plus élevées <sup>[61]</sup>.

## **I.3. Le biofilm et l'eau de mer**

### **I.3.1. Biofilm**

Tout matériau immergé dans l'eau de mer naturelle se recouvre d'un voile biologique appelé biofilm. Dans le cas des aciers inoxydables, simultanément au développement bactérien, se produit une modification du comportement électrochimique, indiquant une évolution probable des propriétés de la surface lors d'un contact prolongé avec l'eau de mer.

En milieu aquatique, des cellules microbiennes adhèrent aux surfaces, croissent et se reproduisent ; c'est la phase initiale de formation d'un biofilm. Les conséquences de la présence de ce biofilm sur une surface peuvent être multiples : par exemple, un biofilm de 100 µm d'épaisseur adsorbé sur la coque d'un bateau peut réduire sa vitesse de 8 à 15%. Des études bibliographiques complètes sur le biofilm ont été présentées notamment dans les thèses de V. L'Hostis <sup>[62]</sup> et de N. Le Bozec <sup>[63]</sup>.

#### ***1.3.1.1. Conditions de formation d'un biofilm***

Essentiellement, si toutes les conditions pour former un biofilm ne sont pas réunies, il n'y aura pas de biofilm. D'abord, il faut la présence d'eau liquide. Cependant, la quantité peut être très faible.

Une deuxième condition pour la croissance d'un biofilm est la présence de matières nutritives, qui offrent une source d'énergie. Cette demande est faible : dans un écoulement d'eau, la présence d'une partie pour dix millions est suffisante <sup>[64]</sup>. Ces matières peuvent aussi fournir une source de carbone.

Enfin, il faut une source de micro-organismes pour l'inoculation. Les problèmes rencontrés dans les hôpitaux pour maintenir la stérilité, ou dans les systèmes de refroidissement industriels, montrent la difficulté d'échapper à la présence de bactéries dans l'environnement.

Le biofilm bactérien peut se définir comme une communauté bactérienne, adhérente à une surface et enrobée d'une matrice exopolysaccharidique <sup>[65]</sup>. Son développement répond classiquement à trois étapes successives : l'attachement, la colonisation et l'accroissement <sup>[66]</sup>. L'étape initiale d'attachement fait intervenir, pour certaines espèces, des appendices générateurs de mouvements, qui permettent l'approche de la surface à coloniser <sup>[67]</sup>. Cette approche permet, par le biais de protéines spécifiques, un attachement transitoire et une évaluation de la surface à coloniser. Dans un deuxième temps, une association plus stable

avec la surface elle-même ou avec d'autres micro-organismes déjà présents peut alors s'établir <sup>[68]</sup>.

Ces rassemblements conduisent à la formation de micro-colonies, dont la différenciation cellulaire mène à l'élaboration du biofilm <sup>[69]</sup>. La matrice exopolysaccharidique, dont le volume peut représenter jusqu'à 85% du volume total du biofilm, renforce sa structure, tout en lui conservant une grande plasticité. L'organisation d'un réseau de canaux aqueux au sein du biofilm permet l'acheminement de l'oxygène et des nutriments entre les microcolonies et vers les régions les plus enfouies, ainsi que l'évacuation des déchets. Toutefois, un gradient de nutriments et d'oxygène existe depuis la superficie vers la profondeur du biofilm, où l'environnement devient plus propice aux organismes évoluant en anaérobiose. Ainsi, l'état métabolique d'une bactérie au sein du biofilm peut être directement dépendant de sa localisation à l'intérieur de la structure <sup>[70]</sup>.



*Figure I.6 : Biofilm bactérien observé en microscopie électronique à transmission <sup>[71]</sup>.*

Les bactéries (organisme unicellulaire, procaryote) sont omniprésentes dans le milieu marin. Elles sont parmi les premiers organismes à coloniser toute surface immergée dans l'eau de mer, y compris les animaux et les végétaux. La formation de ces biofilms a été démontrée sur des surfaces artificielles, mais également sur des poissons <sup>[72]</sup>. Cette symbiose permet aux bactéries de se développer dans un environnement constamment renouvelé en nutriments et aux poissons d'être enduits d'un mucus (composé d'exopolymères) qui leur confère une meilleure pénétration dans l'eau.

### **I.3.2. Composition de l'eau de mer**

La salinité moyenne de l'eau de mer est de 35 g/kg, et reste généralement comprise

entre 30 g/kg (Nord Atlantique) et 40 g/kg (Mer rouge). Les exceptions concernent des mers fermées ou semi-fermées, avec comme valeurs extrêmes : 6 g/kg dans les eaux de surface de la mer Baltique ; 330 g/kg dans la Mer morte. Le pH de l'eau de mer est proche de 8,2. Les gaz dissous comprennent principalement : 64% d'azote, 34% d'oxygène, 1,8% de dioxyde de carbone.

La grande particularité de l'eau de mer est que les proportions relatives de ses constituants sont sensiblement constantes (c'est-à-dire indépendantes de la salinité) ; cette propriété a été établie par le chimiste écossais W. Dittmar, et permet de considérer l'eau de mer comme une solution contenant onze constituants (voir le tableau I.6) :

Espèces majeures	Concentration ( $\text{mol.kg}^{-1}$ )
Chlorure ( $\text{Cl}^-$ )	$5,5 \cdot 10^{-1}$
Sodium ( $\text{Na}^+$ )	$4,7 \cdot 10^{-1}$
Sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	$2,8 \cdot 10^{-2}$
Magnésium ( $\text{Mg}^{++}$ )	$5,3 \cdot 10^{-2}$
Calcium ( $\text{Ca}^{++}$ )	$1,0 \cdot 10^{-2}$
Potassium ( $\text{K}^+$ )	$1,0 \cdot 10^{-2}$
Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ , $\text{CO}_3^{2-}$ )	$2,3 \cdot 10^{-3}$
Brome ( $\text{Br}^-$ )	$7,7 \cdot 10^{-4}$
Acide Borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	$4,2 \cdot 10^{-4}$
Strontium ( $\text{Sr}^{++}$ )	$9,1 \cdot 10^{-5}$
Fluor ( $\text{F}^-$ )	$6,8 \cdot 10^{-5}$

**Tableau I.6:** Composition moyenne de l'eau de mer – Eléments majeurs en  $\text{mol.kg}^{-1}$ .

L'eau de mer contient également de la matière organique qui est plus difficile à analyser du fait de sa faible concentration ; les différentes formes constituant cette matière organique sont de ce fait difficiles à isoler. Par filtration (porosité  $0,5 \mu\text{m}$ ), il est cependant possible de séparer les matières dissoutes des matières organiques particulaires. Les matières organiques dissoutes sont constituées de polysaccharides ( $2,5\text{-}25 \text{ mg.L}^{-1}$ ), d'oses ( $0,25\text{-}0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ ), d'acides aminés ( $50\text{-}200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), d'acides organiques ( $5\text{-}50 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) et aromatiques (<

1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), d'acides gras (1-20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Les matières particulaires, quant à elles, sont principalement constituées d'animaux et végétaux et de leurs résidus.

#### **I.4. Les biocides**

On a souvent besoin de diminuer le nombre de bactéries et de micro-organismes présent sur une surface donnée. Ceci peut être effectué avec des biocides, des produits chimiques qui sont toxiques pour les micro-organismes. Il y a différents types de biocides. On peut les classer en deux catégories: les agents oxydants et les agents non-oxydants. Les agents oxydants détruisent les micro-organismes par oxydation chimique en pénétrant la paroi cellulaire et en perturbant leur métabolisme. Les agents non-oxydants réagissent avec des constituants précis de la cellule ou inhibent certains processus métaboliques. Leur activité est sélective et généralement indépendante du pH.

A titre d'exemple pour les biocides oxydants <sup>[73]</sup>, on peut citer le chlore ( $\text{Cl}_2$ ) et ses dérivés (acide hypochloreux, hypochlorite de sodium, hypochlorite de calcium, monochloramine, dichloroisocyanurate de sodium), le brome et ses dérivés (acide hypobromeux, hypobromite et bromamine), bioxyde de chlore ( $\text{ClO}_2$ ) et ozone ( $\text{O}_3$ ). Pour les biocides non-oxydants, parmi les plus utilisés, on distingue : les aldéhydes, les sels d'ammonium quaternaire, les thiocarbamates, les thiocyanates..... Ces derniers sont plutôt employés pour la désinfection des circuits d'eau industriels. Ils sont en général moins corrosifs que les biocides oxydants. Dans tous les cas, il faut tenir compte de la réactivité de certains matériaux avec le biocide utilisé. Ils sont souvent utilisés conjointement avec des tensio-actifs jouant le rôle de bio-dispersants. Ils attaquent les micro-organismes en réagissant avec des constituants cellulaires précis ou en perturbant leur métabolisme.

Dans notre étude, nous avons étudié principalement deux biocides oxydants, l'acide hypochloreux  $\text{HClO}$  d'origine inorganique et des chloramines, d'origine organique.

##### **I.4.1. L'acide hypochloreux**

Le chlore est le biocide industriel le plus utilisé aujourd'hui. Il est utilisé pour la désinfection des eaux domestiques. La quantité de chlore que l'on doit ajouter dans l'eau est déterminée par plusieurs facteurs à savoir la demande en chlore, le temps de contact, le pH, la température de l'eau, le volume d'eau et la quantité de chlore perdu par aération.

Quand le dichlore (gaz) pénètre dans l'eau, il s'hydrolyse pour former de l'acide hypochloreux. Ce dernier est responsable des réactions d'oxydation avec le cytoplasme des micro-organismes, après diffusion à travers les membranes cellulaires. Le chlore perturbe ensuite la production d'ATP (adenosine triphosphate), une molécule importante intervenant dans les mécanismes de respiration. Les bactéries qui sont présentes dans l'eau meurent suite à des problèmes respiratoires, provoqués par l'activité du chlore. La quantité de chlore que l'on doit ajouter pour inhiber la croissance des bactéries dépend du pH. Plus le pH est élevé, plus on doit ajouter de chlore pour tuer les bactéries indésirables. Quand le pH est compris entre 8 et 9, on doit ajouter 0,4 ppm de chlore. Quand le pH est compris entre 9 et 10, on doit ajouter 0,8 ppm de chlore.

En milieu marin, on utilise l'acide hypochloreux comme agent antisalissure en le produisant via un processus électrochimique. Un auto-nettoyant des dispositifs optiques tels que des caméras de surveillance et des capteurs via l'oxydation électrochimique des ions chlorure. Cette génération peut se faire soit sur une électrode auxiliaire au voisinage du dispositif à protéger, soit, comme dans le procédé CNRS-IFREMER, à la surface même de la fenêtre à protéger recouverte d'un film  $\text{SnO}_2$  [74-75].

#### **I.4.2. Biocide organique : les chloramines**

La formule générale des chloramines est  $\text{RN-Cl}$  : l'atome de chlore possède un caractère oxydant puisqu'il est au degré d'oxydation (+I) [76]. L'odeur et la saveur de l'eau ont été améliorées grâce à l'utilisation de chloramines depuis le début du 21ème siècle. Dans certains cas, les chloramines sont aussi utilisées pour la désinfection de l'eau. Les travaux de Momba *et al* [77-78] montrent le rôle important de la chloramine pour le traitement des eaux et son efficacité pour empêcher la croissance et l'accrochage des bactéries.

Les chloramines sont formées lors d'une réaction entre le dichlore ( $\text{Cl}_2$ ) et l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Ce sont des amines qui contiennent au moins un atome de chlore directement lié à un atome d'azote. On trouve deux classes de chloramines, inorganiques et organiques. Les chloramines inorganiques sont formées quand le chlore dissous et l'ammoniaque réagissent. Lors de cette réaction, trois chloramines différentes sont formées; monochloramine ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), dichloramine ( $\text{NHCl}_2$ ) et trichloramine ( $\text{NCl}_3$ ). Les chloramines organiques sont dus à l'interaction de la matière organique qui se trouve dans le milieu et l'acide hypochloreux. Le chlore libre, les chloramines organiques et inorganiques sont chimiquement reliées et peuvent se transformer l'une en l'autre assez facilement. Ces composés ne peuvent être trouvés sous

formes isolées. Les chloramines inorganiques ne sont pas persistantes ; cependant, ces composés sont plus persistants que le dichlore. Des recherches ont montré que la durée de demi-vie des chloramines inorganiques peut varier d'une minute à 23 jours, cette demi-vie dépendant de l'environnement dans lequel les chloramines se trouvent.

Les chloramines peuvent être utilisées comme agent de blanchiment, comme désinfectant et comme oxydant. Les chloramines diffusent lentement le chlore, entraînant une désinfection plus diffuse et moins agressive que celle produite par l'ion hypochlorite  $\text{OCl}^-$ . Elles peuvent être utilisées pour améliorer l'odeur et la saveur de l'eau lorsque le chlore est utilisé comme désinfectant. Elles sont aussi utilisées pour la désinfection des eaux usées, de l'eau destinée à la consommation, et pour empêcher les biofilms dans les systèmes de refroidissement.

De très nombreuses études, dans le domaine biomédical, se sont intéressées à l'interaction entre  $\text{HOCl}$  et des protéines. Cette interaction serait, notamment, à l'origine des premiers stades de développement de l'athérosclérose. En effet, la myéloperoxydase (enzyme produite par les polynucléaires neutrophiles) catalyse la réaction entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  et les ions chlorure, conduisant à la formation de  $\text{HClO}$  [79-80-81], lequel, en excès, peut provoquer des lésions des tissus [82]. Hawkins *et al.* [83-84-85] ont montré que l'oxydation de protéines par  $\text{HClO}$  entraîne la formation de groupements chloramines. Les mêmes auteurs ont également montré que l'acide hypochloreux interagissait préférentiellement avec les chaînes latérales contenant des fonctions amine primaire, par exemple lysine, créant des liaisons N-Cl conduisant à la formation de groupement chloramines portés par le squelette de la protéine, eux mêmes, pouvant évoluer vers la formation de radicaux centrés sur un atome d'azote.

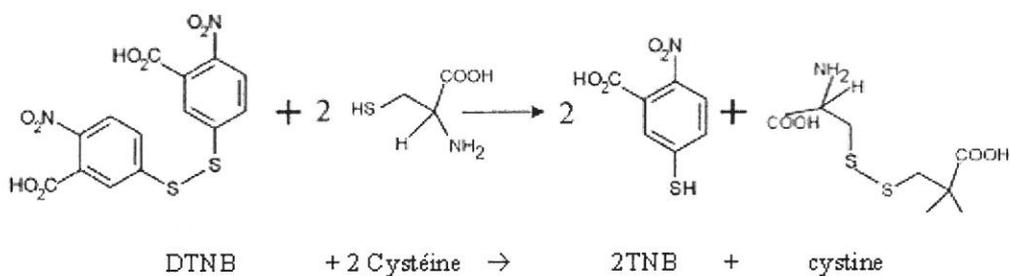
## **I.5. Détection des chloramines et leur dosage**

Après avoir donné une vue générale sur la définition des chloramines et sur leur production, nous nous intéressons à leur identification et leur dosage.

Citons à titre d'exemple les travaux de C. Winterbourn *et al* [86-87] sur l'identification des groupements chloramines en utilisant le monochlorodimedon (MCD) et le 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) comme réactifs. Ce dernier est le plus utilisé car il réagit plus rapidement que le premier. D'autres auteurs [88] se sont intéressés à la caractérisation des

chloramines en utilisant comme réactifs le 3,3', 5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) et le dihydrorhodamine.

Dans notre travail, le réactif utilisé est le TNB<sup>[89]</sup>. Son coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon_M$ ) est de l'ordre de  $14,25 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à  $25 \text{ °C}$ <sup>[90]</sup>. Lors de sa réaction avec les chloramines, il se forme un complexe de couleur jaune intense, que l'on détecte par spectroscopie UV-visible à 412 nm. On le forme à partir de la réaction du DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitobenzoic acid)) avec des cystéines suivant le schéma I.7, la réaction étant effectuée dans un tampon phosphate.



**Schéma I.7 :** La réaction classique de Ellman<sup>[91]</sup>

En fonction du temps, le TNB réagit avec les chloramines (R-NH-Cl) pour former à nouveau le DTNB en perdant la coloration (couleur blanche) suivant la réaction suivante :



En appliquant la loi de Beer-Lambert, on peut doser les chloramines qui se trouvent dans la solution.

$$D = \epsilon_M \cdot l \cdot C$$

Avec :

D : Absorbance

C : Concentration de la substance dans la solution

l : trajet optique (cm)

$\epsilon_M$  : Coefficient d'absorption moléculaire ou coefficient d'extinction molaire ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

## Références du chapitre I

---

- <sup>1</sup> A. Messad, Thèse de doctorat de l'université Paris7-Denis Diderot, 1993.  
« Structure et propriétés électroniques de couches minces de dioxyde d'étain élaborées par pyrolyse d'un aerosol (« Spray »).
- <sup>2</sup> E.A. Morais, L.V.A. Scalvi, V. Geraldo, R.M.F. Scalvi, S.J.L. Ribeiro, C.V. Santilli, S.H. Pulcinelli, *J. European Ceramic Soc.* **24** (2004) 1857.
- <sup>3</sup> H. Miao, C. Ding, H. Luo, *Microelectronic Engineering* **66** (2003) 142.
- <sup>4</sup> T. Brousse, D.M. Schleich, *Sensors and Actuators B* **31** (1996) 77.
- <sup>5</sup> G. Jain, R. Kuma, *Optical Materials* **26** (2004) 27.
- <sup>6</sup> T. El Moustafid, H. Cachet, B. Tribollet, D. Festy, *Electrochim. Acta* **47** (2002) 1209.
- <sup>7</sup> E.E. Kohnke, *Phys. Chem. Solids* **23** (1962) 1557.
- <sup>8</sup> G. Heiland, *Sensors and Actuators B* **2** (1982) 343.
- <sup>9</sup> J. Maier and W. Goepel, *J. Solid State Chem.* **72** (1988) 293.
- <sup>10</sup> W. Goepel, K. Schierbaum, H.D. Wiemhoefer, J. Maier, *Solid State Ionics* **32** (1989) 440.
- <sup>11</sup> M. Nagasawa, S. Shionoya, S. Makishima, *J. Appl. Phys.* **4** (1965) 195.
- <sup>12</sup> A. Messad, J. Bruneaux, H. Cachet, M. Froment, *J. Mater. Sci.* **29** (1994) 5095.
- <sup>13</sup> N.N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, 2nd Edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1997.
- <sup>14</sup> Données industrielles, économiques, géographiques sur les principaux produits chimiques, métaux et matériaux, <http://www.sfc.fr/donnees/metaux/sn/textsn.htm>.
- <sup>15</sup> M.J. Fuller, M.E. Warwick, *J. Catal.* **29** (1973) 441.
- <sup>16</sup> Y. Teraoka, T. Harada, T. Iwasaki, T. Ikeda, S. Kagawa, *Chem. Lett.* (1993) 773.
- <sup>17</sup> N. Tagushi, Gas-detecting device, US Patent N° 3631436, 1970.
- <sup>18</sup> N. Jaffrezic-Renault, C. Pijolat, A. Pauly, J. Brunet, C. Varenne, M. Bouvet, P. Fabry, *Materials for chemical sensors, Actualité Chimique (Mars 2002)* 157.
- <sup>19</sup> M. Morimitsu, Y. Ozaki, S. Suzuki, M. Matsunaga, *Sensors and Actuators B* **67** (2000) 184.
- <sup>20</sup> A. Chiorino, G. Ghiotti, F. Prinetto, M.C. Carotta, G. Martinelli, M. Merli, *Sensors and Actuators B* **44** (1997) 474.
- <sup>21</sup> G. Tournier, C. Pijolat, R. Lalauze, B. Patissier, *Sensors and Actuators B* **26** (1995) 24.
- <sup>22</sup> A. Cirera, A. Cabot, A. Cornet, J.R. Morante, *Sensors and Actuators B* **78** (2001) 151.
- <sup>23</sup> G. Ghiotti, A. Chiorino, W. Pan, L. Marchese, *Sensors and Actuators B* **7** (1992) 691.

- 
- <sup>24</sup> J. Santos-Pena, T. Brousse, L. Sanchez, J. Morales, D.M. Schleich, J. Power Sources **97** (2001) 232.
- <sup>25</sup> T. Brousse, O. Crosnier, X. Devaux, P. Fragnaud, P. Paillard, J. Santos-Pena, D.M. Schleich, J. Power Technol. **128** (2002) 124.
- <sup>26</sup> N.R. Armstrong, A.W.C. Lin, M. Fujihira, T. Kuwana, Anal. Chem. **48** (1976) 4.
- <sup>27</sup> Ch. Comninellis, Informations chimie, **357** (1994) 109.
- <sup>28</sup> Ch. Comninellis, I. Chem. E. Symposium Series **127** (1992) 189.
- <sup>29</sup> O. Tabata, J.M. Blocher, H.E. Hintermann, L.H. Hall (Eds) Proc. 5th Int. Conf. On Chemical Vapour Deposition, The Electrochemical Society, Princeton, NY (1975) 681.
- <sup>30</sup> M. Watanabe, Jpn. J. Appl. Phys. **9** (1970) 418.
- <sup>31</sup> E. Leja, A. Kolodziej, T. Pisarkiewicz, T. Stapinski, Thin Solid Films **76** (1981) 283.
- <sup>32</sup> J.H. Morgan, D.E. Brodie, Can. J. Phys. **60** (1982) 1387.
- <sup>33</sup> H. Dislich, E. Hussmann, Thin Solid Films **77** (1981) 129.
- <sup>34</sup> K. L. Chopra, S. Major, D.K. Pandya, Thin Solid Films **102** (1983) 1.
- <sup>35</sup> K.R. Prasad, N. Miura, Electrochem. Comm. **6** (2004) 849.
- <sup>36</sup> E. Shanthi, A. Banerjee, V. Dutta, K.C. Chopra, J. Appl. Phys. **53** (1982) 1615.
- <sup>37</sup> J.C. Manificier, J.P. Fillard, Thin Solid Films **77** (1981) 67.
- <sup>38</sup> J. Bruneaux, H. Cachet, M. Froment, M. Levart, J. Vedel, J. Microsc. Spectrosc. Electron. **14** (1989) 1.
- <sup>39</sup> J. Bruneaux, H. Cachet, M. Froment, A. Messad, Thin Solid Films **197** (1991) 129.
- <sup>40</sup> <http://www.callisto.si.usherb.ca/~bcm514/1.html>.
- <sup>41</sup> E. Dickinson, D.J. Mc Clements, *Advances in Food Colloids*, Chapter 2, Blackie, Glasgow (1995).
- <sup>42</sup> A. Aschi, thèse de doctorat de l'université Paris XI, 2001.  
« Effets du chlorure de guanidinium sur la structure et les propriétés de la caséine -  $\beta$  en solution et à l'interface avec l'air ».
- <sup>43</sup> J. Hu, S. Li, B. Liu, Biochemical Engineering Journal **23** (2005) 259.
- <sup>44</sup> Y. Yu, G. Jin., J. Colloid and Interface Science **283** (2005) 477.
- <sup>45</sup> J.I. Anzai, Bei Guo, Tetsuo Osa, Bioelectrochemistry and Bioenergetics **40** (1996) 35.
- <sup>46</sup> P. Ying, G. Jin, Z. Tao, J. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **33** (2004) 259.
- <sup>47</sup> K. Rezwan, L. P. Meier, L. J. Gauckler, J. Biomaterials **26** (2005) 4351.
- <sup>48</sup> L. Coquet, P. Cosette, G. A. Junter, E. Beucher, J. M. Saiter, T. Jouenne, J. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **26** (2002) 373.

- 
- <sup>49</sup> S. Fukuzaki, H. Urano, K. Nagata, Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, 5301 (1995) 12.
- <sup>50</sup> C. Rubio, D. Costa, M. N. Bellon-Fontaine, P. Relkin, C. M. Pradier, P. Marcus, Colloids and Surfaces B : Biointerfaces **24** (2002) 193.
- <sup>51</sup> S. Oscarsson, J. Chromatography B **699** (1997) 117.
- <sup>52</sup> F. Yin, Y. Zhang, Y. Wu, Y. Cai, Q. Xie, S. Yao, Anal. Chim. Acta **444** (2001) 271.
- <sup>53</sup> Q. Xie, C. Xiang, Y. Yuan, Y. Zhang, L. Nie, and S. Yao, J. Colloid and Interface Science **262** (2003) 107.
- <sup>54</sup> Z.G. Pen, K. Hidajat, M.S. Uddin, J. Colloid and Interface Science **271** (2004) 277.
- <sup>55</sup> C. Poleunis, C. Rubio, C. Compère, P. Bertrand, Surface and Interface Analysis **34** (2002) 55.
- <sup>56</sup> P. Lefèvre, C. Badetti, « Métabolisme de l'albumine », Ann Fr Anesth Réanim **15** (1996) 464.
- <sup>57</sup> J.R. Brown, Structure of Bovine serum albumin, Fed Proc **34** (1975) 591.
- <sup>58</sup> T. Peters, Serum albumin. Advances in protein chemistry **37** (1985) 161.
- <sup>59</sup> C. Rubio, thèse de doctorat de l'université de Paris 6, (2002).  
« Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention ».
- <sup>60</sup> <http://www.friedli.com/research/PhD/chapter5a.html>.
- <sup>61</sup> R. Wetzal, M. Becker, J. Behlke, H. Billwitz, S. Bohm, B. Ebert, H. Hamann, J. Krumbiegel, G. Lasmann, J. Biochem. **104** (1980) 469.
- <sup>62</sup> V. L'Hostis, thèse de Doctorat de l'université de Paris 6, (2002).  
« Rôle enzymatique d'un biofilm sur la corrosion d'aciers inoxydables immergés en eau de mer naturelle ».
- <sup>63</sup> N. Le Bozec Thèse de Doctorat de l'université de Bretagne Occidentale, (2000).  
« Réaction de réduction de l'oxygène sur les aciers inoxydables en eau de mer naturelle. Influence du biofilm sur le processus de corrosion ».
- <sup>64</sup> A. M. Pritchard, Matériaux et Techniques **9/10** (2002) 3.
- <sup>65</sup> J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Science **284** (1999) 1318.
- <sup>66</sup> L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, P. Stoodley, Nat. Rev. Microbiol. **2** (2004) 95.
- <sup>67</sup> G.A. O'Toole, R. Kolter, Mol. Microbiol. **30** (1998) 295.

- 
- <sup>68</sup> S.M. Hinsla, M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos, G. A. O'Toole, *Mol. Microbiol.* **49** (2003) 905.
- <sup>69</sup> P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies, J.W. Costerton, *Ann. Rev. Microbiol.* **56** (2002) 187.
- <sup>70</sup> G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter, *Ann. Rev. Microbiol.* **54** (2000) 49.
- <sup>71</sup> O. Etienne thèse de Doctorat de l'université LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I, (2004) « Développement d'interfaces à propriétés antimicrobiennes par la fonctionnalisation de multicouches de polyélectrolytes » .
- <sup>72</sup> R.M. Weiner, *Trends in Biotechnology* **15** (1997) 390.
- <sup>73</sup> F. Moran, *Matériaux et Techniques* **9/10** (2002) 9.
- <sup>74</sup> H. Cachet, M. Froment, F. Zenia, *J. Electrochem. Soc.* **143** (1996) 442.
- <sup>75</sup> D. Festy, B. Tribollet, H. Cachet, *Matériaux et Techniques* **7/8** (2002) 37.
- <sup>76</sup> E.L. Thomas, M.B. Grisham, M.M. Jefferson, *Methods in enzymology* **132** (1986) 569.
- <sup>77</sup> M.N.B. Momba, T.E. Cloete, S.N. Venter, R. Kfir, *Water Research* **33** (1999) 2937.
- <sup>78</sup> M.N.B. Momba, T.E. Cloete, S.N. Venter, R. Kfir, *Water Sci Technol.* **38** (1998) 283.
- <sup>79</sup> A.V. Peskin, C.C. Winterbourn, *Free Radical Biology and Medicine* **40** (2006) 45.
- <sup>80</sup> A.V. Peskin, C.C. Winterbourn, *Free Radical Biology and Medicine* **35** (2003) 1252.
- <sup>81</sup> A.V. Peskin, C.C. Winterbourn, *Free Radical Biology and Medicine* **30** (2001) 572.
- <sup>82</sup> A.L.P. Chapman, R. Senthilmohan, C.C. Winterbourn, A. J. Kettle, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **377** (2000) 95.
- <sup>83</sup> C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Biochem. J.* **332**(1998) 617.
- <sup>84</sup> C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Biochem. J.* **340** (1999) 539.
- <sup>85</sup> C.L. Hawkins, M.D. Rees, M.J. Davies, *FEBS Lett* **510** (2002) 41.
- <sup>86</sup> A.L.P. Chapman, C.C. Winterbourn, S.O. Brennan, T.W. Jordan, A. Kettle, *Biochem. J.* **375** (2003) 33.
- <sup>87</sup> M.C.M. Vissers, C.C. Winterbourn, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **285** (1991) 53.
- <sup>88</sup> J.M. Dybukt, C. Bishop, W.M. Brooks, B. Thong, H. Eriksson, A.J. Kettle, *Free Radical Biology and Medicine* **39** (2005) 1468.
- <sup>89</sup> M.S. Studebaker, H. Zhang, G.E. Means, *Anal. Biochem.* **237** (1996) 193.
- <sup>90</sup> P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, *Anal. Biochem.* **312** (2003) 224.
- <sup>91</sup> O. Nekrassova, N.S. Lawrence, R.G. Compton, *Electroanalysis* **15** (2003) 1655.

## **CHAPITRE II**

# **MATERIELS ET METHODES**

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre a pour but de présenter les matériels et les méthodes expérimentales (électrochimiques, observations et d'analyses) utilisés au cours de cette étude. Une description des électrodes de travail utilisées, des montages effectués permet, dans un premier temps, de fixer une démarche expérimentale assurant une bonne reproductibilité des résultats. Des méthodes biochimiques seront à leur tour présentées permettant d'apporter des informations complémentaires aux résultats issus des techniques électrochimiques.

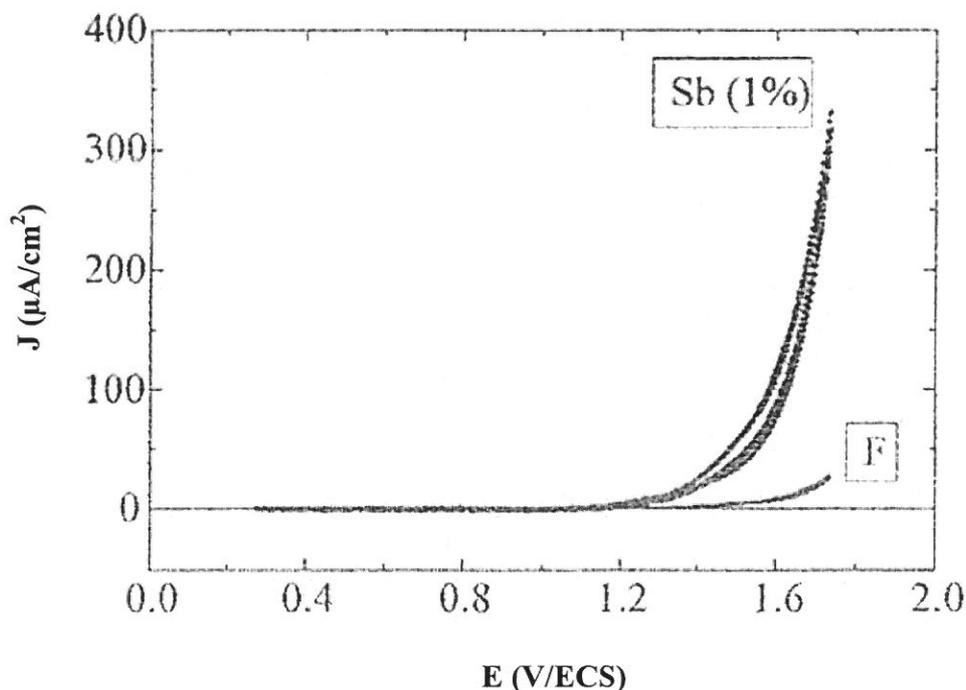
### II.1. Matériels

#### II.1.1. Couches de SnO<sub>2</sub>

Dans notre étude, les films de SnO<sub>2</sub> ont été déposés sur différents substrats (verre, quartz) afin de l'adapter aux différentes techniques de mesures (chronoampérométrie, spectroscopie d'impédance électrochimique et électrogravimétrie). Les couches SnO<sub>2</sub> déposées par pyrolyse d'un aérosol (spray)<sup>[1]</sup> présentent des propriétés électriques et structurales différentes suivant les conditions de dépôt qui sont :

- (i) La température de formation du film (400 – 600 °C).
- (ii) La concentration en précurseur d'étain (0,2M SnCl<sub>4</sub> dans le méthanol en standard).
- (iii) La nature et la concentration du dopant, soit le fluor par ajout de NH<sub>4</sub>F (F/Sn=0,7), soit l'antimoine par ajout de SbCl<sub>3</sub> (Sb/Sn=0,02) à la solution méthanolique de SnCl<sub>4</sub>.

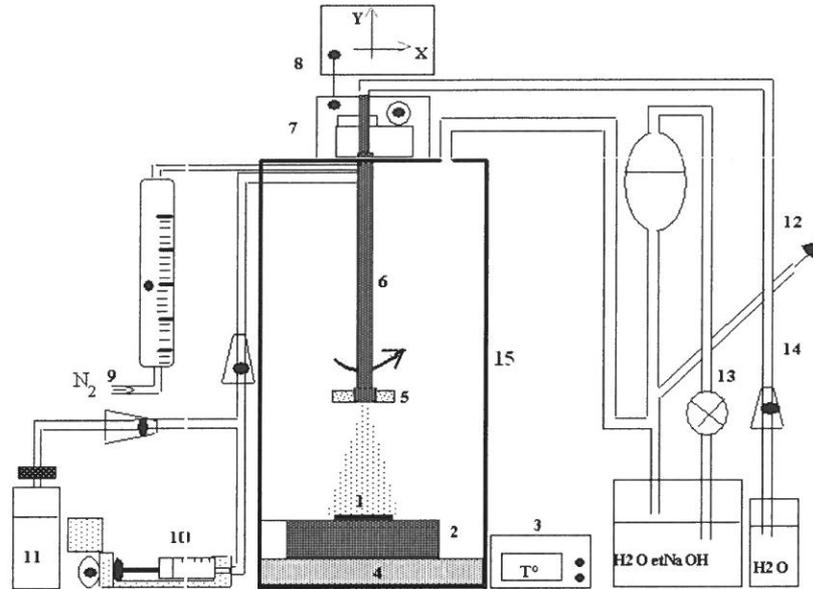
D'une manière générale, nous avons utilisé des films SnO<sub>2</sub> déposés par la méthode de pyrolyse de spray à 500 °C, constitués de deux couches superposées, selon le procédé CNRS-IFREMER de protection de hublots immergés en milieu marin<sup>[2]</sup>. La couche interne sur le substrat est une couche dopée au fluor SnO<sub>2</sub>:F très conductrice, d'épaisseur environ 300 nm. Elle est recouverte d'une couche dopée à l'antimoine SnO<sub>2</sub>:Sb, d'épaisseur environ 100 nm, dont le rôle est double. Par comparaison au dopage F, d'une part, elle améliore la stabilité électrochimique du film, d'autre part, elle permet de réduire la surtension nécessaire pour produire le chlore par oxydation des ions chlorure<sup>[3]</sup> (Figure. II.1).



**Figure II.1 :** Réponse électrochimique de couches  $\text{SnO}_2$  respectivement dopées au fluor (F) et à l'antimoine ( $\text{Sb}/\text{Sn} = 1\%$ ) au contact d'eau de mer naturelle filtrée. Vitesse de balayage du potentiel :  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

La figure II.2 montre le dispositif de dépôt réalisé au laboratoire, composé d'un système de pulvérisation pneumatique et d'une plaque chauffante dont on contrôle la température. La buse utilisée est réalisée en KELEF compte tenu de l'agressivité des solutions utilisées. Celles-ci sont amenées à la buse par un système de pousse seringue où elles sont dispersées sous forme de gouttelettes suivant un jet conique (angle de dispersion  $18^\circ$ ) grâce à un gaz vecteur (azote) dont le débit est fixé par un débitmètre à bille.

La buse est située à 20 cm à la verticale du substrat. Elle est montée sur un système de balayage en X et Y muni d'une rotule. Le système de chauffage est constitué d'une plaque circulaire (rayon 15 cm) en acier inoxydable. Des résistances chauffantes sont encastrées à l'intérieur de la plaque insérée dans un bloc réfractaire. La température est contrôlée par un thermocouple. Pour éviter l'ébullition de la solution à pulvériser avant qu'elle n'arrive à la buse, un système de refroidissement (circuit fermé) permet de faire circuler de l'eau dans le support de buse grâce à une pompe. Enfin, afin d'éviter la dispersion dans l'air des gaz produits lors du dépôt, il existe un système d'aspiration des effluents gazeux après neutralisation de l'acide chlorhydrique formé à partir des chlorures utilisés comme précurseurs par lavage au contact d'une solution de soude.



*Figure II.2: Schéma du dispositif de spray*

1. Substrat
2. Plaque chauffante munie d'un thermocouple
3. Régulateur thermique
4. Bloc réfractaire pour l'isolation thermique
5. Buse reliée au système de pulvérisation
6. Support de la buse
7. Système mécanique d'entraînement de la buse
8. Électronique de commande du spray
9. Débitmètre à bille pour la mesure du débit du gaz pulvérisateur
10. Pousse seringue à vitesse variable injectant la solution à pulvériser
11. Solution à pulvériser
12. Évacuation des gaz produits lors du dépôt
13. Pompe de circulation pour le lavage des effluents gazeux
14. Circulation du liquide de refroidissement de la buse
15. Enceinte de pulvérisation en Plexiglas

Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé deux types d'électrodes en films minces, déposées soit sur lames de verre, soit sur substrats de quartz piézoélectrique.

### II.1.1.1. Electrodes sur lames de verre

Des lames de verre pour microscopie (dimensions 26 mm x 76 mm) ont été recouvertes d'une couche double  $\text{SnO}_2$  : F/Sb et utilisées comme électrodes de travail. Pour les maintenir sous polarisation, le contact électrique a été établi à l'aide d'un ruban adhésif cuivré. Avant chaque manipulation, les électrodes sont rincées à l'éthanol puis à l'eau bidistillée.

### II.1.1.2. Electrodes sur quartz piézoélectrique

Pour les mesures électrogravimétriques, les électrodes de travail sont fabriquées à partir d'un cristal de quartz de 16 mm de diamètre, d'épaisseur 280  $\mu\text{m}$  et de formule brute  $\text{SiO}_2$ . Ces derniers, fournis par la société Matel-Fordhal (France), sont formés d'une lame de coupe Y-AT. Sur chacune des faces opposées du quartz, a été déposée une couche métallique (de l'or sur du chrome) d'épaisseur 0,1 mm et de surface  $S = 0,2 \text{ cm}^2$ . Ces deux dépôts métalliques constituant les plaques d'un condensateur permettent de maintenir le quartz à sa fréquence de résonance fondamentale de 6 MHz. La face métallique à base de or / chrome en contact avec l'électrolyte est recouverte d'un film  $\text{SnO}_2$  et sert d'électrode de travail.

L'électrode ainsi préparée est fixée (avec une colle époxy sur son pourtour) sur un support rectangulaire (Fig. II.3) de type circuit imprimé sur lequel sont dessinées les pistes (cuivre) assurant les arrivées de courant. L'électrode de quartz est reliée électriquement au circuit en cuivre par de la colle à l'argent.



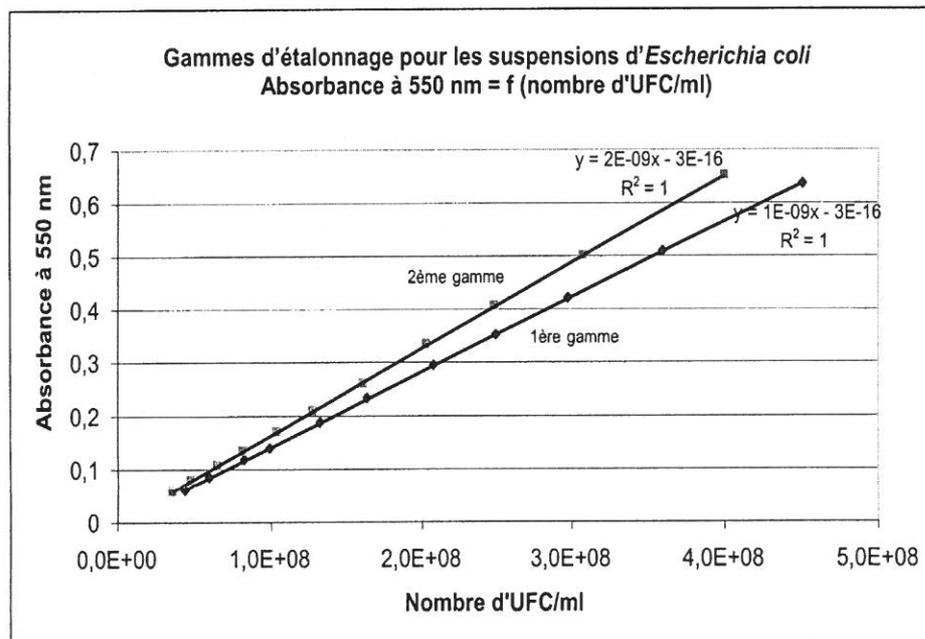
**Figure.II. 3 :** photo d'une électrode sur substrat de quartz avec son support et sa connectique.

### II.1.2. Protéines

Pour étudier l'influence de la matière organique, nous avons utilisé la Sérum Albumine Bovine (SAB). Selon les expériences, nous avons solubilisé de la SAB (Sigma) (voir chapitre I) dans une solution aqueuse de NaCl 0,15M ou 0,5 M à des concentrations variant de 0,05 % (5 mg/mL) à 5 % (50 mg/mL).

### II.1.3. Bactéries

L'étude de l'adhésion et de la croissance bactérienne a été effectuée à l'aide d'une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) fourni par le laboratoire de Génie Biologique de l'université de Compiègne. Les cultures ont été réalisées dans des boîtes de Pétri de diamètre 90 mm, sur lamelles de verre recouvertes par un film de SnO<sub>2</sub>. La concentration bactérienne est de l'ordre de 2 à 5 × 10<sup>7</sup> UFC/mL (Unité Formant Colonie/mL) dans NaCl 0,5M, ce qui correspond à une densité optique (DO) de 0,08-0,1 à 550 nm (figure II.4) <sup>[4]</sup> (pour un trajet optique de 1 cm). Le volume de suspension bactérienne est de 21 mL/ boîte.



**Figure.II.4:** courbes des gammes d'étalonnage

A 37 °C, après 17 heures d'incubation, les lames de verre ont été rincées trois fois à la verticale avec NaCl 0,5 M puis dans une boîte de Pétri, égouttées et fixées au Rembaum pour les observations en Microscopie Electronique à Balayage (MEB), et sans fixation pour les

observations au microscope à fluorescence. Pour cette technique, nous avons utilisé l'iodure de propidium (IP) et l'acridine orange comme colorants.

La suspension bactérienne est préparée dans un bouillon de culture en solubilisant dans de l'eau distillée 8g/L de peptone (Nutrient Broth de « DIFCO » Réf. 234000), puis mise à l'autoclave, ajout d'une suspension d'*E. coli* décongelée à raison de 5-8 mL/500mL de bouillon, puis incubation 17h à 37°C.

### ***II.1.3.1. Protocole expérimental***

Le protocole expérimental comporte les étapes suivantes :

- 24 h avant les expériences, des bactéries congelées sont remises dans un bouillon de culture et incubées à 37 °C de façon à ce qu'elles se multiplient.
- Préparation de 2 litres de solution saline NaCl 0,5M stérile.
- Récupération du bouillon de culture et centrifugation à 4000 tours pendant 10 minutes.
- Reprise du culot avec la solution de NaCl et centrifugation une nouvelle fois. Dilution de la solution saline contenant les bactéries afin d'obtenir une DO d'environ 0,08 à 0,1 soit 2 à 5 x 10<sup>7</sup> bactéries/mL.
- disposition des lames de SnO<sub>2</sub> dans une boîte de Pétri.
- Dépôt sur les lames de 21 mL de suspension bactérienne, suivi d'une incubation à 37°C pendant 17h.
- Sortie des lames, les égoutter, les tremper dans le fixateur et les préparer pour les observations MEB.
- Pour les études de viabilité, il convient de suivre le protocole à l'acridine orange ci-dessous.

### ***II.1.3.2. Détermination de la viabilité des bactéries***

Le principe d'identification des bactéries mortes ou vivantes repose sur l'incorporation sélective de sondes fluorescentes qui marquent l'ADN des bactéries. Selon l'état des parois, la sonde pénètre ou pas. Les sondes utilisées sont :

- L'iodure de propidium (IP), qui est un intercalant de l'ADN pénètrent dans la cellule uniquement si sa membrane est endommagée. Il est excitable à 488 nm et réémet de la fluorescence rouge. IP (M = 668,4 g/mol) est préparé sous forme d'une solution stock à 1

mg/mL dans de l'eau distillée et conservé à l'abri la lumière. La concentration finale d'IP est de 50 µg/mL au moment des observations par microscopie à fluorescence.

- L'acridine orange qui marquent les bactéries vivantes. Il est excitable à 490 nm et réémet de la fluorescence verte. Pour la solution d'acridine orange ( $M = 369,94 \text{ g/mol}$ ), on a dilué 1 mL d'une solution stock dans PBS (Phosphate Buffer solution) (1 :100).

Il faut noter que les observations s'effectuent après l'ajout de volumes égaux des solutions d'acridine orange et d'iodure de propidium.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Techniques électrochimiques

Les techniques électrochimiques permettent d'appréhender les phénomènes de transfert et/ou d'adsorption qui se déroulent à l'interface électrolyte/solution. Dans le cadre de notre étude, les premiers concernent essentiellement l'oxydation des ions chlorure et l'effet sur la surface de l'oxyde d'étain, les seconds concernent plutôt l'interaction protéine-oxyde d'étain. D'un point de vue phénoménologique, l'évolution de la surface du film d'oxyde, quelle qu'en soit la cause, peut être appréhendée par le suivi en fonction du temps du potentiel en circuit ouvert. Si les phénomènes interfaciaux donnent lieu à un changement de masse de l'électrode, la technique *in situ* de la microbalance à quartz constitue l'outil de choix. Enfin, outre le relevé des caractéristiques courant-tension, la spectroscopie d'impédances électrochimiques (SIE) permet de tirer profit du caractère semiconducteur du dioxyde d'étain et de remonter à des valeurs de paramètres physiques décrivant l'état du système (capacité de la double couche, résistance de transfert, capacité de charge d'espace dans le film, ...réponse d'états de surface...).

Dans la suite, nous décrivons brièvement les méthodes électrochimiques utilisées. Elles peuvent être classées selon deux groupes distincts : les méthodes stationnaires et les méthodes dites transitoires.

#### II.2.1.1. Méthodes stationnaires

Les techniques stationnaires permettent d'étudier un système se trouvant dans un état

quasiment d'équilibre thermodynamique ; elles prennent en compte tous les couples redox actifs à l'interface solution/électrode.

#### **a. Suivi du potentiel en circuit ouvert**

Egalement désigné par potentiel d'abandon ou potentiel libre, il s'agit de la grandeur électrochimique la plus immédiatement mesurable. Cette technique simple apporte des informations préliminaires sur la nature des processus en cours, à l'interface électrode de travail/électrolyte : corrosion, passivation,....

#### **b. Courbes de polarisation**

Les courbes de polarisation stationnaires (courant-tension) sont tracées potentiostatiquement en imposant une tension  $V$  entre l'électrode de travail (ET) et l'électrode de référence (REF). Les valeurs obtenues du courant dépendent du temps pendant lequel l'électrode reste polarisée à un potentiel donné. Chaque point de la courbe de polarisation stationnaire correspond à une valeur plus ou moins stable du courant obtenu à la fin du courant transitoire, qui s'établit au moment de la polarisation de l'électrode.

Ces techniques stationnaires sont insuffisantes pour caractériser des mécanismes complexes, mettant en jeu plusieurs étapes réactionnelles et ayant des cinétiques caractéristiques différentes. L'utilisation des techniques transitoires devient alors indispensable.

### ***II.2.1.2. Méthodes transitoires***

#### **a. Voltamétrie cyclique**

Les mesures de voltamétrie cyclique reviennent à effectuer des balayages linéaires en potentiels autour d'une position donnée et d'observer les éventuelles apparition et/ou disparition des phénomènes électrochimiques (oxydation et/ou réduction). Certains paramètres, tels la vitesse de balayage, permettent de rendre compte de la réversibilité de certaines réactions.

## b. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

### 1. Généralités

La mesure de l'impédance électrochimique consiste à étudier la réponse linéaire d'un système électrochimique, suite à une perturbation de faible amplitude du potentiel ou du courant. Le but de cette mesure est de différencier les phénomènes réactionnels par leur temps de relaxation. Seuls les processus rapides sont caractérisés à hautes fréquences ; lorsque la fréquence appliquée diminue, apparaîtra la contribution des étapes plus lentes, comme les phénomènes de transport ou de diffusion des espèces en solution.

En pratique, la mesure d'impédance consiste à surimposer, à un point de fonctionnement stationnaire, une perturbation sinusoïdale  $\Delta E$  de faible amplitude notée  $|\Delta E|$  et de pulsation  $\omega = 2\pi f$  (en  $\text{rad.s}^{-1}$ ) ; le potentiel imposé à l'électrode est égal à  $E(t) = E + \Delta E$  avec  $\Delta E = |\Delta E| \exp(j\omega t)$ . Il en résulte alors un courant sinusoïdal  $\Delta I$  de même pulsation  $\omega$ , superposé au courant stationnaire  $I$ , tel que  $I(t) = I + \Delta I$  avec  $\Delta I = |\Delta I| \exp[j(\omega t - \Phi)]$ ,  $\Phi$  correspondant au déphasage du courant alternatif par rapport au potentiel.

L'objectif de l'analyse d'un spectre d'impédance est d'associer à chacune des étapes observables sur les diagrammes de Nyquist et/ou de Bode des grandeurs physiques représentatives. Ceci peut être abordé par la modélisation du spectre en proposant un circuit électrique équivalent (CEE), composé d'un certain nombre d'éléments simples ; les éléments les plus couramment utilisés sont :

- la résistance  $R$ , (indépendante de la pulsation) ;
- la capacité  $C$  d'admittance  $Y_c = jC\omega$ , ou, plus généralement, l'élément à phase constante défini comme une capacité complexe  $Q$  d'admittance  $Y_Q = Q_0(j\omega)^\alpha$ , où  $\alpha$  est le coefficient de non idéalité ( $0 \leq \alpha \leq 1$ ).
- l'inductance  $L$  d'impédance  $Z_l = jL\omega$ .

L'interprétation des diagrammes par l'intermédiaire de CEE doit respecter deux conditions primordiales :

- tous les éléments du circuit doivent avoir une signification physique précise, associée aux propriétés physiques du système ;
- le spectre simulé à partir du CEE doit être le plus fidèle possible au spectre expérimental et l'erreur ne doit pas présenter de caractère systématique en fonction de la fréquence.

L'impédance électrochimique expérimentale a été déterminée grâce à un analyseur de fonctions de transfert (AFT) couplé à un potentiostat-galvanostat. Le dispositif expérimental utilisé a été un ensemble Solartron Instruments 1260/1287 ( $10^{-3}$ Hz – 100 kHz) sous contrôle du logiciel FRACOM™. En mode potentiostatique, l'amplitude de la perturbation sinusoïdale superposée au potentiel de consigne est de 10 mV.

## ***2. Détermination de la capacité et diagrammes de Mott-Schottky***

### **2.1. Mesures de capacité**

Dans le cas de l'interface SnO<sub>2</sub>/électrolyte, les mesures de capacité interfaciale sont effectuées dans le domaine de potentiel où le courant est nul. Un diagramme d'impédance électrochimique est relevé tous les 50 mV dans un domaine de potentiel d'au moins 1 Volt. La forme du diagramme d'impédance évolue avec le potentiel, caractérisée par une boucle capacitive. Les spectres expérimentaux enregistrés sont analysés et simulés avec le logiciel ZSimpWin™ (Princeton Applied Research). Le choix du circuit équivalent est retenu après plusieurs tests de simulation.

### **2.2. Etude des diagrammes**

Les variations de la capacité interfaciale avec le potentiel appliqué sont analysées sur la base des propriétés semi-conductrices de l'oxyde d'étain en traçant pour un système donné le diagramme de Mott-Schottky. Ce type d'analyse permet principalement de remonter à la densité de porteurs de charges (N) et à la valeur du potentiel de bande plate ( $V_{bp}$ ). Dans le cas des matériaux fortement dopés, ce qui est notre cas, il est nécessaire de prendre en compte dans l'analyse en Mott-Schottky la distribution du potentiel à l'interface, entre la capacité de charge d'espace dans le film  $C_{sc}$  et la capacité de double couche  $C_H$ , toutes deux en série et du même ordre de grandeur <sup>[5]</sup>. La capacité mesurée C en fonction du potentiel appliqué V est donc égale à :

$$1/C = 1/C_{sc} + 1/C_H \qquad \text{Eq. II.1}$$

**2.2.1. Densité de porteurs de charges**

Pour les potentiels supérieurs au potentiel de bande plate ( $V_{bp}$ ), la pente de la régression linéaire de la courbe  $1/C^2 = f(V)$  permet de calculer la densité de porteurs de charges dans la zone de charge d'espace N. En effet, pour un semiconducteur de type n comme le dioxyde d'étain, la relation de Mott et Schottky généralisée s'écrit :

$$1/C^2 = 1/C_H^2 + (2/\epsilon\epsilon_0 eNS^2)(V - V_{bp} - kT/e) \tag{Eq. II.2}$$

ou encore

$$1/C^2 = (2/\epsilon\epsilon_0 NS^2)V - (2/\epsilon\epsilon_0 eNS^2)(V_{bp} + kT/e - 1/C_H^2 (\epsilon\epsilon_0 eNS^2 / 2)) \tag{Eq. II.3}$$

avec «  $\epsilon$  » la constante diélectrique relative du film, «  $\epsilon_0$  » la permittivité du vide, « k » la constante de Boltzmann, « T » la température absolue, « e » la charge élémentaire, « S » la surface de l'échantillon, « N » la densité des porteurs de charges, «  $V_{bp}$  » le potentiel de bandes plates, « A » la pente de la régression linéaire par rapport au potentiel appliqué V (positive pour un type n), « B » l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire.

Finalement, la densité de porteurs de charges N est donnée par :

$$N = 2/\epsilon\epsilon_0 e A S^2 \tag{Eq. II.4}$$

**2.2.2. Potentiel de bande plate**

La valeur du potentiel de bande plate  $V_{bp}$  se déduit de la valeur de l'abscisse à l'origine  $V_0 = B/A$  de la régression linéaire, selon la relation :

$$V_{bp} = V_0 + \epsilon\epsilon_0 eNS^2 / 2C_H^2 - kT/e \tag{Eq. II.5}$$

Si, en outre, il y a une variation  $\Delta Q_s$  de la charge de surface (due par exemple à des effets de corrosion), il en résulte un glissement du potentiel de bandes plates égal à  $\Delta Q_s / C_H$  [6]. Le potentiel de bande plate devient :

$$V_{bp} = V_0 + \varepsilon\varepsilon_0 eNS^2 / 2C_H^2 + \Delta Q_s / C_H - kT/e \quad \text{Eq. II.6}$$

$V_{bp}$  est une caractéristique intrinsèque de l'oxyde, qui ne dépend que des conditions physico-chimiques de la solution (anions, cations, pH...).

### II.2.1.3. Microbalance à cristal de quartz

#### a. Principe

Une microbalance à quartz est un dispositif permettant de mesurer les changements de la fréquence de résonance du quartz occasionnés par une modification des caractéristiques physiques du matériau en contact immédiat avec l'une des faces du cristal. Un tel dispositif implique donc la mesure électronique de la fréquence de résonance, et de transcrire de manière fidèle ses variations. L'application la plus répandue de la microbalance est la mesure de la variation de la masse d'un film solidaire de la surface du cristal. De plus en plus utilisé dans le domaine de l'électrochimie <sup>[7]</sup>, elle permet de transformer une variation de masse en une variation de fréquence, sous certaines conditions, facilement mesurable. Le grand intérêt de ce dispositif repose sur sa grande sensibilité pour étudier *in situ* et en temps réel un processus électrochimique.

Le principe de mesure fait appel à des techniques de type chronométrie: un résonateur, en général un cristal de quartz, est inséré dans un circuit électronique qui délivre un signal très stable dans le temps, l'ensemble formant un oscillateur. Toute perturbation à la surface du cristal se répercute immédiatement sur la fréquence d'oscillation, grandeur mesurée, et il est possible d'établir une relation simple, dite de Sauerbrey <sup>[8]</sup>, entre la variation de masse et celle de cette fréquence. Avec une microbalance opérant à 6 MHz, une variation de 1 Hz correspond à une variation de masse de 4 ng pour 0,2 cm<sup>2</sup> de surface active. Cet outil très sensible a été perfectionné au laboratoire afin d'obtenir des informations sur la cinétique des processus électrochimiques en réalisant des mesures de fonction de transfert électrogravimétrique potentiel-masse <sup>[9]</sup>.

La présence, sur l'une des faces du quartz, d'un film rigide, purement élastique, homogène et d'épaisseur constante, entraîne l'abaissement de la fréquence de résonance du quartz. Lorsque le film est suffisamment fin, la relation entre la masse du film solidaire  $\Delta m_f$  et la translation de la fréquence de résonance  $\Delta f_f$  du quartz est linéaire et peut s'exprimer ainsi <sup>[10]</sup> :

$$\Delta f_r = -C_f * \Delta m_f / A \quad \text{Eq. II.7}$$

où : A est l'aire active d'une face du cristal (m<sup>2</sup>) et C<sub>f</sub> est la constante de proportionnalité (Hz.m<sup>2</sup>.kg<sup>-1</sup>). Cette équation est appelée **loi de SAUERBREY**.

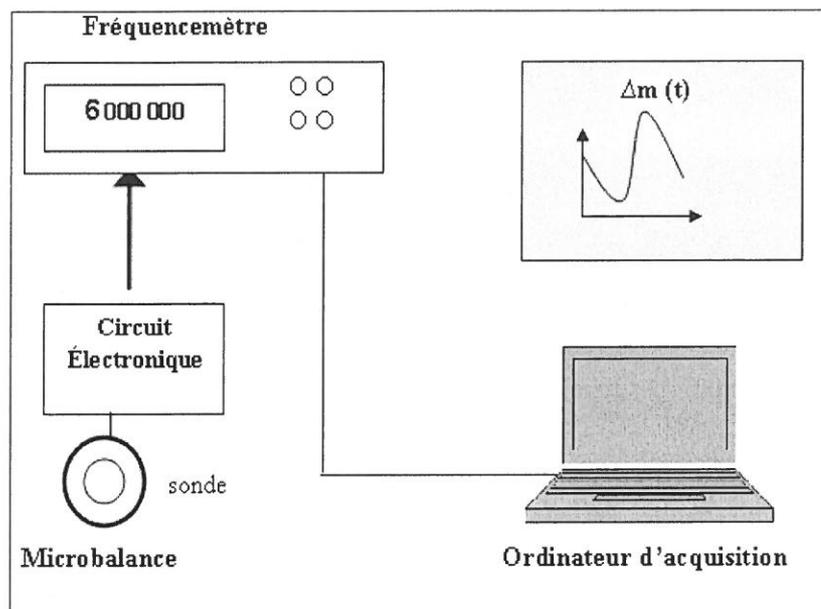
En notant Δm<sub>f</sub> la densité surfacique en masse du film (Δm<sub>f</sub> = ΔM<sub>f</sub>/A), la relation s'écrit :

$$\Delta f_r = -C_f \bullet \Delta M_f \quad \text{Eq. II.8}$$

Le coefficient de proportionnalité C<sub>f</sub> est appelé sensibilité en masse du quartz. Dans notre étude C<sub>f</sub> = 75 Hz/μg.cm<sup>2</sup> pour un quartz de 6 MHz. Dans nos expériences (milieu dilué), le quartz décroche lorsque la masse déposée atteint plus que 100 μg/cm<sup>2</sup> sous polarisation anodique ce qui complique l'étude après la polarisation.

### b. Dispositif expérimental

- **La microbalance** : elle est constituée d'une sonde et d'un circuit électronique. La sonde se compose du résonateur monté sur un support. Un ensemble de connexions électriques s'appuyant sur le support permet de relier les électrodes du cristal au circuit électronique. Ce circuit constitue, avec le quartz monté, un oscillateur électronique délivrant une tension alternative ayant une fréquence caractéristique des paramètres du résonateur. La présence d'éléments actifs dans le circuit électronique impose l'utilisation d'une alimentation continue du circuit, non représentée sur la figure II.5 :
- **Le fréquencemètre** : son signal d'entrée est le signal délivré par l'oscillateur dont il mesure la fréquence.
- **L'ordinateur d'acquisition** : il donne l'ordre au fréquencemètre d'effectuer la lecture de la fréquence et enregistre le résultat. L'utilisation d'un logiciel approprié, développé au Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE), permet l'enregistrement automatique et en continu des variations de la fréquence de la microbalance.



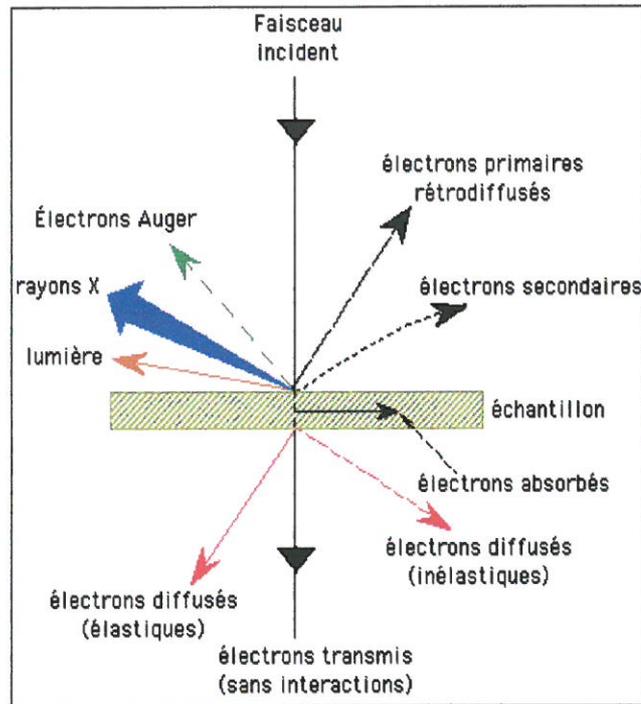
*Figure II.5 : Schéma de principe du dispositif de microbalance électrochimique.*

## II.2.2. Techniques d'observation

### II.2.2.1. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Le fonctionnement du microscope électronique à balayage est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon. Ces électrons qui irradient la surface de l'échantillon pénètrent profondément dans le matériau et affectent un volume appelé "poire d'interaction". Le volume de cette poire dépend du numéro atomique moyen de l'échantillon et de l'énergie des électrons incidents. Dans ce volume d'interaction, les électrons du faisceau vont perdre leur énergie par collisions multiples avec les atomes du matériau générant ainsi de nombreux phénomènes secondaires : réémission d'électrons, émission de photons, absorption d'électrons, courants induits, potentiels électriques, élévation de température locale, vibration du réseau.

La figure II.6 ci-dessous illustre l'ensemble des radiations pouvant être émises lors de l'interaction entre le faisceau d'électrons et l'échantillon. Toutes ces radiations sont produites simultanément et rendent possibles à la fois l'observation et l'analyse d'un objet choisi.



**Figure II.6 :** Schéma illustrant l'ensemble des radiations émises par l'échantillon.

#### a. Les électrons secondaires

Les électrons secondaires sont créés par le passage d'un électron incident près d'un atome. L'électron incident peut transmettre une partie de son énergie à un électron peu lié de la bande de conduction provoquant ainsi une ionisation par éjection de ce dernier électron. L'énergie cinétique de ce dernier ne peut excéder 50 eV. Chaque électron incident peut créer plusieurs électrons secondaires. A cause de leurs faibles énergies, seuls les électrons secondaires émis proches de la surface (<10 nm) peuvent s'échapper de l'échantillon et être recueillis par le détecteur. La moindre variation topographique va modifier la quantité d'électrons secondaires collectés.

#### b. Les électrons rétro-diffusés

Les électrons rétro-diffusés sont émis lors de la collision entre un électron incident et un atome de l'échantillon. Ce sont des électrons primaires qui ont réagi avec des atomes de l'échantillon. Ils sont dispersés dans toutes les directions avec une faible perte d'énergie. Du fait de leur forte énergie, les électrons rétro-diffusés récupérés peuvent provenir d'une plus grande profondeur que celle des électrons secondaires. Ils ont une sensibilité topographique

nettement inférieure. Du fait de leur origine, la quantité d'électrons rétro-diffusés croît avec le numéro atomique des atomes constitutifs de la cible.

### c. Les Rayons X (ou photons X)

L'émission d'un photon X permet à un atome ionisé sous l'impact du faisceau d'électrons, de revenir à l'état fondamental. Quand un électron d'une couche interne d'un atome a été éjecté, un électron d'une couche plus externe va combler la lacune. La différence d'énergies entre ces deux couches va provoquer l'émission d'un photon X. Les photons X possèdent une énergie caractéristique propre à chaque élément qui les a émis. Ces photons sont recueillis et classés suivant leur énergie (EDS) ou leur longueur d'onde (WDS) pour donner des informations sur la composition de l'échantillon. Ils sont très pénétrants et sont émis d'une poire d'interaction d'un volume de l'ordre du micron cube <sup>[11]</sup>. Le microscope utilisé est le modèle STEREOSCAN 440 et la marque LEO. Les tensions d'accélération sont comprises entre 5 et 30 kV.

#### II.2.2.2. Microscopie à fluorescence

Un microscope à fluorescence est un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire pour une observation classique par transmission et une lampe à arc pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission (ou d'arrêt) permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité. Le microscope utilisé au laboratoire (Compiègne) est de type Leica DMLB, équipé d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 995.

#### II.2.2.3. RHEED

La diffraction d'électrons sous incidence rasante (RHEED) permet d'identifier des composés constituant les couches minces formées en surface ( $\leq 1$  à 2 nm). L'interaction entre l'échantillon et le faisceau d'électrons se manifeste par une diffraction de Bragg suivant l'orientation des plans cristallins de l'échantillon analysé. La condition requise pour une telle observation est la formule de Bragg qui doit être vérifiée :

$$\lambda = 2 d_{hkl} \cdot \sin\theta \quad \text{Eq. II.9}$$

$\lambda$  : longueur d'onde associée aux électrons du rayonnement utilisé ( $\lambda = 0,0124 \text{ nm}$  à  $100 \text{ keV}$ ).

$\theta$ : angle du rayon incident et du rayon réfléchi.

$d_{hkl}$  : distance interréticulaire des plans (hkl).

Les électrons diffractés contenant des informations sur la structure, la périodicité et les défauts cristallins sont récupérés et analysés en termes de diagrammes de diffraction. Ainsi, on peut identifier la nature des composés cristallins et les différentes phases présentes dans et sur l'échantillon par comparaison à des fichiers répertoriés de type A.S.T.M.

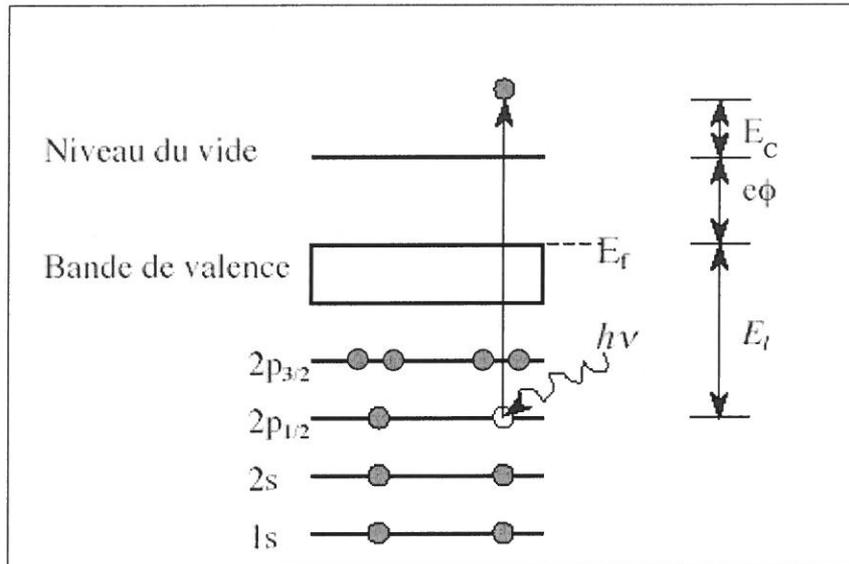
#### ***II.2.2.4. La Spectroscopie de Photoélectrons X***

##### **a. Principe**

La spectroscopie de photoélectrons induits par rayonnement X ou XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) initialement appelée ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) permet de déterminer la composition chimique de la surface d'un solide. Cette technique repose sur l'effet photoélectrique : l'échantillon est irradié par un faisceau de rayons X monochromatique ( $h\nu$ ), les photons interagissent avec les électrons de cœur des atomes constituant le matériau. Les électrons dont l'énergie de liaison ( $E_l$ ) est inférieure à l'énergie des RX incidents peuvent être arrachés de l'atome, ils disposent d'une énergie cinétique ( $E_c$ ) suffisante pour franchir la barrière de potentiel entre le volume et le vide ( $e\Phi$ ). La loi de conservation de l'énergie permet d'écrire (voir Figure II.10):

$$h\nu = E_c + E_l + e\Phi \quad \text{Eq. II.10}$$

Expérimentalement l'énergie cinétique des photoélectrons est mesurée ce qui permet de calculer leur énergie de liaison. Cette dernière est caractéristique de l'élément chimique d'où provient l'électron. La valeur précise de  $E_l$  peut également apporter des renseignements sur le degré d'oxydation et l'environnement chimique des atomes cibles (déplacement chimique). En effet, suivant le degré d'oxydation ou l'environnement d'un atome, l'énergie de liaison des électrons de cœur peut varier. Généralement plus le degré d'oxydation d'un élément est élevé plus l'énergie de liaison des électrons est grande.



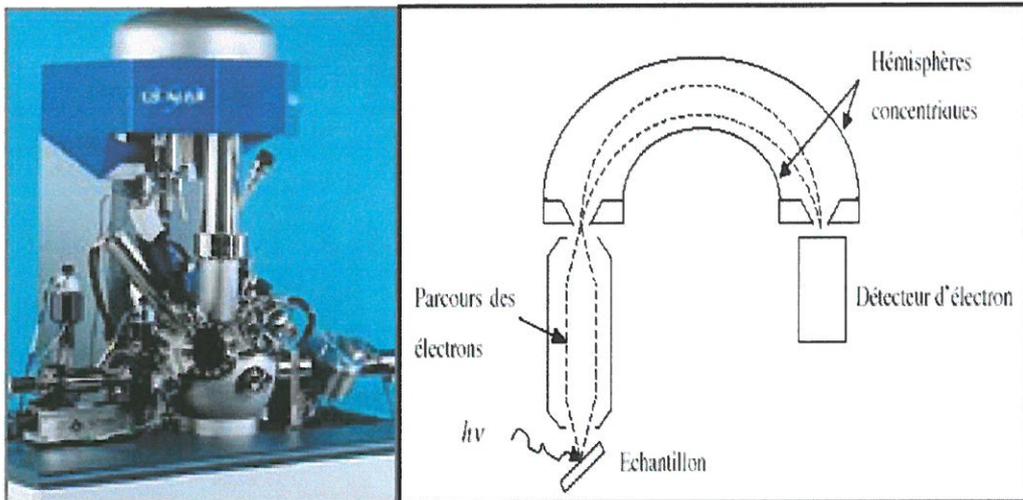
**Figure II.7:** Processus d'émission d'un photoélectron

L'XPS est une méthode d'analyse de surface car le libre parcours moyen ( $\lambda$ ) des électrons dans la matière est faible ( $\lambda$  varie entre 0,5 et 3 nm). On montre que 95 % du signal provient d'une épaisseur de  $3\lambda$  (pour un angle de collecte des photoélectrons de  $90^\circ$  par rapport à la surface de l'échantillon) soit moins de 10 nm.

### b. Dispositif expérimental

Toutes les analyses XPS ont été réalisées à l'ITODYS (Paris VII), le spectromètre utilisé est un ESCALAB 250i-XL (Thermo-VG Scientific) (Figure II.8). La source de RX est une source monochromatique, Al  $K\alpha$  ( $h\nu = 1486,6$  eV).

L'acquisition et de traitement des données sont contrôlés par le logiciel *Avantage* (Thermo-VG Scientific). Lors du traitement des spectres, la soustraction du fond continu a été effectuée en employant la méthode de Shirley.



**Figure II.8:** Photo du spectromètre XPS et schéma simplifié du principe d'une analyse XPS

## II.2.3. Spectroscopie UV-Visible

### II.2.3.1. Principe

Nous avons utilisé un spectrophotomètre ultraviolet-visible HITACHI U-4001 à double faisceau. Il est équipé d'une sphère intégratrice qui permet d'effectuer des mesures de transmission et de réflexion totale ou spéculaire dans une gamme spectrale comprise entre 240 et 2600 nm.

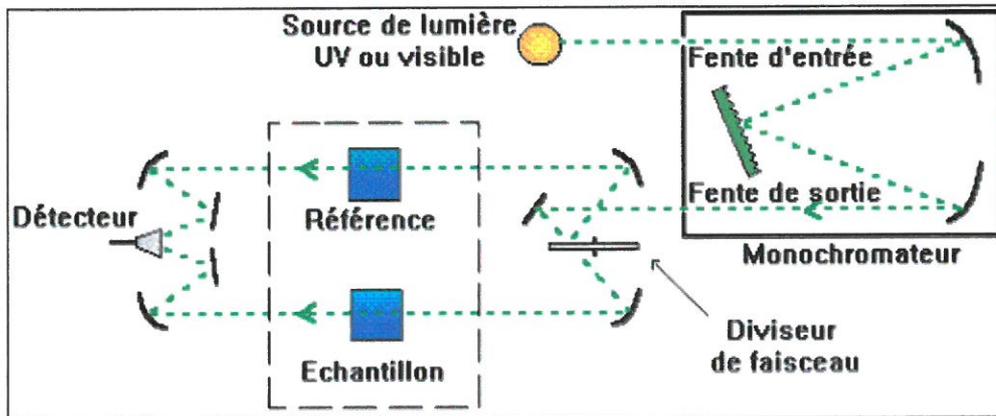
Le spectrophotomètre possède deux sources lumineuses, une lampe à décharge de deutérium qui fournit la lumière dans la région de l'ultraviolet de 240 à 340 nm et une lampe à iodure de tungstène dans celle du visible et du proche infrarouge. Il est équipé d'un double monochromateur. Le premier est à prisme, du type Littrow; le deuxième utilise deux réseaux de diffraction pour disperser la lumière, un premier réseau à 1200 traits/mm pour la région de l'ultraviolet et du visible, le deuxième à 480 traits/mm pour la région du proche infrarouge.

### II.2.3.2. Dispositif du spectrophotomètre UV/Visible

Une mesure d'absorption optique consiste à mesurer l'atténuation d'intensité provoquée sur un faisceau de lumière monochromatique par l'interposition de la substance absorbante. La réalisation d'un double faisceau améliore les mesures en effectuant simultanément une double mesure : intensité du faisceau non atténué et intensité du faisceau atténué. Ainsi, le spectrophotomètre du laboratoire, à double faisceau, permet de mesurer quasi-simultanément

la référence et l'échantillon, mais aussi de normaliser la réponse indépendamment des fluctuations de la source.

Quant au monochromateur, il provoque la dispersion du faisceau de radiations émises par la lampe de tungstène (380-2600nm) ou celle au deutérium (240-380 nm). Le détecteur UV/visible est un photomultiplicateur. L'acquisition et le traitement numérique des spectres sont réalisés par un micro-ordinateur équipé du logiciel fourni par le constructeur.



*Figure II.9: Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau.*

## II.2.4. Dosage protéique en présence de SDS (kit Bio Rad)

### II.2.4.1. Principe

Le dosage de protéines a été effectué grâce à un kit commercialisé par Bio-Rad RC DC protein assay (1-800-424-6723) qui permet de doser des protéines en présence d'agent détergent comme le dodécyl sulfate de sodium (SDS) et d'agent réducteur comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le principe est similaire à celui décrit par Lowry <sup>[12]</sup>. Il est basé sur la réaction des groupements aromatiques de protéines avec une solution alcaline. La coloration bleue qui apparaît a un maximum d'absorption à 750 nm. La courbe de calibration est effectuée entre 0,01 et 0,100 mg/mL d'une solution-mère de SAB à 2 mg/mL (Sigma). Expérimentalement, 25  $\mu$ L d'échantillon ou de standard sont utilisés pour chaque mesure.

### II.2.4.2. Protocole expérimental

L'adsorption de la SAB est réalisée en immergeant les lames de verre recouvertes de  $\text{SnO}_2$  de taille 70 x 12 mm dans 8 mL d'un milieu contenant de l'albumine pour différentes concentrations de 0,05% à 5% et incubées dans l'étuve (Fig. II.10) à 37°C pour différents

temps. La concentration en NaCl du milieu est de 0,5 M. Les électrodes étaient polarisées à 1,5 V/ECS, des témoins, non polarisés, ont été également étudiés.



*Figure II.10 : Montage expérimental*

A la fin de l'incubation, les lames sont rincées trois fois 10 min dans 8 mL d'eau bidistillée. Les protéines sont désorbées dans 250  $\mu$ L de tampon Laemmli, 10 min à 95°C, pour chaque face successivement, puis rincées avec 100  $\mu$ L de tampon. L'éluat est concentré par centrifugation sur filtre Amicon à 14 000g pendant 12 min. Les surnageants sont récupérés par centrifugation à 1 000 g pendant 3 min. Les volumes sont mesurés, la concentration en mercaptoethanol ajusté à 5% et les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 3 min puis congelés à -80°C, avant d'entamer le protocole de dosage (voir annexe 1).

## **II.2.5. Electrophorèse**

L'électrophorèse permet la séparation de particules sous l'action d'un champ électrique. Cette technique est principalement analytique mais peut être également utilisée comme technique préparative <sup>[13]</sup>.

### **II.2.5.1. Principe**

L'électrophorèse est une méthode d'analyse fondée sur la migration de protéines chargées dans un champ électrique. Elle est réalisée généralement sur un gel de polymères, qui forme un tamis moléculaire, ralentissant la migration des protéines en fonction de leur taille et leur masse. Une méthode classique utilise un détergent, le SDS, qui dénature les

protéines et se lie à elles en quantité proportionnelle à leur poids moléculaire. Le SDS apporte une charge négative nette importante qui rend insignifiant leur charge intrinsèque. Elles migrent donc plus ou moins sur le gel en fonction de leur seule masse. Elles sont alors visualisées à l'aide d'un colorant : on peut citer le bleu de Coomassie, qui donne une intensité de coloration directement proportionnelle à la quantité de protéine ; le nitrate d'argent que nous avons utilisé, dont la coloration n'est pas proportionnelle à la quantité de protéine, mais qui est en revanche nettement plus sensible, permettant de visualiser des quantités de l'ordre du ng. La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standard de masses molaires connues

#### *II.2.5.2. Protocole expérimental*

Voir **annexe 2** : (préparation des gels, coloration au nitrate d'argent de gels électrophorétiques et solution).

---

## Références du chapitre II

- <sup>1</sup> A.Messad, J. Bruneaux, H. Cachet, M. Froment, J. Mater. Sci **29** (1994) 5095
- <sup>2</sup> H. Cachet, D. Festy, G. Folcher, F. Mazeas, B. Tribollet, Matériaux et Techniques **7/8** (2002) 37.
- <sup>3</sup> H. Cachet, F. Zenia, M. Froment, J. Electrochem. Soc **146** (1999) 977.
- <sup>4</sup> Courbe d'étalonnage établie par Henri El Zakhem UMR CNRS 6067 Génie des Procédés Industriels à l'Université de Technologie de Compiègne « [henri.el-zakhem@utc.fr](mailto:henri.el-zakhem@utc.fr) ».
- <sup>5</sup> R. De Gryse, W.P. Gomes, F. Cardon, J. Vennik, J. Electrochem. Soc **122** (1975) 711.
- <sup>6</sup> F. Zenia, Thèse de l'Université Paris VI, novembre 1996. « Corrosion du dioxyde d'étain fortement dopé en milieu aqueux chloruré étudiée par électrogravimétrie et spectroscopie d'impédance. ».
- <sup>7</sup> K. Bizet, C. Gabrielli, H. Perrot, J. Thérasse, Immunoanal. Biol. Spéc **10** (1995) 205.
- <sup>8</sup> G. Sauerbrey, Z. Phys., **155** (1959) 206.
- <sup>9</sup> C. Gabrielli, M. Keddam, H. Perrot, M.C. Pham et R. Torresi, Electrochim. Acta **44** (1999) 2095.
- <sup>10</sup> H. Ehahoun, Thèse de l'Université Paris VI, Janvier 2001. « Conception et réalisation d'un capteur de corrosion pour métaux massifs basé sur un transducteur piézoélectrique ».
- <sup>11</sup> Le microscope électronique à balayage Philips XL 30,  
<http://www.mssmat.ecp.fr/mat/meb/meb.html-ssi>.
- <sup>12</sup> O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, J. Biol. Chem **193** (1951) 265.
- <sup>13</sup> <http://www.scifa.univ-metz.fr/cours/MPARANT/5b---Separation-des-molecules-CM-Etudiant.pdf>

## **CHAPITRE III**

# **COMPORTEMENT DE COUCHES SnO<sub>2</sub> DOPE DANS DIFFERENTS MILIEUX INORGANIKUES**

## CHAPITRE III : COMPORTEMENTS DE COUCHES SNO<sub>2</sub> DOPE DANS DIFFERENTS MILIEUX INORGANIQUES

### III.1. Introduction

Comme il a été rappelé dans l'introduction générale, la production localisée de chlore libre par électrolyse contrôlée de l'eau de mer sur un film de dioxyde d'étain constitue un moyen actif de protection d'équipements optiques sous-marins vis-à-vis des bio-salissures tout en sauvegardant l'environnement. La protection sous polarisation anodique s'avère effective sur plusieurs mois (« mode actif ») <sup>[1]</sup>. Le fait remarquable est qu'après la coupure de la polarisation, on observe une persistance de l'effet protecteur (« mode passif ») pouvant atteindre plusieurs jours. Ce constat est mis à profit pour une gestion économique de l'énergie électrique nécessitée par le mode de protection active.

Lors du fonctionnement sous polarisation anodique (à +1,5V/ECS) par attaque radicalaire par OH° et par Cl°, il y a fragilisation de l'extrême surface du film SnO<sub>2</sub>, la rendant apte à subir des modifications électrochimiques lors de la mise au potentiel d'abandon, beaucoup plus cathodique, en fonction du milieu électrolytique. Compte tenu de ce décalage en potentiel, on peut en effet suspecter l'apparition de sites Sn<sup>2+</sup> et de Sn° qui pourraient initier la formation de groupement hydroxochlorés. En effet, des travaux archéologiques publiés récemment portant sur l'état d'objets en étain trouvés dans les épaves de navires <sup>[2]</sup>, ont mis en évidence la présence sur ces objets de romarchite (SnO), d'hydroromarchite (5 SnO- 2H<sub>2</sub>O) et surtout d'un hydroxochlorure d'étain de formule Sn<sub>3</sub>O(OH)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (rouille de l'étain ou abhurite). Le point remarquable est que ces objets recouverts partiellement par ce composé sont totalement exempts de bio-salissures ce qui de toute évidence constitue un élément fort de réflexion par rapport au problème du caractère antifouling acquis par nos surfaces SnO<sub>2</sub> après traitement électrochimique.

Dans ce chapitre, on présentera la caractérisation des modifications de la surface, de films de dioxyde d'étain après des séquences non polarisation / polarisation / non polarisation dans divers milieux chlorurés artificiels et l'eau de mer naturelle. L'étude expérimentale fait appel à des techniques d'analyses *ex situ* (XPS, EDX) et des techniques électrochimiques *in situ* (chronoampérométrie, suivi du potentiel d'abandon). Ces dernières études ont pour but de vérifier s'il y a ou non formation d'une couche superficielle en milieu chloruré après différents cycles de polarisation, dans des milieux, naturels ou artificiels, de pH égal à 8.

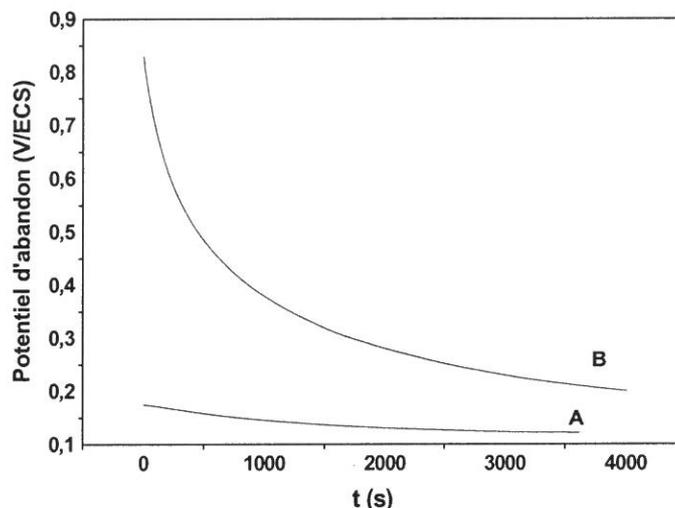
### III.2. Effet de la nature du dopant sur le comportement de couches SnO<sub>2</sub> dans des solutions salines

L'étude présentée dans cette partie est réalisée sur des films SnO<sub>2</sub> déposés sur des lames de verre. La surface de l'électrode est de 1,5 cm<sup>2</sup>. A titre comparatif nous avons travaillé avec deux types d'électrodes : (i) des électrodes SnO<sub>2</sub> :F/Sb identiques à celles utilisées pour les hublots, constituées d'une couche externe dopée à l'antimoine recouvrant une sous-couche dopée au fluor (Sb)/Fluor (F) (bi-couche) et (ii) des électrodes SnO<sub>2</sub> : F constituées d'une seule couche dopée au fluor. Les milieux choisis sont KCl 0,5 M dissous dans un tampon pH 8 et l'eau de mer naturelle.

#### III.2.1. Electrode: SnO<sub>2</sub>:F /Sb2%

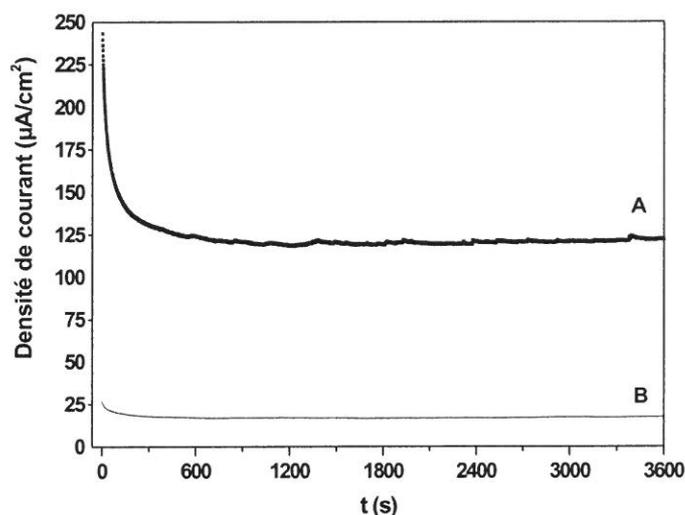
Dans une première série d'expériences, le potentiel libre d'électrodes bicouche SnO<sub>2</sub> : F/Sb a été étudié en fonction du temps, dans deux milieux différents comme le montre la figure III.1. Les courbes (A) et (B) correspondent respectivement au milieu 0,5M KCl à pH = 8 et à l'eau de mer naturelle.

Afin de conserver les mêmes conditions initiales, une électrode neuve a été utilisée pour chacun des milieux considérés. Des valeurs stationnaires sont atteintes au bout d'une heure environ pour les deux milieux testés. En présence de l'eau de mer, le potentiel d'abandon de l'électrode SnO<sub>2</sub> : F/Sb évolue lentement depuis une valeur élevée (+ 0,85 V/ECS) jusqu'à environ +0.25 V/ECS. Après une heure, il se situe à une valeur environ 100 mV plus positive que celle observée en solution KCl à pH 8 (0,1 à 0,2V/ECS).



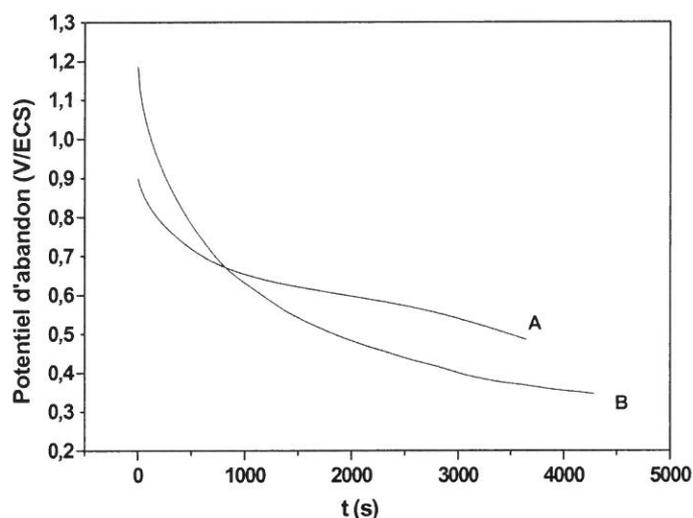
**Figure III.1:** Evolution du potentiel d'abandon avant polarisation d'électrodes SnO<sub>2</sub> : F/Sb2% dans 0,5M KCl pH 8 (A) et dans l'eau de mer (B).

La figure III.2 montre l'établissement du courant stationnaire lorsque les électrodes sont polarisées anodiquement à leur point de fonctionnement (+1,5V/ECS). Ce courant a pour origine l'oxydation des ions chlorure, il chute notablement avec un régime transitoire s'établissant sur environ 100 à 200 secondes, après établissement d'un régime stationnaire de diffusion. On remarque que, dans l'eau de mer naturelle, sa valeur est particulièrement basse, environ cinq fois inférieure à celle obtenue en solution KCl à pH8.



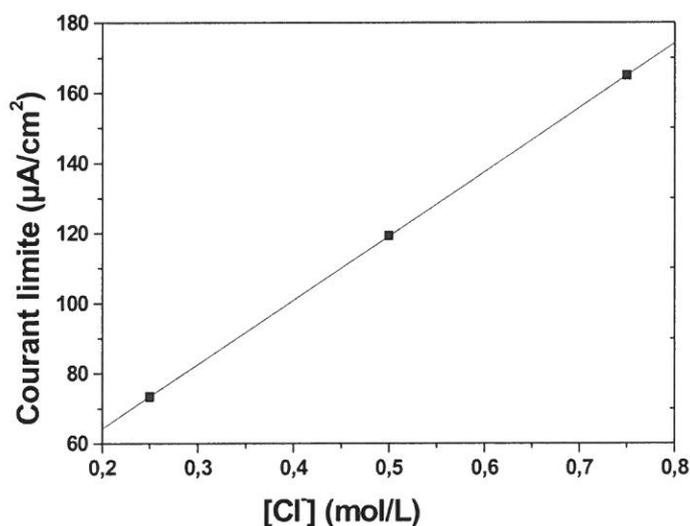
**Figure III.2:** Etablissement du courant stationnaire d'électrodes SnO<sub>2</sub> : F/Sb2% polarisées à +1,5 V/ECS dans 0,5M KCl à pH 8 (A) et dans une eau de mer naturelle (B).

La figure III.3 illustre l'évolution du potentiel d'abandon après polarisation anodique des électrodes SnO<sub>2</sub>/F/Sb2% à 1,5 V/ECS. Il y a un effet mémoire plus important et une dépolarisation plus lente qu'avant application de toute polarisation anodique. L'effet mémoire du potentiel appliqué est plus notable pour les deux milieux considérés. Au bout d'un temps d'enregistrement d'une heure environ, les différentes courbes n'ont pas atteint une valeur limite stationnaire, avec des valeurs de pente négatives encore significatives.



**Figure III.3:** Evolution du potentiel d'abandon d'électrodes SnO<sub>2</sub>:F/Sb2% ayant été polarisées anodiquement à +1,5V/ECS dans 0,5M KCl à pH 8 (A) et dans l'eau de mer naturelle (B).

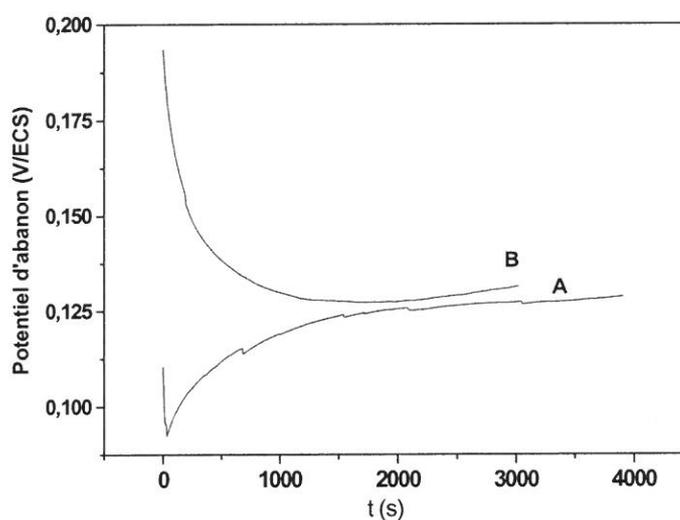
On a vérifié également, dans le milieu tampon, que la valeur du courant stationnaire était proportionnelle à la concentration en ions chlorure (figure III.4).



**Figure III.4:** Variation du courant limite en fonction de la concentration des ions chlorures dans le milieu tampon à pH 8 pour l'électrode SnO<sub>2</sub> : F/Sb2%.

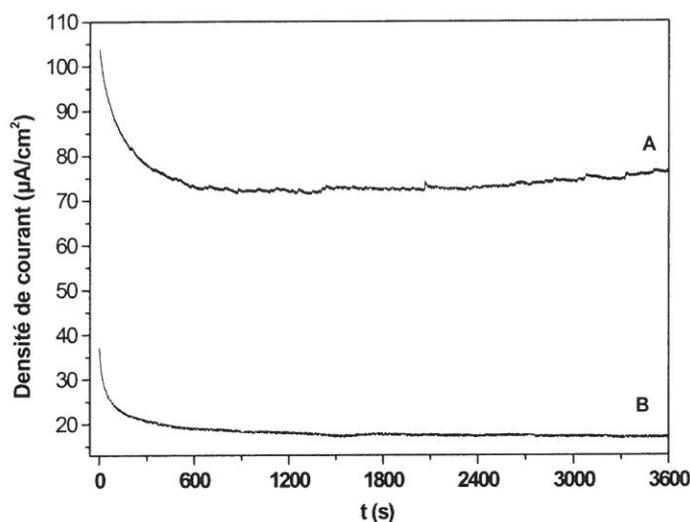
### III.2.2. Electrode: SnO<sub>2</sub>:F

Le même type d'expérience a été reproduit avec une électrode SnO<sub>2</sub> : F, c'est-à-dire que l'on a suivi en fonction du temps le potentiel libre de l'électrode dans un tampon de pH = 8 pour une concentration de 0,5M de KCl, puis dans l'eau de mer naturelle. Pour les deux différents milieux testés, des valeurs quasistationnaires et très proches pour les deux milieux (environ 0,12 V/ECS) sont atteintes au bout de 30 minutes. L'amplitude du régime transitoire est faible, inférieure à 100 mV (Figure III.5).



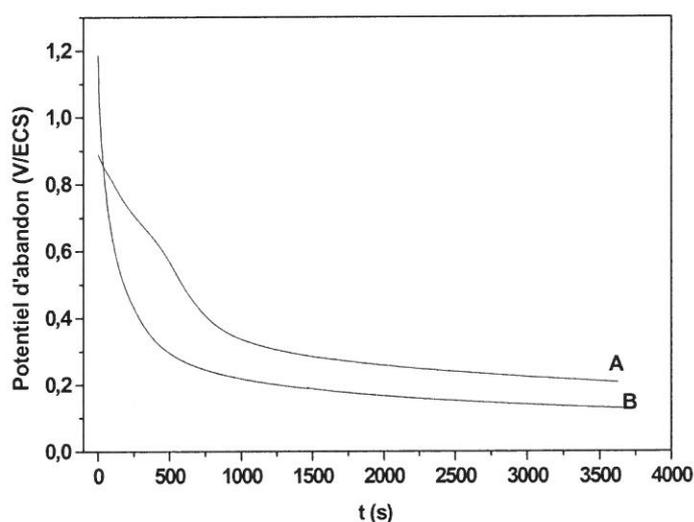
**Figure III.5:** Evolution du potentiel d'abandon d'électrodes avant polarisation SnO<sub>2</sub>: F dans 0,5M KCl à pH 8 (A) et dans l'eau de mer naturelle (B).

La figure III.6 montre l'établissement du courant stationnaire lorsque les électrodes sont polarisées anodiquement à leur point de fonctionnement (+ 1,5V/ECS). Ce courant a aussi pour origine l'oxydation des ions chlorure. Comme dans le cas des électrodes SnO<sub>2</sub>:F/Sb, on remarque aussi que le courant stationnaire est plus faible dans l'eau de mer naturelle que dans le milieu tampon.



**Figure III.6:** Etablissement du courant stationnaire d'électrodes SnO<sub>2</sub>:F polarisées à +1,5 V/ECS 0.5M KCl à pH 8 (A) et dans une eau de mer naturelle (B).

La figure III.7 montre l'évolution du potentiel d'abandon après que les électrodes aient été polarisées anodiquement à 1,5 V/ECS. On observe d'abord une forte décroissance, suivie par une évolution plus lente. On constate que la dépolarisation de l'électrode est plus rapide en milieu eau de mer. Après une heure, le potentiel d'abandon se situe dans la fourchette +0,2 à +0,3 V/ECS, en présentant une décroissance très lente avec le temps.



**Figure III.7:** Evolution du potentiel d'abandon d'électrodes après polarisation SnO<sub>2</sub>: F dans 0,5M KCl à pH 8 (A) et dans l'eau de mer naturelle (B).

### III.3. Influence de la vitesse de rotation de l'électrode de travail

Les faibles valeurs du courant anodique stationnaire mesurées sur électrode SnO<sub>2</sub>/F/Sb (Figures III.2), quel que soit le milieu électrolytique considéré, nous ont incité à analyser la dépendance de ce courant avec la vitesse de rotation de l'électrode. Dans ce but, on a réalisé une électrode à disque tournant que nous avons testée en milieu 0,75 M KCl à pH 8.

Si le courant est purement diffusionnel, la densité de courant stationnaire varie linéairement avec la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode de travail, selon la loi de Levich et noté  $i_L$ .

$$i_L = 0.62nFD_X^{2/3} \nu^{-1/6} \Omega^{1/2} [X]_\infty \quad \text{Eq. III.1}$$

Dans cette équation,  $i_L$  est exprimé en A.m<sup>-2</sup>

$n$  est le nombre d'électrons mis en jeu

$F$  est le Faraday (96500 C.mol<sup>-1</sup>)

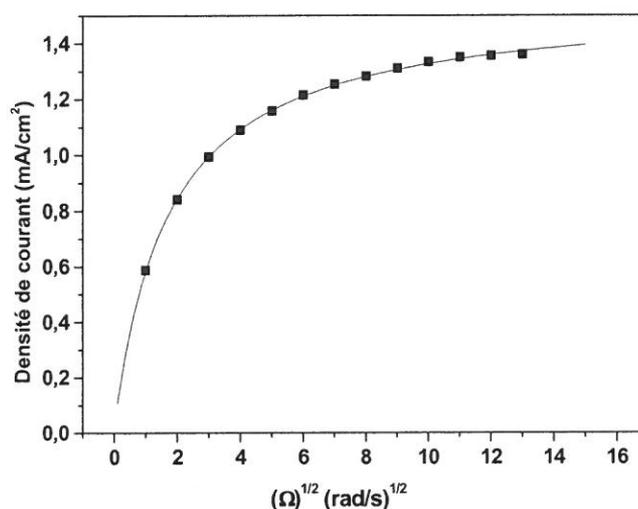
$D_X$  est le coefficient de diffusion de l'espèce diffusante X en m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>

$\nu$  est la viscosité cinématique du milieu en m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>

$\Omega$  est la vitesse de rotation en rad.s<sup>-1</sup>

$[X]_\infty$  est la concentration au sein de la solution de l'espèce électroactive X en mol.m<sup>-3</sup>.

Ceci permet de calculer coefficient de diffusion D des espèces électroactives, dans notre cas les ions chlorure. La figure III.8 montre les variations du courant mesuré à un potentiel fixe  $E = +1,5V/ECS$  en fonction de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode.

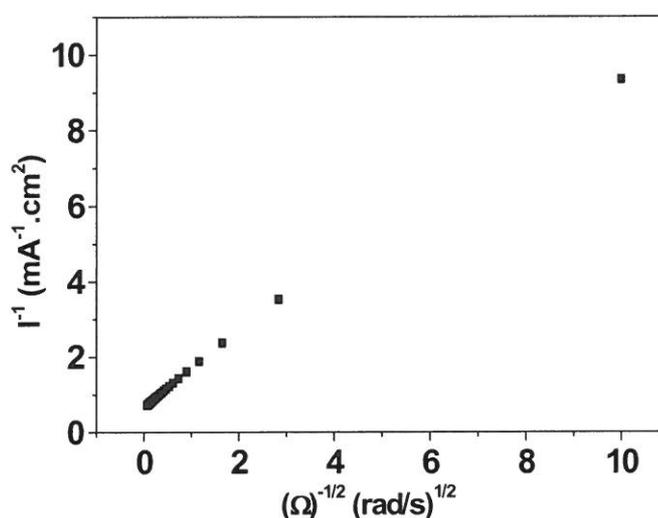


**Figure III.8:** Variation de la densité de courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode à  $E = +1,5V/ECS$ .

Ces variations n'étant pas linéaires, les résultats s'analysent suivant la formulation de Koutecki-Levich, en tenant compte d'une contribution cinétique et d'une contribution du transport de matière (terme de Levich en fonction de la vitesse de rotation  $\Omega$ ):

$$I^{-1} = B + C\Omega^{-1/2} \quad \text{Eq. III.2}$$

En ramenant la densité de courant à la surface géométrique, on obtient par ajustement non linéaire  $B = 0,65 \pm 0,01 \text{ cm}^2 \cdot \text{mA}^{-1}$  et  $C = 1,12 \pm 0,07 \text{ cm}^2 \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{s}^{-1/2}$  à partir de la figure III.8.



**Figure III.9:** Influence de la vitesse de rotation en fonction de la densité de courant à un potentiel fixe  $E = +1,5V/ECS$  (Courbe de Koutecky-Levich)

Si on calcule le coefficient de diffusion selon la relation de Levich, on obtient pour les ions chlorure une valeur aberrante de  $10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  alors que la valeur connue dans la littérature est  $D_{\text{lit}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . La conclusion possible est que la surface de l'électrode n'est pas uniformément active pour la réaction d'oxydation des ions chlorure. Sous l'effet de la forte polarisation anodique, il y a production d'espèces radicalaires  $\text{OH}^\circ$  et  $\text{Cl}^\circ$ . La surface de l'électrode est majoritairement hydroxylée, et donc peu réactive électrochimiquement vis-à-vis de l'oxydation des ions chlorure.

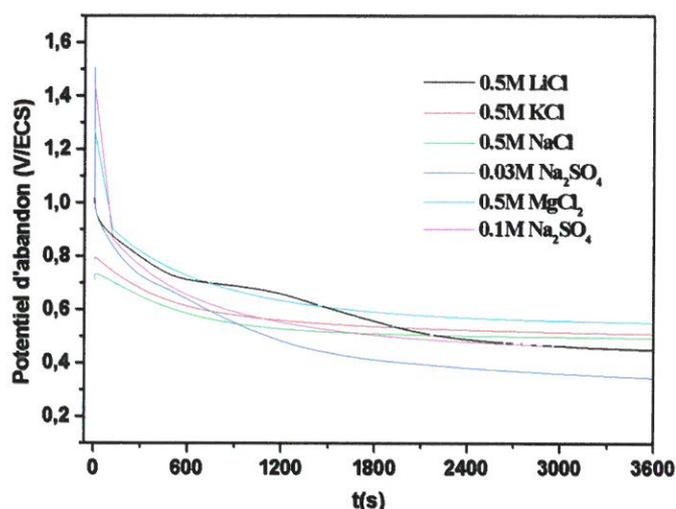
### III.4. Effet des ions présents dans l'eau de mer sur le comportement de couches SnO<sub>2</sub>

On a voulu vérifier si les cations ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) et anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) présents

dans le milieu électrolytique pouvait ou non avoir une influence particulière sur le comportement électrochimique de la surface des films SnO<sub>2</sub> :F /Sb mis au contact et polarisés anodiquement dans diverses solutions chlorurées inorganiques, tamponnées à pH 8.

La figure III.10 résume les résultats obtenus sur l'évolution temporelle du potentiel d'abandon après polarisation anodique pendant 1 heure à 1,5 V/ECS en présence de 0,5M Cl<sup>-</sup> à pH 8 et différents cations et anions.

Les milieux chlorure de lithium, de sodium, de potassium et de magnésium conduisent, au bout d'une heure, à des valeurs du potentiel assez proches, entre +0,5 et +0,6V/ECS. Il y a un effet mémoire important sur la dépolarisation en présence de Mg<sup>2+</sup> et en présence de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Dans ce dernier cas, le potentiel d'abandon tend vers +0,3 V/ECS.



**Figure III.10:** Influence des anions et cations présents dans le milieu électrolytique sur le potentiel d'abandon d'une électrode SnO<sub>2</sub> : F /Sb2% mesuré après polarisation à +1,5V/ECS.

Les résultats de la figure III.10 montrent que quel que soit l'anion ou le cation présent dans la solution, le potentiel d'abandon après la polarisation anodique reste à des valeurs positives, au dessus de +0,3 V/ECS. Cette valeur finale du potentiel résulte de la balance entre plusieurs réactions difficiles à déterminer précisément, impliquant, par exemple, l'oxygène dissous, l'oxydoréduction de sites de surface.

### III.5. Analyses de surface

#### III.5.1. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

Des électrodes SnO<sub>2</sub> :F /Sb ont été maintenues pendant 1 heure au potentiel de 1,5 V

dans des solutions de KCl 0,25M, 0.5M et 0,75M à pH 8. Après ce maintien, les échantillons ont été sortis, rincés à l'eau bidistillée, puis séchés sous azote, avant de les mettre dans la chambre de transfert du spectromètre. Les éléments Sn, O, Cl et C ont été détectés. Les analyses quantitatives sont données dans le tableau 1. elles sont exprimés en pourcentages atomiques.

pH 8	Sn	O	Cl	C	Cl/Sn
0,25M KCl	23,8	53,3	0,4	22,5	0,0168
0,50M KCl	22,4	52,2	1,6	23,8	0,0714
0,75M KCl	21,8	46,9	1,8	29,5	0,0825

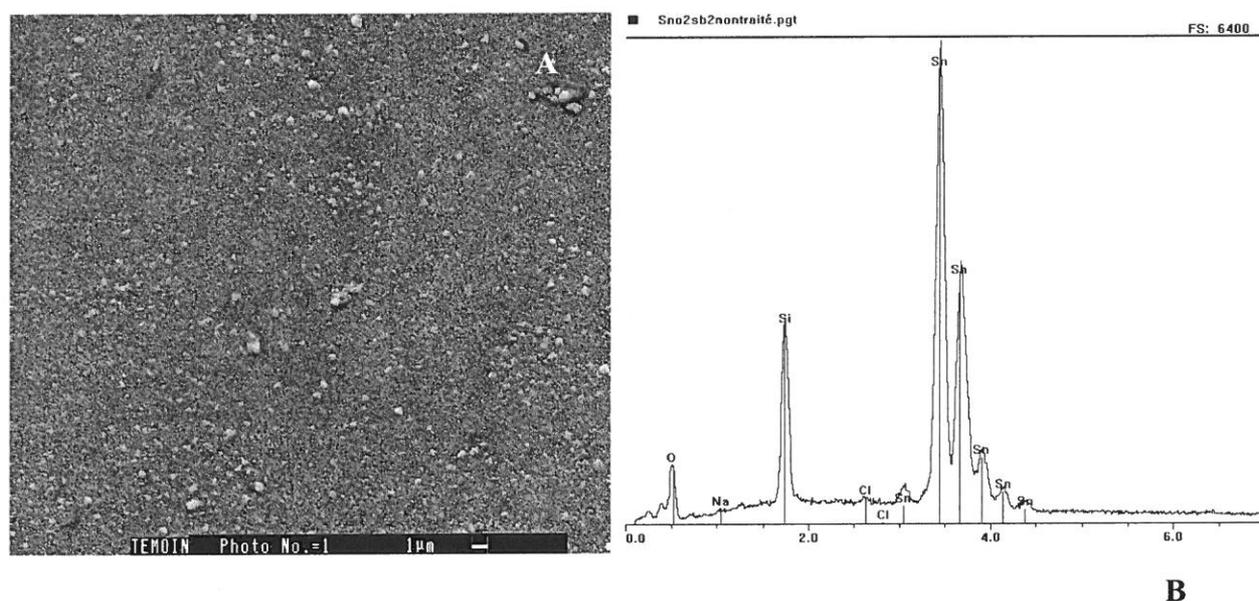
**Tableau III.1:** Composition superficielle d'électrodes SnO<sub>2</sub>:F/Sb obtenu par XPS après maintien à +1,5 V/ECS pendant 1 heure en solutions KCl à pH 8.

Le signal XPS du chlore est faible comparé aux signaux des autres éléments. Néanmoins, on constate un enrichissement en chlore de la surface, d'autant plus notable que la concentration d'ions chlorure en solution est élevée. La teneur superficielle trouvée, de l'ordre de 2 at.%, permet de chiffrer la densité de sites « chlore » à la surface à quelques 10<sup>13</sup> sites/cm<sup>2</sup>, en considérant une densité atomique moyenne de 10<sup>15</sup> at./cm<sup>2</sup> à la surface d'un solide. Ce résultat va dans le sens du modèle de corrosion élaboré antérieurement au laboratoire [3,4]. Ce modèle prévoit la formation d'intermédiaires de corrosion, du type Sn-OH et Sn-Cl, qui peuvent acquérir une charge positive par capture d'électrons par les espèces radicalaires OH° et Cl° électrogénérées. On peut penser que cette charge de surface créée sous polarisation et son évolution temporelle hors polarisation est responsable des variations du potentiel d'abandon, après coupure de la polarisation anodique. Nous reviendrons sur ce point dans la suite de ce chapitre.

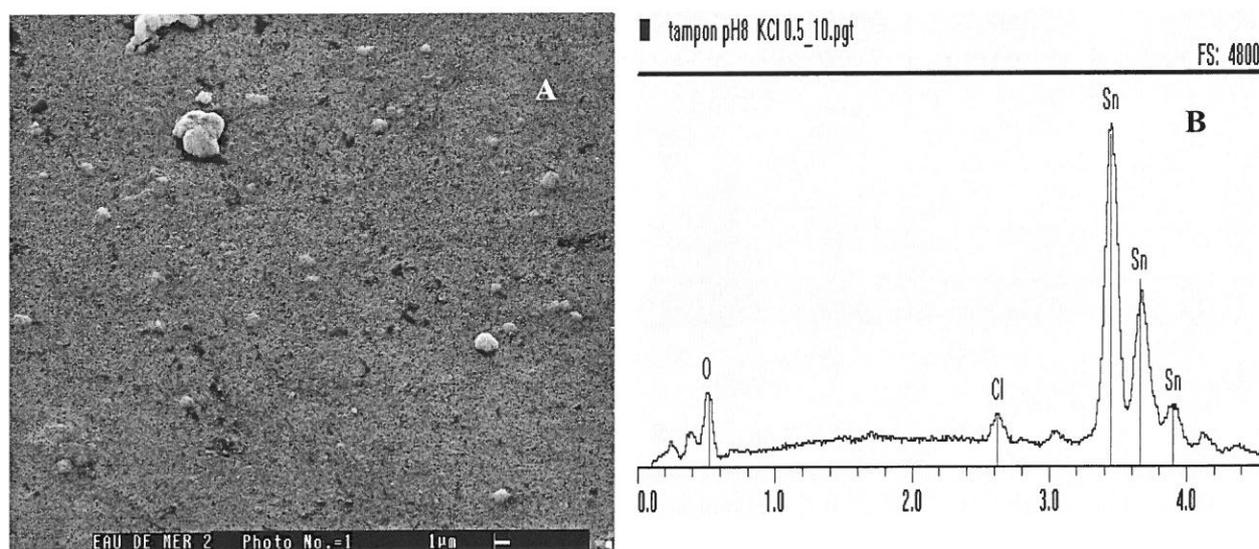
### III.5.2. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB)

Nous avons choisi deux électrodes de SnO<sub>2</sub>, une des électrodes n'a subi aucune mise sous polarisation et a été simplement immergée pendant 48 heures dans l'eau de mer (figure III.11). La seconde a été polarisée à 1,5 V/ECS pendant 48 heures, puis laissée au potentiel d'abandon pendant 24 heures (Figure III.12). La figure III.12 montre l'effet de séquences

alternées de polarisation anodique à + 1,5 V/ECS puis de mise hors polarisation sur la composition superficielle de films SnO<sub>2</sub> :F :Sb utilisés dans la protection active de hublots. On a entrepris des analyses EDX sur ces électrodes SnO<sub>2</sub> :F :Sb mises en contact d'eau de mer naturelle. Les résultats EDX montrent que la quantité de chlore fixée à la surface de l'électrode SnO<sub>2</sub> reste toujours faible après la séquence polarisation/non polarisation (Figure III.12.B), par comparaison avec l'électrode non traitée électrochimiquement c'est-à-dire une simple immersion (Figure III.11.B).



**Figure III.11:** (A) Image M.E.B obtenue sur électrode SnO<sub>2</sub> immergée dans l'eau de mer naturelle non traitée électrochimiquement, (B) spectre EDX correspondant

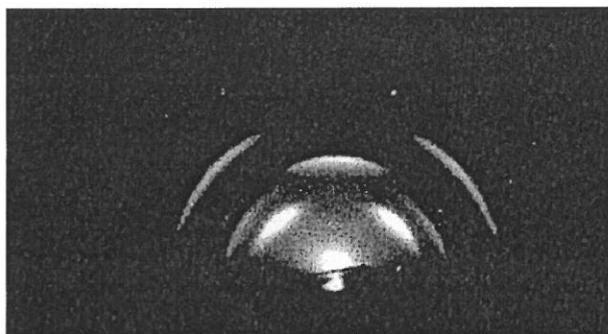


**Figure III.12:** (A) image M.E.B obtenue sur une électrode SnO<sub>2</sub> : F : Sb immergée dans l'eau de mer naturelle après une séquence polarisation/non polarisation, (B) spectre EDX correspondant

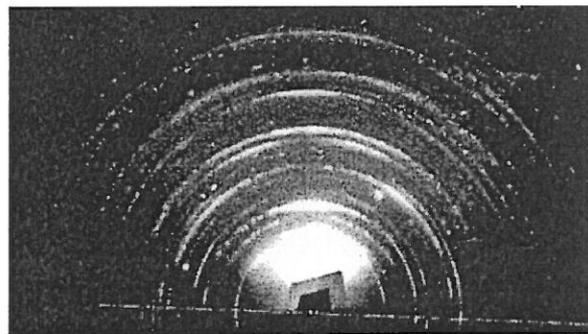
Les résultats obtenus soit par analyse XPS ou par EDX (MEB), montrent qu'il y a une modification de la surface et l'incorporation des ions chlorure par le biais du processus de corrosion.

### III.5.3. Observations par RHEED

La figure III.13a montre le diagramme RHEED d'un échantillon SnO<sub>2</sub> non polarisé. Compte tenu de la nature polycristalline de nos films, le diagramme RHEED est caractérisé par une succession d'anneaux concentriques dont la position et les intensités relatives sont en accord avec la structure cassitérite tétragonale ( $a= 0.473$  nm ;  $c=0.3188$  nm). Les films SnO<sub>2</sub> déposés par pyrolyse de spray sont fortement texturés avec une orientation préférentielle  $\langle 100 \rangle$ . La figure III.13b est un exemple typique de ce que l'on obtient après un maintien électrochimique dans le domaine anodique. Le diagramme est effectivement modifié, mais il n'y a pas d'évidence d'un nouveau composé de type hydroxochlorure d'étain (Sn<sub>3</sub>O(OH)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La modification du diagramme est sans doute liée à l'effet de la corrosion en milieu chlorure qui induit une perte de la texture du film, ce qui fait réapparaître des anneaux de diffraction de SnO<sub>2</sub> qui étaient masqués par l'intensité des figures de diffraction dues à la texture initiale.



*Figure III.13a : Diagramme RHEED film d'un film SnO<sub>2</sub> non traité.*



*Figure III.13b : Diagramme RHEED SnO<sub>2</sub> ayant été polarisé anodiquement.*

### III.6. Discussion

Le mécanisme de corrosion du dioxyde d'étain en milieu aqueux chloruré à pH 8 et soumis à des potentiels positifs a fait antérieurement l'objet d'une étude approfondie pour comprendre l'origine de l'effet stabilisateur observé aux fortes concentrations en chlorure. Le mécanisme qui a été proposé repose sur l'existence de deux chemins réactionnels symétriques se déroulant en parallèle. L'un concerne la transformation hydroxyle/oxygène et l'autre la transformation chlorure/chlore. Nous en rappelons ici les grandes lignes.

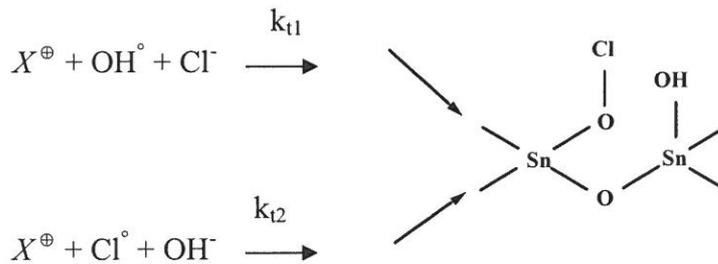
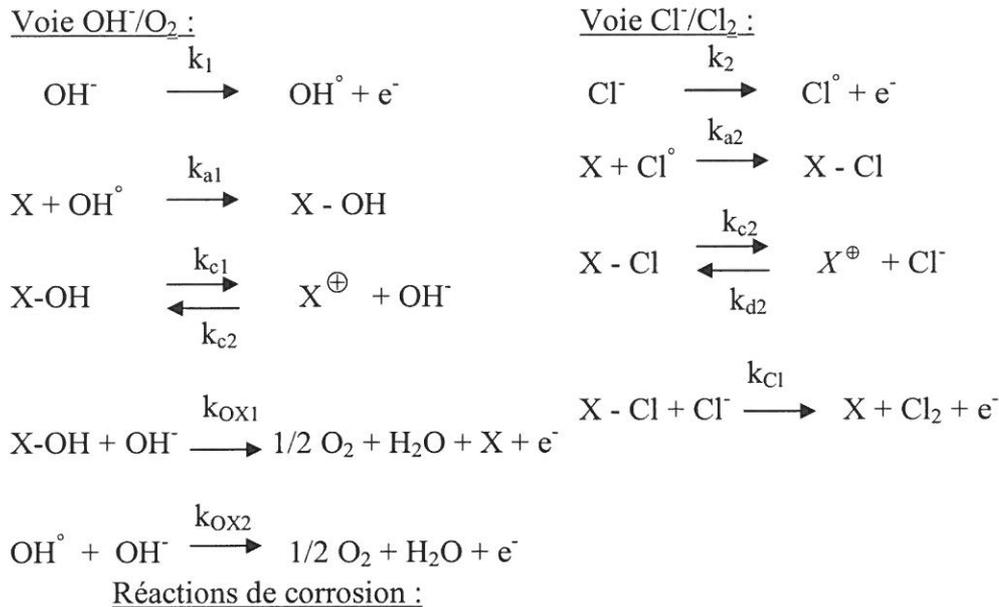
Pour chacun de ces deux chemins, on a considéré quatre étapes successives. La première étape rend compte de la formation d'un radical A° par oxydation électrochimique d'un anion A<sup>-</sup> (A<sup>-</sup> = OH<sup>-</sup> ou Cl<sup>-</sup>). La seconde étape traduit l'adsorption chimique de ce radical sur un site de surface X en formant un groupement X - A°. La troisième étape réside dans la séparation des charges dans la liaison X - A° en créant un site de surface X<sup>+</sup> chargé positivement et en libérant un anion A<sup>-</sup>. La dernière étape porte sur la régénération du site de surface X accompagné d'un dégagement gazeux (O<sub>2</sub> et Cl<sub>2</sub>). La corrosion de SnO<sub>2</sub> est attribuée à l'action combinée de radicaux OH° et Cl° sur des liaisons de surface Sn-O de l'oxyde, affaiblies par la capture des électrons de liaison. L'attaque radicalaire conduit à la formation de liaisons du type Sn-O-Cl ou Sn-OH. La stabilisation du dioxyde d'étain observée en milieu chlorure concentré (cas de l'eau de mer) s'explique par la recombinaison préférentielle entre radicaux conduisant à la production de chlore et d'oxygène, limitant ainsi l'attaque radicalaire des liaisons de surface.

Comme nous l'avons montré par les observations RHEED, la corrosion de SnO<sub>2</sub> sous polarisation anodique ne conduit pas à la formation de composés définis apparentés à des hydroxochlorures d'étain [2], contrairement à l'étain métallique. Par contre, les analyses XPS et EDX démontrent la présence d'intermédiaires de corrosion dont on va préciser le rôle dans l'évolution du potentiel de l'électrode après coupure de la polarisation.

#### III.6.1. Comportement de l'électrode sous polarisation anodique

On se propose de justifier l'origine de la polarisation de l'électrode SnO<sub>2</sub> acquise sous polarisation anodique à +1,5 V/ECS. Pour cela, on s'appuie sur les travaux antérieurs menés au laboratoire sur la corrosion de films SnO<sub>2</sub> polycristallins en milieu chlorure [3-4]. Le modèle réactionnel, qui a été proposé, rend compte formellement de la courbe courant-tension et des

effets de corrosion (vitesse de corrosion en fonction du potentiel et de la concentration en ions chlorure). Ce modèle décrit la compétition entre espèces hydroxyle et chlorure avec la surface de l'oxyde, *via* la formation d'intermédiaires de corrosion. Nous rappelons brièvement le schéma réactionnel initialement proposé (Figure III.14).



**Figure III.14:** Schéma réactionnel proposé montrant les étapes successives du processus de corrosion sur SnO<sub>2</sub> en milieu faiblement basique sous polarisation anodique.

Dans ce schéma, deux chemins significatifs sont considérés : (i) le chemin OH<sup>-</sup>/O<sub>2</sub> et (ii) le chemin Cl<sup>-</sup>/Cl<sub>2</sub>, qui impliquent des étapes électrochimiques et chimiques. Dans chaque chemin, la première étape correspond à la production des radicaux OH<sup>°</sup> et Cl<sup>°</sup> suivie par une étape d'adsorption conduisant à la fixation de ces radicaux sur des sites de surface X, soit X-OH et X-Cl. L'étape suivante, fondamentale dans la suite de ce travail, correspond à une séparation réversible des charges dans les groupements X-OH et X-Cl. Ceci conduit en régime stationnaire à une concentration surfacique en sites chargés positivement X<sup>⊕</sup>. Ces états

$X^{\oplus}$  constituent des intermédiaires de corrosion et contribuent à charger positivement la surface de SnO<sub>2</sub>.

Dans notre étude, nous allons expliquer l'évolution de potentiel d'abandon après polarisation à +1,5 V/ECS par la disparition progressive des sites  $X^{\oplus}$ .

Dans un premier temps, nous allons estimer l'ordre de grandeur de la concentration en sites  $X^{\oplus}$  chargés positivement à partir d'une simulation numérique avec le modèle de corrosion donné dans la figure III.14.  $c_1$ ,  $c_2$  et  $c_3$  représentent respectivement les concentrations surfaciques (en cm<sup>-2</sup>) des sites X-OH, X-Cl et  $X^{\oplus}$ ;  $[OH^{\circ}]$ ,  $[Cl^{\circ}]$  représentent les concentrations en volume des espèces radicalaires produites électrochimiquement à la surface. Les constantes en vitesse sont en s<sup>-1</sup>, sauf  $k_{a1}$ ,  $k_{a2}$ ,  $k_{t1}$  et  $k_{t2}$  en cm<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>. On définit  $c_0$ , la concentration surfacique totale en sites disponibles à la surface de SnO<sub>2</sub> ( $c_0 \approx 10^{15}$  cm<sup>-2</sup>).

Dans des conditions stationnaires, les concentrations des différents espèces s'expriment à partir des constantes de vitesse et des densités de courant  $i_1$  et  $i_2$  correspondant respectivement à la production des radicaux OH<sup>°</sup> et Cl<sup>°</sup>:

$$[OH^{\circ}] = \frac{i_1 / q}{K_{a1} c_0 + K_{t1} c_3} \quad \text{eq. III.3}$$

$$[Cl^{\circ}] = \frac{i_2 / q}{K_{a2} c_0 + K_{t2} c_3} \quad \text{eq. III.4}$$

$$[c_1] = \frac{K_{a1} c_0 [OH^{\circ}] + K_{d1} c_3}{K_{c1} + K_{ox1}} \quad \text{eq. III.5}$$

$$[c_2] = \frac{K_{a2} c_0 [Cl^{\circ}] + K_{d2} c_3}{K_{c2} + K_{c1}} \quad \text{eq. III.6}$$

$c_3$  est solution d'une équation non-linéaire qui s'écrit :

$$K_{c1} c_1 + K_{c2} c_2 - (K_{d1} + K_{d2} + K_{t1} [OH^{\circ}] + K_{t2} [Cl^{\circ}]) c_3 = 0 \quad \text{eq. III.7}$$

Compte tenu de la forte concentration en électrons de conduction ( $N_d \approx 10^{21}$  cm<sup>-3</sup>) des films SnO<sub>2</sub> dopés à l'antimoine, on doit nécessairement considérer la distribution du potentiel appliqué à l'interface entre la charge d'espace dans l'oxyde ( $\eta_{sc}$ ) et la double couche ( $\eta_h$ ) dans l'électrolyte. A une variation  $d\eta$  du potentiel appliqué, il correspond une variation  $d\eta_{sc}$  du potentiel vu par la charge d'espace :

$$d\eta_{sc} = \frac{C_h(\eta_{sc})}{C_{sc}(\eta_{sc}) + C_h} d\eta \quad \text{eq. III.8}$$

où  $C_{sc}(\eta_{sc})$  (pour le cas de SnO<sub>2</sub>:Sb2%  $C_{sc}(\eta_{sc} = 1.V) = 7\mu F/cm^2$ ) est la capacité de charge d'espace dans l'oxyde et  $C_h$  est la capacité de double couche ( $\approx 10\mu F/cm^2$ ).

Les courants dus aux réactions faradiques sont exprimés sous la forme suivante :

$$i(\eta) = I_o \exp\left[-\frac{\Phi_b(\eta)}{E_{oo}}\right] \exp(b\eta) \quad \text{eq. III.9}$$

Le second terme exponentiel  $\exp(b\eta)$  décrit classiquement l'activation par le potentiel appliqué. Le premier terme exponentiel décrit le contrôle du transport de charges par un processus tunnel dans l'oxyde.  $E_{oo}$  est une constante caractéristique des propriétés électroniques de l'oxyde et  $\Phi_b(\eta)$  est la barrière de potentiel, fonction du potentiel appliqué en raison des effets de charge de surface induits par les intermédiaires de corrosion chargés  $X^\oplus$  de concentration  $c_3$  :

$$(\Phi_b)_{m+1} = (\Phi_b)_0 + (d\eta_{sc})_m - q \frac{c_3}{c_h} \quad \text{eq. III.10}$$

Où  $(\Phi_b)_0$  représente la barrière de potentiel existante pour  $\eta = 0$ . La densité de courant totale  $i_{tot}$  s'écrit :

$$i_{tot}(\eta) = i_1 + i_2 + qk_{ox_1}c_1 + qk_{ox_2}[OH^\circ] + qK_{cl}c_2 \quad \text{eq. III.11}$$

La vitesse de corrosion  $v_{cor}$  s'exprime par :

$$v_{cor} = [k_{t_1}[OH^\circ] + k_{t_2}[Cl^\circ]]c_3M(Sn-O) \quad \text{eq. III.12}$$

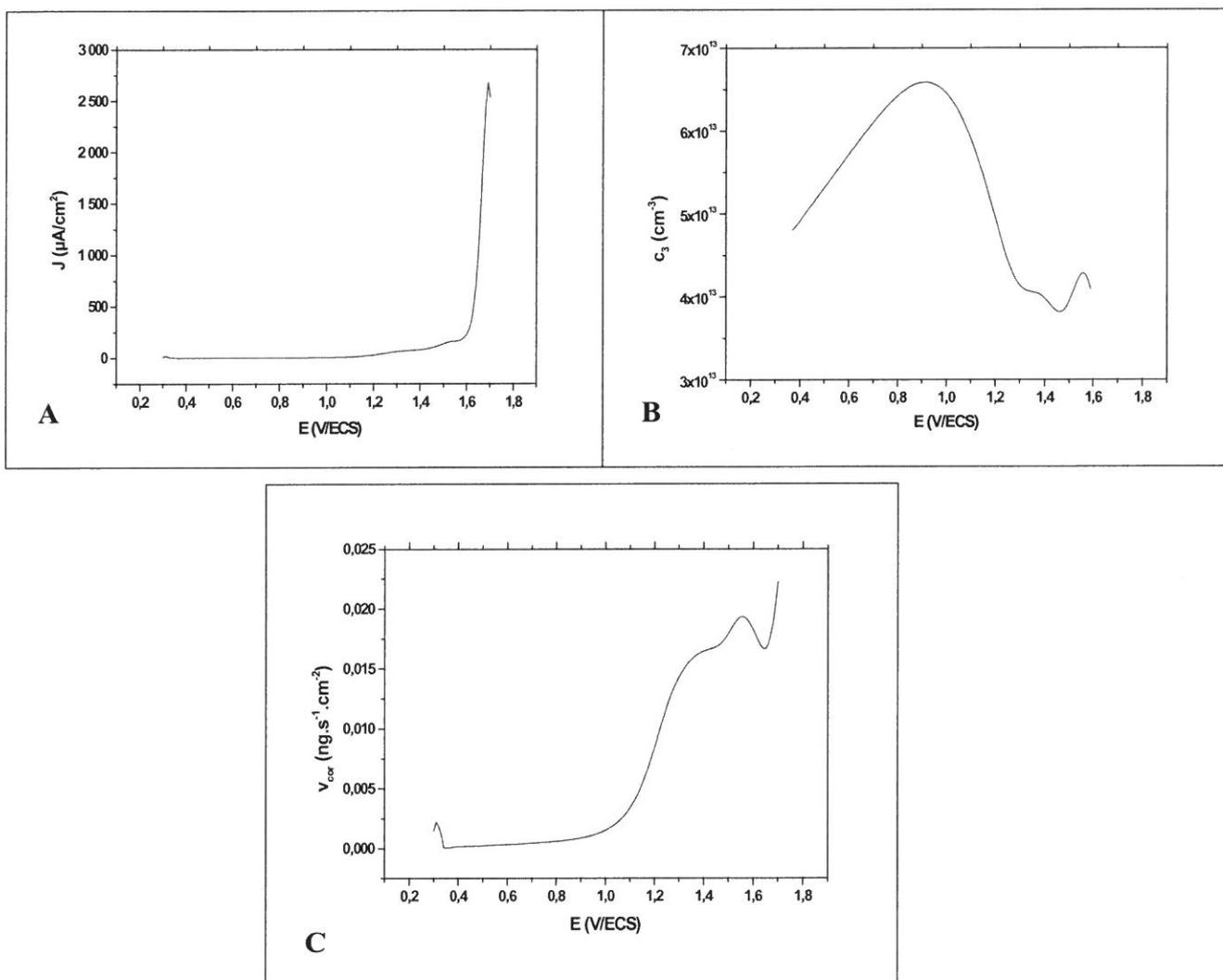
Où  $M(Sn-O)$  représente la masse d'une liaison Sn-O.

Nous avons appliqué ce modèle au cas du système SnO<sub>2</sub>:Sb2% en présence d'une solution contenant 0,5M d'ions chlorure, à un pH = 8. La simulation numérique a été effectuée à l'aide du logiciel Mathcad 7 (Mathsoft).

Les valeurs des paramètres utilisés pour la simulation sont données dans le tableau III.2. Les figures III.15.A, B et C illustrent respectivement la courbe courant-tension, la concentration  $c_3$  en sites chargés  $X^\oplus$  et la vitesse de corrosion en fonction du potentiel appliqué.

$i_{1o} (\text{OH}^-/\text{OH}^\circ)$	$i_{2o} (\text{Cl}^-/\text{Cl}^\circ)$	$k_{a1}$	$k_{a2}$	$k_{r0}$	$k_{3o}$	$k_{OX}$	$k_{t1}$
$9 \cdot 10^{-7} \text{ A}$	$50 \cdot 10^{-6} \text{ A}$	$2000 \text{ cm}^3/\text{s}$	$70 \text{ cm}^3/\text{s}$	$500 \text{ s}^{-1}$	$0,03 \text{ s}^{-1}$	$3,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$5 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$

**Tableau III.2 :** Les valeurs des paramètres utilisés pour la simulation



**Figure III.15 :** courbes obtenues pour la simulation A : courbe courant-tention, B : la concentration en sites chargés  $X^\oplus$  et C : la vitesse de corrosion en fonction du potentiel.

Dans cette simulation, la vitesse de corrosion en régime permanent est extrêmement faible, autour de  $0,02 \text{ ng cm}^{-2}\text{s}^{-1}$  dans ce domaine de potentiel autour de +1,5 V/ECS qui est celui de l'application anti-fouling. Le fait remarquable est la concentration surfacique en sites chargés qui est de l'ordre de  $4 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ . Cette estimation est en accord qualitatif avec les

concentrations superficielles en chlore trouvées par analyse XPS. A une telle densité, correspond une différence de potentiel interfaciale  $\Delta V = c_3 \times \frac{q}{c_h}$  :

$$\Delta V = \frac{5 \times 10^{13} \times 1,6 \times 10^{-19}}{10 \times 10^{-6}} = 0,8 \text{ V}$$

Ces intermédiaires chargés  $X^\oplus$  sont responsables d'une différence de potentiel à l'interface de l'ordre du volt, qui induit un déplacement équivalent des bords de bandes de SnO<sub>2</sub> par rapport à la référence de potentiel en solution. Sur la base de ces éléments, nous allons maintenant discuter le comportement du système en circuit ouvert, après interruption de la polarisation anodique.

### III.6.2. Evolution du potentiel de l'électrode après coupure de la polarisation anodique

Les résultats présentés dans ce chapitre (Figures III.3, III.7) montrent qu'après coupure de la polarisation anodique, le potentiel de l'électrode évolue lentement avec le temps vers des valeurs moins positives autour de +0,1 - +0,2 V/ECS. Une interprétation possible de cette dépolarisation de l'électrode consiste à l'attribuer à la neutralisation progressive des intermédiaires de corrosion  $X^\oplus$  dont on vient d'expliciter l'origine, à savoir la capture d'électrons dans des liaisons de surface par attaque radicalaire. Sous polarisation anodique, on maintient une concentration stationnaire des sites chargés positivement (constantes de vitesse  $k_{c1}$ ,  $k_{c2}$ ). En l'absence de polarisation, on supprime la formation des sites X-OH et X-Cl et on favorise le chemin inverse, c'est-à-dire la recombinaison des sites  $X^\oplus$  avec les ions Cl<sup>-</sup> ou OH<sup>-</sup> (constantes de vitesse  $k_{d1}$ ,  $k_{d2}$ ).

Formellement, l'évolution temporelle du potentiel d'abandon est décrite par une loi exponentielle du type :

$$\frac{d[X^\oplus]}{dt} = -\frac{t}{\tau}$$

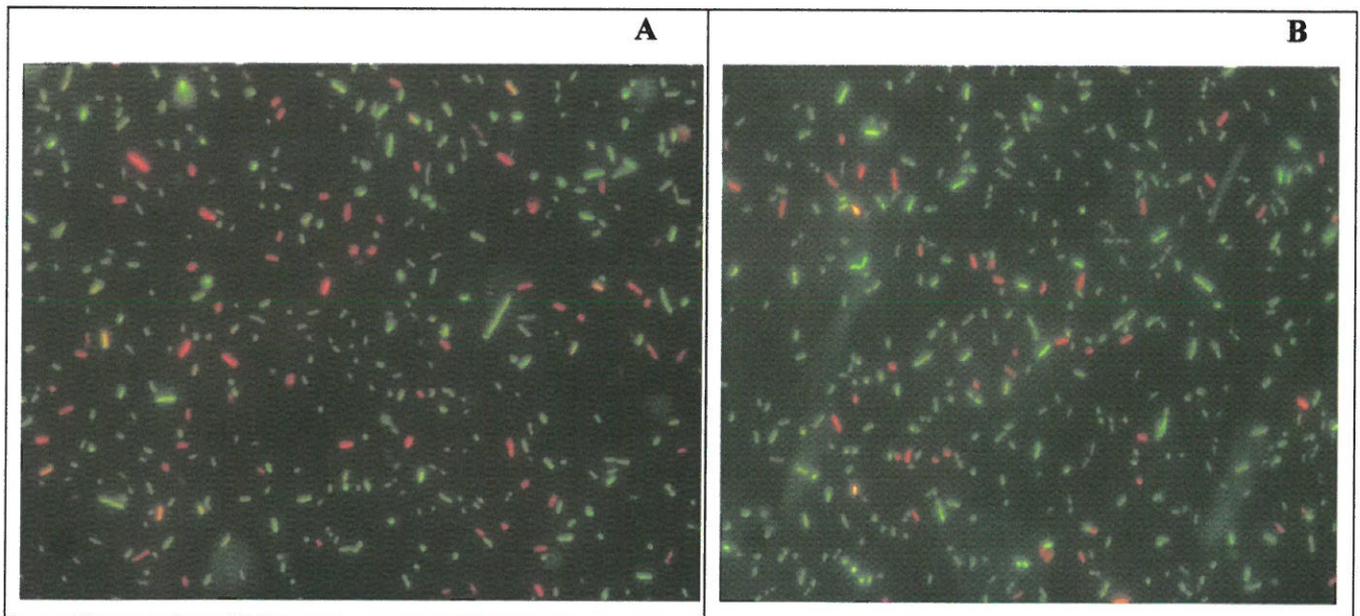
Les valeurs de  $\tau$  obtenues expérimentalement sont rassemblées dans le tableau 2

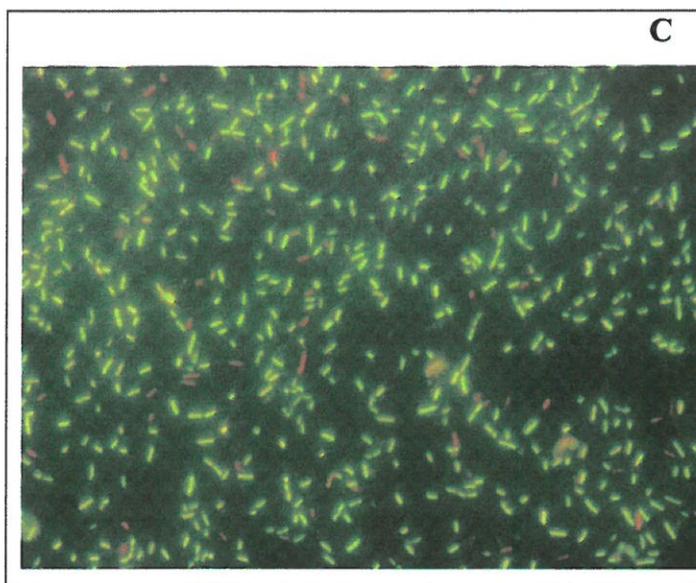
Figure	$\tau$ (s)
3.A	$t_1 = 600$
3.B	$t_1 = 300$ $t_2 = 1800$
7.A	$t_1 = 300$
7.B	$t_1 = 130$ $t_2 = 1100$

*Tableau III.2 : Les valeurs de  $\tau$  obtenues expérimentalement de potentiel d'abandon*

### III.7. Détermination de la viabilité des bactéries sur le film SnO<sub>2</sub> après polarisation anodique

L'étape de polarisation anodique est nécessaire pour rendre la surface du film SnO<sub>2</sub> plus réactive, mais non suffisante pour conférer à la surface des propriétés antisalissures comme la montre la figure III.16 quel que soit le milieu.





**Figure III.16 :** Images de bactéries *E.coli* obtenues par microscopie à fluorescence : (A) NaCl 0,5 M 1h30, (B) eau de mer 1h30 et (C) témoin SnO<sub>2</sub>.

Les images de coloration ont été obtenues à l'aide d'un microscope à fluorescence après 17 heures d'incubation dans un milieu nutritif qui contient NaCl 0,5 M et  $5 \times 10^7$  bactéries/mL, sur des surfaces SnO<sub>2</sub> polarisées à + 1,5 V/ECS pendant 1h30 dans NaCl 0,5M (A) et dans l'eau de mer (B).

Les deux surfaces de film SnO<sub>2</sub> ayant subi une polarisation anodique ne montrent aucun caractère anti-bactérien, en les comparant avec une surface non traitée (C).

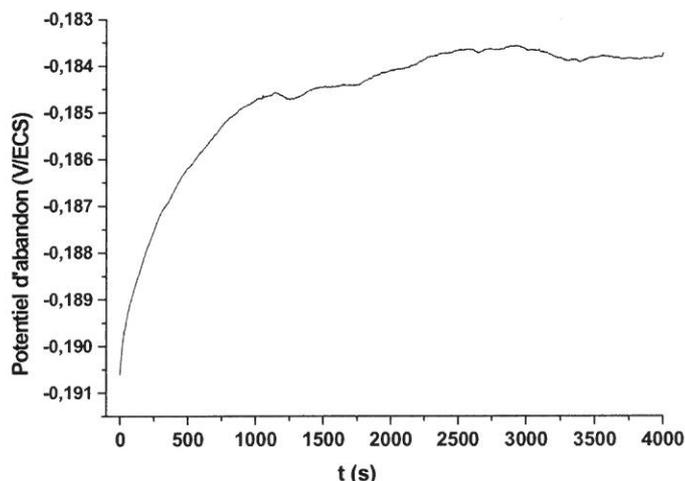
De nombreux auteurs ont étudié les mécanismes de formation du voile biologique<sup>[5-6-7]</sup>, et tous divisent le phénomène en trois grandes étapes : initiation, croissance et stabilisation. Ce qui nous intéresse plus pour notre travail c'est la première étape d'initiation. Cette étape a lieu dans les minutes qui suivent l'immersion et elle correspond à l'adsorption de macromolécules organiques (exopolymères, protéines ...) et/ou inorganiques présentes dans le milieu ou sécrétées par les organismes qui vivent dans ce milieu. Ces macromolécules s'adsorbent sous l'effet de plusieurs paramètres qui sont décrits dans le chapitre I.

Dans une première approche, nous avons recherché une origine purement inorganique à la propriété antifouling acquise par la surface d'un film d'oxyde d'étain après polarisation. Les modifications de surface de SnO<sub>2</sub> induites sous polarisation anodique en milieu chloruré, si elles permettent de conclure à un enrichissement de la surface en chlore, ne donnent pas lieu à la formation de composés de la famille des hydroxochlorures d'étain, connus pour inhiber la croissance des biofilms. Face à ce constat, nous avons considéré la possibilité d'une

contribution de la matière organique adsorbée sur la valeur du potentiel d'abandon Pour cette étude, nous avons retenu une protéine, l'albumine du sérum bovin (BSA), souvent choisie comme système modèle [8].

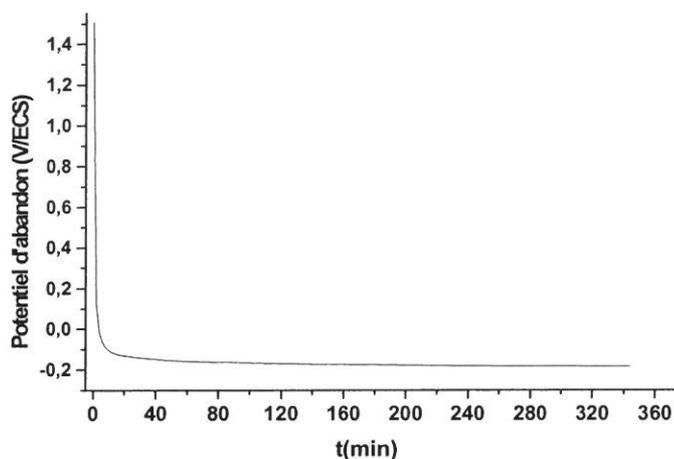
### III.8. Influence de molécules organiques

En collaboration avec le laboratoire Biomécanique et Génie médical (UMR 6600) de l'université de technologie de Compiègne, nous avons pu procéder à des premiers tests électrochimiques dans un milieu, ici du sérum physiologique, chargé en protéine 50 mg/mL en SAB. La figure III.17 montre l'évolution du potentiel d'abandon d'une électrode SnO<sub>2</sub>:F:Sb simplement immergé dans le sérum physiologique protéiné. On note que dans ces conditions, le potentiel d'abandon est négatif, autour de -0,18 V/ECS.



**Figure III.17 :** Evolution du potentiel d'abandon d'une électrode SnO<sub>2</sub>: F/Sb directement immergée dans du sérum physiologique protéiné.

L'échantillon a été ensuite polarisé à +1,5 V/ECS. Le transitoire de courant est relativement court. Le courant stationnaire s'établit à une valeur d'environ 90  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Le point intéressant est, lors de la mise hors tension, la dépolarisation très rapide de l'électrode avec retour à une valeur limite négative, vers -0,14 V/ECS (Fig.III.18). Le comportement dans ce milieu protéiné est complètement différent de ce que l'on observe dans des solutions électrolytiques inorganiques. Ce résultat montre un rôle non négligeable de la matière organique sur les phénomènes interfaciaux.



**Figure III.18:** Evolution du potentiel d'abandon d'une électrode SnO<sub>2</sub> : F/Sb après polarisation pendant 1 heure à +1,5 V/ECS dans du sérum physiologique protéiné.

Les études sur l'évolution temporelle du potentiel d'abandon dans différents milieux révèlent une différence drastique entre milieux sans et avec matière organique. En absence de matières organiques, le potentiel d'abandon reste positif dans l'échelle ECS au moins +300 mV. Par contre, en présence de matière organique, le potentiel d'abandon est systématiquement négatif, ce qui met en évidence une interaction forte entre la matière organique et la surface de l'oxyde d'étain sous et après polarisation anodique.

### III.9. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les modifications subies par la surface de l'oxyde d'étain au contact de milieux chlorurés sous une polarisation anodique permettant le dégagement de chlore actif à la surface. Dans ces conditions, on a établi qu'il n'y avait pas formation d'un composé défini du type hydroxochlorure d'étain. Par contre, il y a création d'intermédiaires de corrosion résultant de l'interaction des liaisons superficielles avec des espèces radicalaires OH° et Cl° électrogénérées. Sous polarisation, ces intermédiaires sont en partie porteurs d'une charge positive. La neutralisation progressive de ces intermédiaires chargés après coupure de la polarisation permet de rendre compte de l'évolution temporelle du potentiel d'abandon. La surface de SnO<sub>2</sub> ainsi modifiée sous polarisation n'acquière aucun caractère antibactérien. Enfin, nous avons mis en évidence un rôle particulier de la matière organique sous et après polarisation qui est étudié plus en détail dans le chapitre IV.

## Références du chapitre III

---

<sup>1</sup> H. Cachet, D. Festy, G. Folcher, F. Mazeas, B. Tribollet *Matériaux et Techniques*, **7/8** (2002) 37.

<sup>2</sup> Stacie E.Dunkle, « Romarchite and other corrosion phases on metal artefacts from the Queen Anne's Revenge (1718). Master of Science in Geological Sciences, April 2002, Virginia polytechnic Institute and state University, Blacksburg, Virginia (USA) ».

<sup>3</sup> F. ZENIA, Thèse de doctorat, Université Paris VI, 26 Novembre 1996.  
« Corrosion du dioxyde d'étain fortement dopé en milieu aqueux chloruré étudiée par électrogravimétrie et spectroscopie d'impédance ».

<sup>4</sup> H. Cachet, F. Zenia, M. Froment, *J. Electrochem. Soc.*, **146** (1999) (3) 977

<sup>5</sup> F. Feugeas, J-P- Magnin, A. Cornet, J-J- Rameau, *J. Physique III France* **7** (1997) 631

<sup>6</sup> C. Poleunis, C. Rubio, C. Compère, P. Bertrand, *Appl. Surf. Sci.*, **203-204**, (2003) 693

<sup>7</sup> C.M. Pradier, P. Bertrand, M.N. Bellon-Fontaine, C. Compère, D. Costa, P. Marcus, C. Poleunis, B. Rondot, M.G. Walls, *Surf. Interfaces Anal.* **30** (2000) 45.

<sup>8</sup> A.N. Asanov, L.J. DeLucas, P.B. Oldham, W.W. Wilson, *J. Colloid Interface Sci.* **191** (1997) 222.

## **CHAPITRE IV**

### **MISE EN EVIDENCE DE L'AGREGATION DE LA SAB SUR SnO<sub>2</sub>**

## CHAPITRE IV : MISE EN EVIDENCE DE L'AGREGATION DE LA SAB SUR SnO<sub>2</sub>

### IV.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'en milieu inorganique aucun composé ayant un caractère antibactérien ne se forme sur le film de dioxyde d'étain lors de la séquence de polarisation/non polarisation. Nous avons donc supposé que la matière organique a un effet antisalissure sur le film SnO<sub>2</sub> dans le milieu marin.

Présentement, on étudie la possibilité d'une contribution de la matière organique ayant interagi avec l'acide hypochloreux produit sous polarisation. Celui-ci peut en effet réagir avec des molécules biologiques comme les protéines<sup>[1-2-3]</sup>. On a choisi ici comme protéine modèle la Sérum Albumine Bovine (SAB)<sup>[4-5-6]</sup>. Son adsorption sur SnO<sub>2</sub> est étudiée *in situ* à l'aide d'une microbalance à quartz en fonction de la concentration volumique en SAB, de celle en ions Cl<sup>-</sup> et du potentiel appliqué. Les milieux choisis pour cette étude sont des solutions Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl et l'eau de mer naturelle puisée dans la rade de Brest.

Il est bien établi que l'adsorption de protéines sur un substrat constitue une première étape dans la formation de biosalissures<sup>[7]</sup>. Ce phénomène a lieu sur toute surface immergée dans des eaux douces ou salées, tels que rochers, installations portuaires, coques de navires, échangeurs de chaleur, instrumentations sous-marines, dans le domaine biomédical (dents, implants et prothèses, cathéters) et aussi dans celui de l'industrie agro-alimentaire. L'adsorption d'une macromolécule est généralement considérée comme irréversible du fait de la multiplicité des sites actifs possibles. Elle met en jeu principalement des forces de Van der Waals, des forces électrostatiques et, à très courtes distances, des interactions chimiques, par exemple de type acido-basique. De nombreux travaux<sup>[8-9-10-11]</sup> ont été consacrés à l'étude du processus d'adsorption de protéines via l'influence de divers paramètres agissant sur les interactions entre protéines et surface : la nature du substrat, celle de la protéine, le pH, la concentration en protéines et en ions, la température, et la charge de surface. Par ailleurs, quelques travaux ont été publiés sur l'oxydation de protéines par HClO en solution, concluant notamment à la formation de groupements chloramine<sup>[12-13-14-15]</sup> et de radicaux pouvant conduire à la fragmentation de la protéine. De tels groupements chloramine portés par des

protéines adsorbées à la surface de SnO<sub>2</sub> pourraient être à l'origine de la protection antisalissure persistant après coupure de la polarisation.

Dans cette perspective, on a étudié l'adsorption de la SAB sur un film de SnO<sub>2</sub>, en combinant des mesures de masse *in situ* par microbalance à quartz électrochimique (EQCM) et des analyses *ex situ* par spectroscopie de photoélectrons induits par rayonnement X (XPS), par Microscope Electronique à Balayage couplée à des analyses X (MEB-EDX) et par des tests biochimiques après désorption (SDS-PAGE et dosages protéiques).

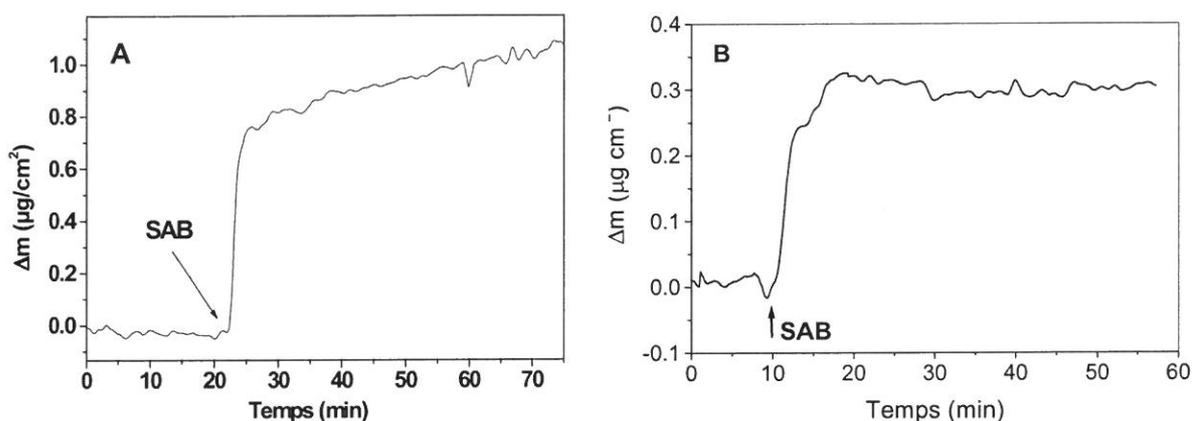
## IV.2. Réponses électrochimique et électrogravimétrique de films SnO<sub>2</sub> en présence de SAB

L'interaction entre la SAB et la surface d'une électrode de dioxyde d'étain en milieu chlorure a été étudiée par des mesures électrochimiques couplées avec des mesures de variation de masse à l'aide d'une microbalance à quartz. Selon les expériences, nous avons solubilisé la SAB dans des solutions salines à des concentrations variant de 0,1 à 5% (soit de 1 à 50 mg/mL), le pH du milieu variant entre 6,5 et 8,5 selon les conditions expérimentales.

Les mesures électrochimiques et électrogravimétriques ont été effectuées dans une cellule à trois électrodes de volume 30 mL. Tous les potentiels sont mesurés par rapport à une électrode de référence au calomel en solution saturée de KCl (ECS).

### IV.2.1. Adsorption de la SAB sur le film SnO<sub>2</sub> en circuit ouvert

Dans un premier temps, les expériences ont été réalisées au potentiel d'abandon afin de déterminer si la protéine s'adsorbe d'une façon spontanée sur la surface de SnO<sub>2</sub>. Le suivi de la variation de la masse en fonction du temps d'immersion est présenté dans la figure IV.1 pour deux milieux salins en présence de 5 mg/mL (0,5%) de SAB dans l'eau de mer (A) et dans NaCl 0,5M (B). Dans le cas de l'eau de mer, on constate que les molécules de SAB s'adsorbent dès la première minute sur la surface, la variation de masse atteignant 0,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ; ces résultats sont compatibles avec les données bibliographiques<sup>[16]</sup>. Par contre, dans le milieu artificiel, la variation de la masse n'est que de 0,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , ce qui représente environ une monocouche, en faisant l'hypothèse que la structure tertiaire est conservée et que les molécules de SAB sont disposées à plat à la surface de l'électrode. En effet, la quantité théorique de la SAB pour former une monocouche est de  $1,8 \cdot 10^{12}$  molécules par  $\text{cm}^2$ , soit 0,2  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , pour une adsorption parallèle à la surface, et de  $6,25 \cdot 10^{12}$  molécules par  $\text{cm}^2$ , soit 0,7  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , pour une adsorption perpendiculaire à la surface.



**Figure IV.1:** Variation en fonction du temps de la masse d'une électrode SnO<sub>2</sub> en milieu à 0,5% de SAB dans (A) eau de mer, (B) solution 0,5M NaCl.

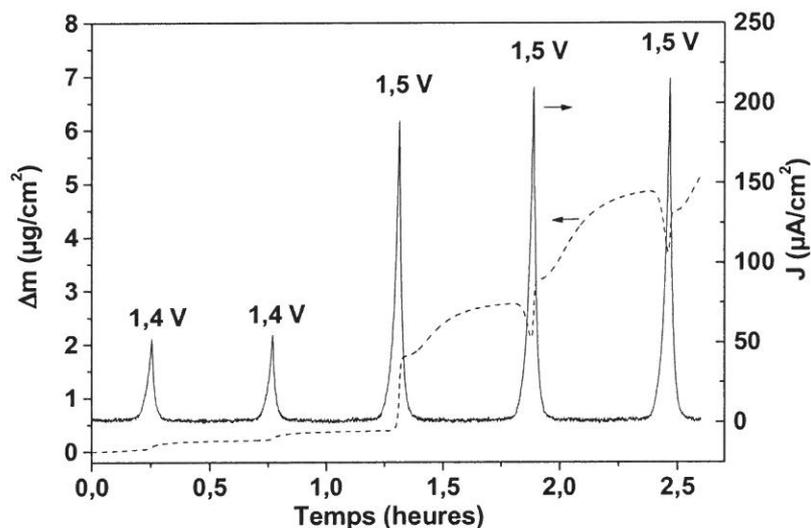
Les résultats obtenus en circuit ouvert montrent que la protéine SAB s'adsorbe spontanément sur le dioxyde d'étain, mais que la masse adsorbée dépend du milieu. Dans l'eau de mer, la masse adsorbée est trois fois plus importante qu'en milieu artificiel. Dans ce cas, les protéines seraient plutôt « debout » sur la surface. L'adsorption de la SAB dépend donc du milieu, la présence des cations (magnésium et calcium) stabilisant la structure dans le cas d'une simple immersion<sup>[17]</sup>. Dans la suite de ce travail, on va s'intéresser à l'adsorption de la SAB sous polarisation anodique.

#### IV.2.2. Adsorption de la SAB sur le film SnO<sub>2</sub> sous polarisation anodique

##### IV.2.2.1. La voltamétrie cyclique : influence de la borne supérieure du potentiel

L'effet d'un potentiel électrique sur l'adsorption des protéines a été très peu étudié dans la littérature. M. A. Bos et al<sup>[18]</sup> ont montré par réflectométrie optique que l'adsorption des protéines sur des électrodes en ITO (Indium tin oxide) dépend du potentiel appliqué, et également du pH et de la protéine étudiée. Asanov et coll.<sup>[19]</sup> ont étudié par la technique TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) l'adsorption de la SAB sur SnO<sub>2</sub> en fonction du potentiel entre +1,5 et -0,6 V(Ag/AgCl) dans un tampon phosphate à pH 7,4. L'adsorption est faible aux potentiels positifs et augmente aux potentiels les plus négatifs, en accord avec une augmentation de l'hydrophobicité de la surface. Nous verrons qu'en présence d'ions chlorure les conclusions sont très différentes. Dans un premier temps, nous avons étudié deux

domaines de potentiel [0 ; +1,4] et [0 ; +1,5]. La figure IV.2 illustre l'effet d'un cyclage du potentiel, entre 0 V et +1,4 V puis entre 0 et +1,5V, sur le courant anodique et sur la variation de la masse de l'électrode SnO<sub>2</sub>. Lorsque la limite anodique est +1,4V/ECS, la masse de l'électrode augmente peu. L'extension de cette limite à +1,5V permet d'obtenir des courants, plus élevés et a un effet spectaculaire sur l'adsorption de la SAB. Il y a un gain de masse de quelques  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  au passage vers +1,5V, suivi par une augmentation pendant une partie du cycle, puis par un quasi plateau. La diminution observée au pied de la vague de courant pourrait correspondre à la corrosion du substrat entraînant une désorption partielle des protéines. En effet, les travaux menés antérieurement au laboratoire [20-21] ont montré que le mécanisme de corrosion en présence d'ions chlorure a lieu dans un domaine étroit de potentiel (entre +1 et +1,4V/ECS) et centré vers +1,2 V/ECS. Il est à noter que cette séquence de corrosion est immédiatement suivie par un gain de masse de l'électrode, ce qui sous-entend que le mécanisme de corrosion de SnO<sub>2</sub> en milieu chlorure en créant des états de surface chargés positivement jouerait un rôle actif dans le processus d'adsorption de la SAB globalement chargée négativement.



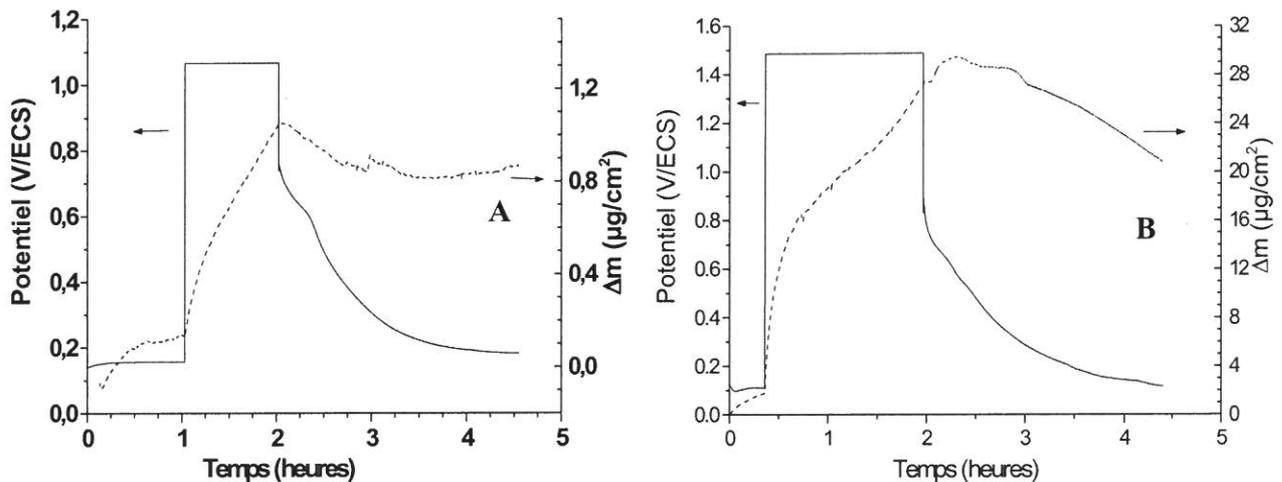
**Figure IV.2:** Réponses chronoélectrogravimétrique et chronoampérométrique d'un film SnO<sub>2</sub> dans 0,5M NaCl + 0,2% SAB lors de cycles de balayage de potentiel entre 0 et +1,4V/ECS à la vitesse de 1 mV/s puis entre 0 et +1,5V/ECS à la vitesse de 1 mV/s.

Après avoir constaté qu'il y a un rapport entre la masse adsorbée sur la surface de SnO<sub>2</sub> et le potentiel appliqué à l'électrode, *via* le courant d'oxydation produit à l'interface, on

va centrer notre étude sur le comportement de l'interface SnO<sub>2</sub>/électrolyte au potentiel  $E = 1,5$  V/ECS, potentiel correspondant au point de fonctionnement de nos électrodes dans l'eau de mer pour la protection des hublots vis-à-vis des biosalissures, suivant le procédé CNRS-IFREMER.

#### IV.2.2.2. Effet du potentiel anodique en fonction du temps

La figure IV.3 montre l'effet de l'application d'un potentiel anodique à un film SnO<sub>2</sub> au contact d'une solution NaCl 0,5M contenant 5% (50 mg/mL) d'albumine, respectivement +1,07 V/ECS (figure IV.3A) et +1,5 V/ECS (figure IV.3B). On retrouve qu'initialement, au potentiel de repos, l'adsorption est faible et elle augmente continûment en fonction du temps dès qu'un courant anodique apparaît. Sous polarisation, à +1,5 V/ECS, le gain de masse atteint 33  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour une valeur de courant de l'ordre 70  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , alors que pour un potentiel appliqué de 1,07 V/ECS qui correspond à un courant de 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  il n'est que de 0,8  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Après coupure de la polarisation, on observe une décroissance de la masse adsorbée, avec simultanément une décroissance lente du potentiel de circuit ouvert vers une valeur limite voisine de +0,2 V/ECS. Les résultats présentés dans les figures IV.2 et IV.3 montrent clairement que la masse adsorbée sur l'électrode de SnO<sub>2</sub> dépend fortement du courant anodique, fonction du potentiel appliqué.

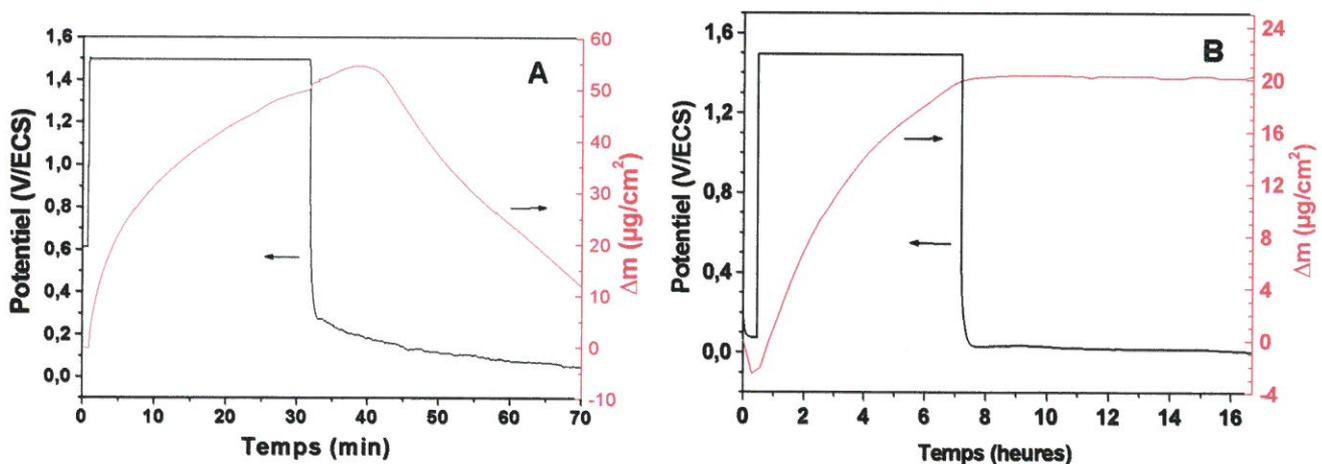


**Figure IV.3:** Réponses chronoélectrogravimétrique d'un film SnO<sub>2</sub> en circuit ouvert, puis polarisé à +1,07 V/ECS (A), ou à 1,5 V/ECS (B), puis à nouveau en circuit ouvert, dans un milieu 0,5M NaCl + SAB à 5%.

Après avoir vérifié l'effet du potentiel appliqué à l'électrode sur la masse adsorbée, nous avons diminué la concentration en volume de la SAB. La figure IV.4A reproduit le

même type d'expérience de chronoélectrogravimétrie que celles de la figure IV.3B, mise à part la concentration volumique en SAB qui est seulement de 0,3% (3 mg/mL). D'une part, l'adsorption sous polarisation anodique est toujours très conséquente, augmentant avec le temps de maintien de la polarisation. D'autre part, on constate que la cinétique de dépôt est plus rapide lorsque la concentration en SAB est plus faible. La figure IV.4B montre un enregistrement de chronoélectrogravimétrie en eau de mer naturelle dans laquelle on a ajouté de la SAB à la concentration de 0,3%. Sous polarisation à +1,5 V, il y a une forte augmentation de la masse en fonction du temps, comme observé en milieu artificiel mais, dans l'eau de mer, la vitesse de dépôt est plus faible qu'en milieu artificiel. Après environ 30 min de polarisation, la variation de masse atteint une valeur de 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en milieu artificiel alors que, dans l'eau de mer, elle est de l'ordre de 22  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  après 7 heures de polarisation. La différence marquante de la réponse électrogravimétrique dans la figure IV.4B est le plateau observé sur plusieurs d'heures après coupure de la polarisation, signifiant une très bonne stabilité de la couche protéique adsorbée en eau de mer naturelle.

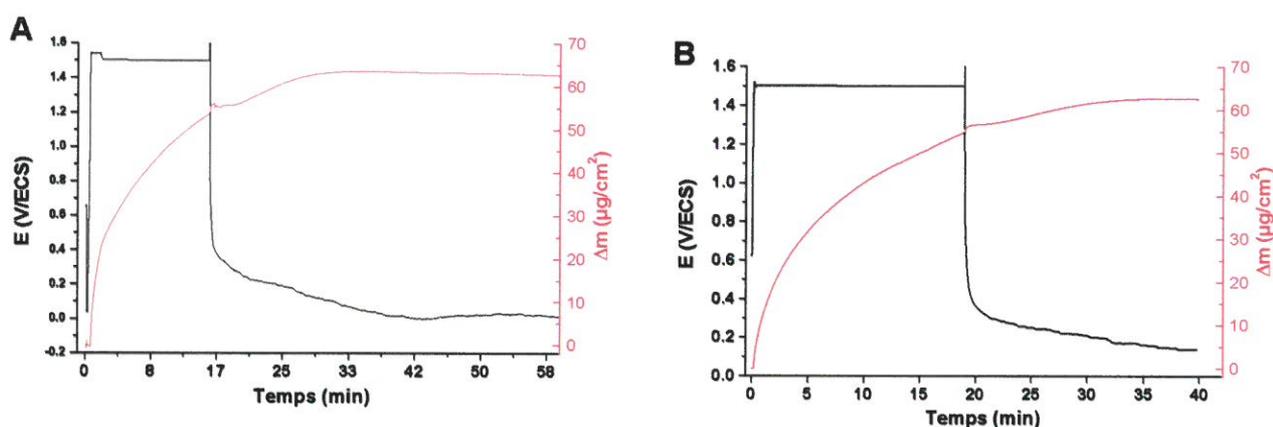
La composition de l'eau de mer pourrait jouer un rôle sur la stabilité de la couche adsorbée de la SAB sur le film SnO<sub>2</sub>. Ainsi les travaux de C. Rubio <sup>[7,17]</sup> ont montré le rôle positif des cations divalents (calcium, magnésium) sur l'adsorption des macromolécules (SAB) sur l'acier inoxydable.



**Figure IV.4 :** Réponses chronoélectrogravimétriques d'un film SnO<sub>2</sub> maintenu à +1,5 V/ECS puis laissé en circuit ouvert (A) dans un milieu 0,5M NaCl + SAB à 0,3% ; (B) dans l'eau de mer naturelle + SAB à 0,3%.

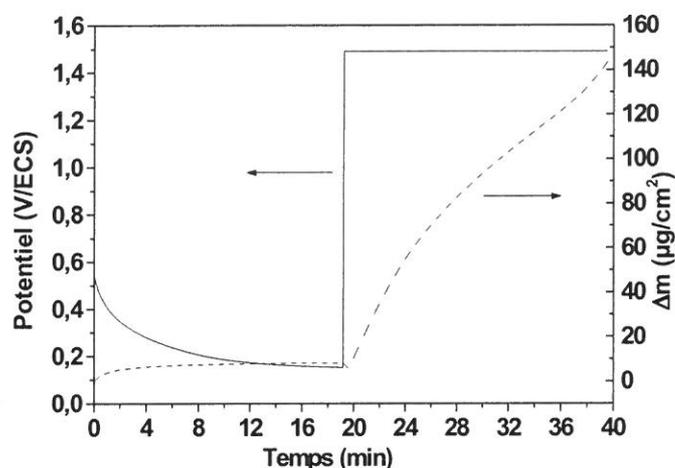
La figure IV.4B semble aller dans le sens de cette hypothèse, à savoir le rôle de ces deux cations, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, sur la stabilité, après coupure de la polarisation, du film organique formé sur SnO<sub>2</sub>. Pour le vérifier, on a repris la même concentration en volume de SAB

(0,3%), dans des solutions salines contenant NaCl + CaCl<sub>2</sub> et NaCl + MgCl<sub>2</sub>, aux concentrations respectives existant dans l'eau de mer (Figure IV.5). On observe le même comportement au niveau de la cinétique de dépôt que dans la solution contenant seulement NaCl (figure IV.4A). Par contre le film semble stabilisé. On en conclut que le comportement du film organique est modifié en présence des cations Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>. On peut donc penser que la stabilité du film observée en eau de mer naturelle est liée à la présence de ces deux cations.



**Figure IV.5 :** Réponses chronoélectrogravimétrique d'un film SnO<sub>2</sub> en circuit ouvert, puis maintenu à +1,5 V/ECS, (A) 0,3% SAB + NaCl + CaCl<sub>2</sub> (34,85 g/L + 1,15 g/L), (B) SAB 0,3% + NaCl + MgCl<sub>2</sub> (30,8 g/L + 5,2 g/L).

Des expériences ont été menées en utilisant des concentrations en protéine un peu plus faibles. La figure IV.6 montre la variation de la masse adsorbée sur le film SnO<sub>2</sub> en fonction du temps et du potentiel imposé lorsque la concentration en SAB est abaissée à 0,1%. On met en évidence l'importance du rapport entre le courant d'oxydation et la concentration en SAB. Pour les plus faibles concentrations, l'augmentation de la masse est plus rapide. Ce point sera discuté dans la dernière partie de ce chapitre.



**Figure IV.6:** Réponse chronoélectrogravimétrique d'un film SnO<sub>2</sub> en circuit ouvert, puis maintenu à +1,5 V/ECS dans l'eau de mer + SAB à 0,1%.

En conclusion de ces expériences, la masse de protéine déposée sur le film SnO<sub>2</sub> dépend de la concentration en volume de la matière organique et également du milieu. Dans le tableau IV.1, on a porté, à titre de comparaison, les valeurs de la vitesse moyenne de dépôt ( $v_m$ ) définie comme le rapport de la quantité déposée  $\Delta m$  au bout d'un temps  $\Delta t$ . Les valeurs les plus élevées de  $v_m$  sont atteintes pour une concentration en volume de 1 mg/mL (0,1%).

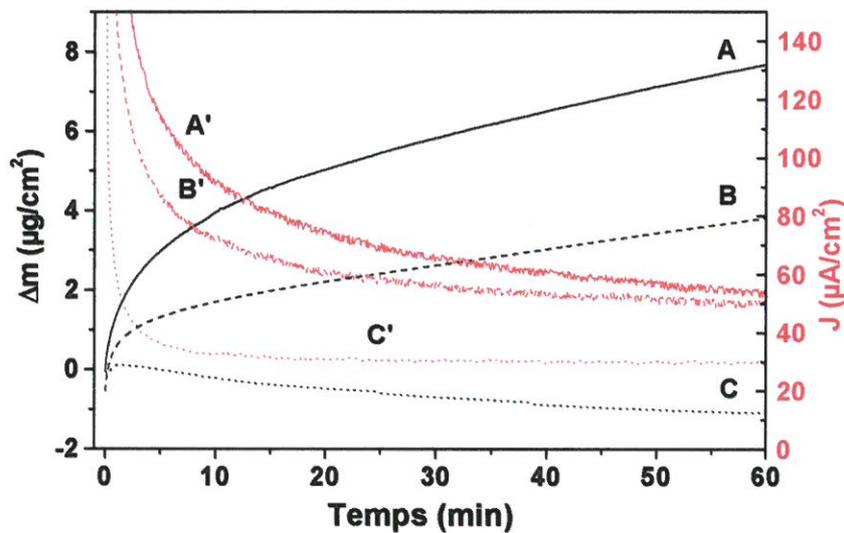
SAB (%)	NaCl 0,5M	Eau de mer
0,1	7	6,8
0,3	2,1	0,05
5	0,25	-

**Tableau IV.1 :** Vitesse moyenne de dépôt sous polarisation à +1,5 V/ECS exprimée en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  en fonction du milieu et de la concentration volumique en SAB.

Les études électrochimiques que nous avons réalisées jusqu'à présent ont mis en évidence un effet du courant anodique sur l'adsorption des protéines dans un milieu salin soit naturel, soit artificiel. Cette adsorption est faible en circuit ouvert, comparable à ce qui est observé dans la littérature [22-23]. En revanche, elle devient très conséquente dès que le potentiel atteint 1,5 V/ECS en présence d'ions chlorures c'est-à-dire dès que HClO est produit. Pour cette raison, on va dans la suite approfondir l'effet des ions chlorure sur l'adsorption de la protéine SAB.

**IV.2.2.3. Effet de la concentration en NaCl**

Nous avons choisi 3 milieux différents pour vérifier l'effet des ions chlorure sur l'adsorption des protéines : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M, NaCl 0,15M et NaCl 0,5M. La figure IV.7 illustre l'effet de la concentration volumique en chlorure dans le milieu électrolytique. Lorsque la concentration en chlorure est nulle, on observe une légère perte de masse. Elle peut être expliquée par la combinaison d'une perte et un gain de masse simultanés qui ont lieu à la surface du film de SnO<sub>2</sub>. La perte de masse traduit une faible corrosion du film dans ce milieu. En présence d'ions chlorure, on constate que le courant est bien fonction de leur concentration dans la solution. Quant à la variation de masse du film de SnO<sub>2</sub>, elle est d'autant plus importante que le courant anodique est élevé. Après 60 minutes de polarisation, le gain de masse est de 4 µg/cm<sup>2</sup> pour une concentration en chlorures de 0,15 M et près du double pour une concentration de 0,5 M.

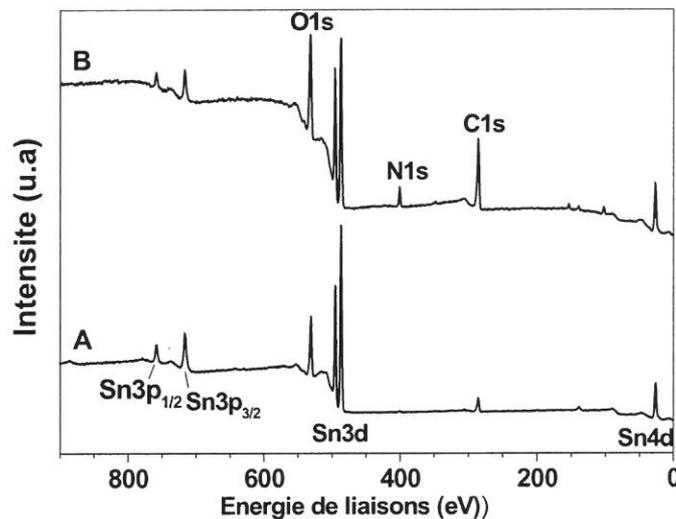


**Figure IV.7:** Effet de la concentration en NaCl de l'électrolyte sur les réponses chronoélectrogravimétrique et chronoampérométrique d'un film SnO<sub>2</sub> polarisé à +1,5 V/ECS dans une solution de SAB à 0,3%. Solutions : (A, A') NaCl 0,5M, (B, B') NaCl 0,15M, (C, C') Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M.

### IV.3. Analyse par XPS de la composition chimique de la surface de SnO<sub>2</sub>

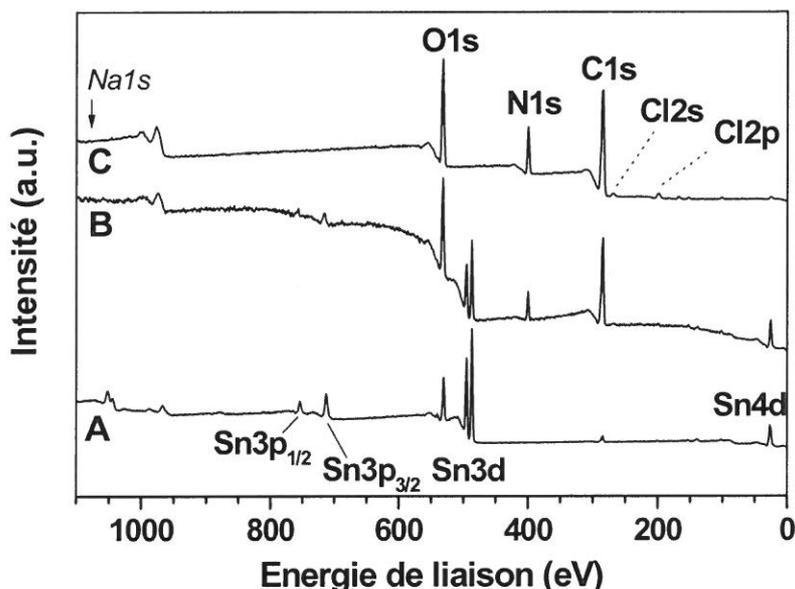
Afin d'obtenir des informations sur la composition chimique du dépôt formé à la surface de l'oxyde d'étain, nous avons utilisé deux techniques *ex situ* : la première est une technique d'analyse de surface par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) et la deuxième est une technique d'observation, la microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à une analyse EDX. Dans un premier temps, on a caractérisé la surface d'un film SnO<sub>2</sub> tel que fabriqué afin d'obtenir une référence. La figure IV.8 représente le spectre général d'un film SnO<sub>2</sub> déposé sur une lame de verre après nettoyage à l'éthanol (spectre A). Outre les différents photopics dus à l'étain et à l'oxygène, la présence de carbone est détectée, correspondant au carbone de contamination. Le spectre B a été obtenu pour un échantillon ayant été immergé dans une solution renfermant de la SAB. On constate que, outre les pics dus au substrat, on détecte un pic vers 400eV dû à l'azote provenant de la matière organique. De plus l'intensité des photopics dus à Sn étant toujours importante, on en déduit que le film organique présent sur la surface est très mince. On vérifie donc les résultats obtenus par microbalance qui indiquent qu'en circuit ouvert une 'monocouche' de SAB s'adsorbe à la surface de SnO<sub>2</sub>.

Pour vérifier l'agrégation de la SAB sur la surface de SnO<sub>2</sub> lors de la production de HClO, on a préparé trois échantillons de SnO<sub>2</sub>, polarisés pendant deux heures dans différents



**Figure IV.8 :** Spectres XPS de films SnO<sub>2</sub>, (A) tel que fabriqué, (B) après immersion pendant 1 heure dans une solution 0,5M NaCl + SAB à 0,1%.

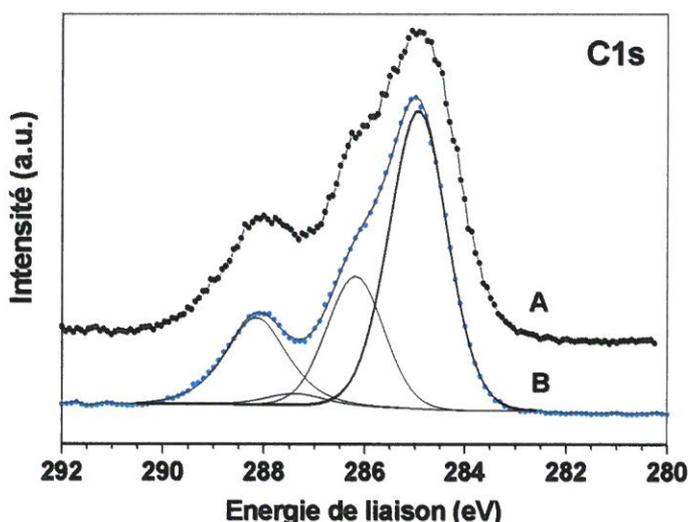
milieux : NaCl sans SAB, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avec SAB et NaCl avec SAB. Les échantillons ont été analysés après avoir été rincés à l'eau bidistillée. Les spectres XPS présentés dans la figure IV.9 confirment, d'une part, qu'en absence de protéine dans le milieu après polarisation, la surface de l'échantillon est similaire à la surface initiale (spectre A), d'autre part, qu'au bout de deux heures de polarisation dans Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M (spectre B), on observe les signaux du carbone et de l'azote, signaux qui sont dus à la matière organique présente dans la solution ; le substrat (signaux Sn et O) est toujours détecté, ce qui signifie que la quantité adsorbée est faible. Ces résultats montrent donc qu'il y a une adsorption de la SAB même dans un milieu non chloruré mais que celle-ci reste très faible par rapport à ce qui est obtenu sous polarisation anodique dans un milieu chloruré (spectre C). En effet, après polarisation en présence de chlorures et de protéines, le substrat n'est plus détecté. L'épaisseur du 'film' organique est donc important (>5-10 nm). Outre les pics C1s, N1s et O1s, on détecte les pics dus aux atomes de soufre présents dans les acides aminés Met et Cys. De plus, le résultat majeur de cette étude concerne la détection de chlore. Na n'étant pas détecté (Na1s : 1070eV), on peut en déduire que le chlore est lié à la matière organique.



**Figure IV.9:** Spectres XPS de films de SnO<sub>2</sub> après polarisation à 1,5V dans une solution: (A) 0,5M NaCl sans SAB ; (B) 1 mg/mL SAB + 0,5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et (C) 1 mg/mL SAB + 0,5M NaCl.

Le spectre du carbone à haute résolution est identique à celui obtenu pour la poudre de SAB (Fig. IV.10). On peut donc en conclure que la structure primaire de la SAB est conservée. Cela sera vérifié grâce aux expériences d'électrophorèse.

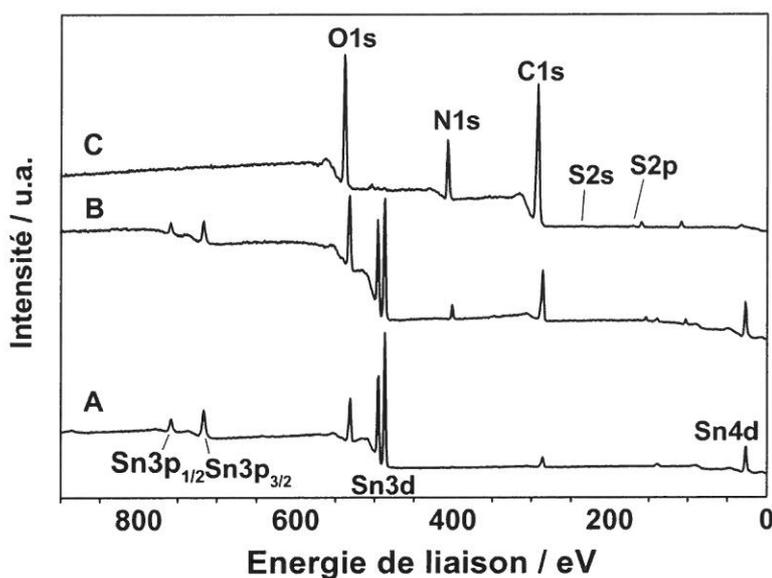
La figure IV.10 montre les spectres du carbone pour le niveau de cœur C1s enregistrés, d'une part, pour un film SnO<sub>2</sub> polarisé 2 heures à  $E = +1,5$  V/ECS dans une solution saline NaCl 0,5M contenant 0,1% de la SAB (A) et, d'autre part, pour de l'albumine en poudre (B). Une déconvolution permet d'identifier les principaux groupements chimiques présents. Pour les deux échantillons, quatre composantes sont présentes respectivement à 285,0 ; 286,2 ; 287,4 et 288,4 eV. Celle à 285 eV correspond à des liaisons de type C-H et C-C ; celle à 286,2 eV peut être attribuée à des liaisons de type C-N et C-O et celle à 287,4 eV correspond à des liaisons de type C=N ou N-C=C ; enfin, celle à plus haute énergie, correspond à des atomes de carbone impliqués dans des fonctions COOH et CONH<sup>[24]</sup>.



**Figure IV.10:** (A) Spectre C1s d'un film SnO<sub>2</sub> polarisé 2 heures dans NaCl 0,5M + 0,1% SAB, (B) spectre C1s de l'albumine en poudre.

Dans ce qui suit, on a augmenté la concentration de la SAB dans la solution. La figure IV.11 montre les spectres XPS de films SnO<sub>2</sub> déposés sur des lames de verre, soit simplement immergé pendant 20 heures, soit polarisé à +1,5 V pendant 20 heures également, dans une solution 0,5M NaCl contenant de la SAB à une concentration de 3% (30 mg/mL). Les spectres de ces deux échantillons sont à comparer à celui d'un échantillon témoin, tel que fabriqué (A). Après une simple immersion (B), on voit apparaître la contribution des photopics N1s et C1s, caractéristiques de la matière organique, mais la signature du substrat SnO<sub>2</sub> est toujours nettement présente. Par contre, après 20 heures sous polarisation (C), les pics N1s et C1s sont beaucoup plus intenses et la contribution du substrat a maintenant totalement disparu. On détecte également du soufre, dû aux acides aminés soufrés. Lorsque la concentration dans la solution en SAB est importante, on ne détecte plus de chlore sur la

surface des films de SnO<sub>2</sub>. Ce résultat sera expliqué dans la partie discussion du présent chapitre.



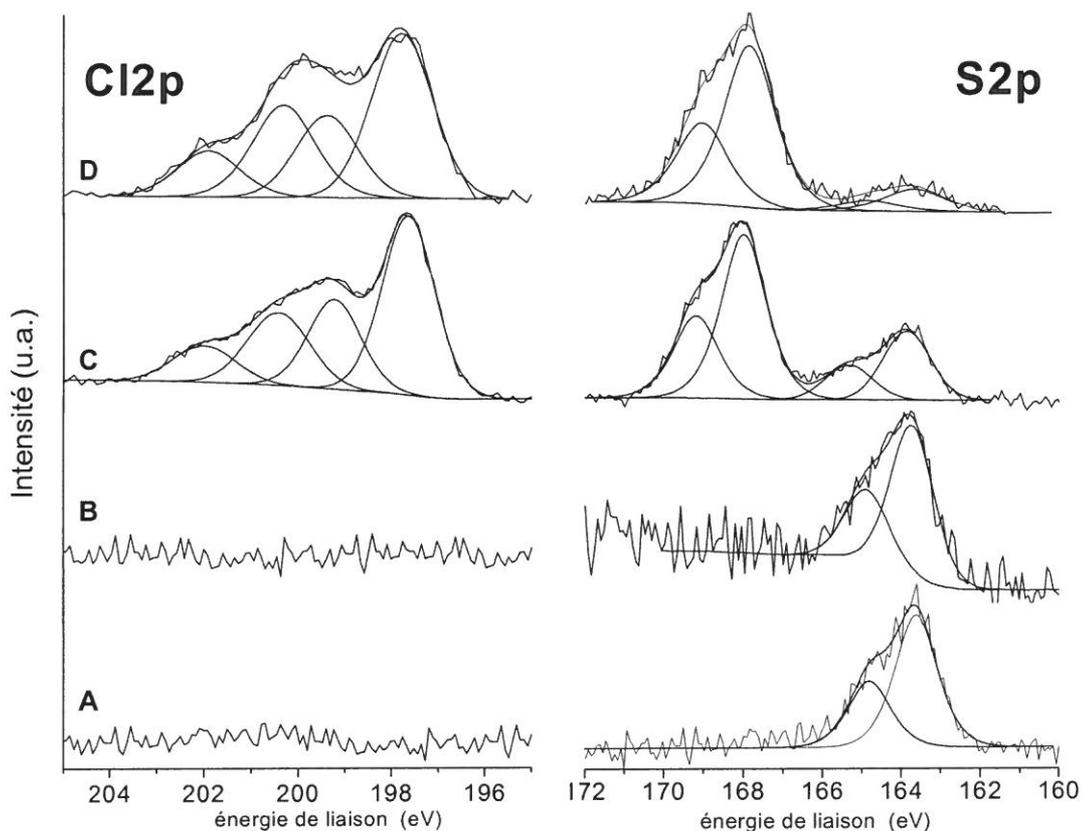
**Figure IV.11:** Spectres XPS de films SnO<sub>2</sub>, (A) tel que fabriqué, (B) après immersion en circuit ouvert pendant 20 heures, (C) après immersion sous polarisation à +1,5 V/ECS pendant 20 heures, dans une solution 0,5M NaCl + SAB à 3%.

La figure IV.12 illustre les spectres à haute résolution en énergie des niveaux Cl2p et S2p. Ces spectres ont été 'déconvolués' en prenant en compte les niveaux 3/2 et 1/2, l'aire de la contribution 1/2 étant fixée à la moitié de celle de la contribution 3/2 et les différences d'énergie 3/2-1/2 étant également fixées. Concernant le signal du chlore, il y a deux composantes présentes dans le domaine 196 à 204 eV pour les deux échantillons traités électrochimiquement (C et D). La contribution vers 197,8eV est attribuée aux liaisons du type chloramine, la seconde à 200,6eV est attribuée au chlore engagé dans des groupements -SO<sub>2</sub>Cl (voir le tableau IV.2). Ces attributions seront discutées dans la dernière partie de ce chapitre.

Les graphes IV.12A et B présentent respectivement les spectres à haute résolution relatifs à l'albumine en poudre et à un échantillon SnO<sub>2</sub> qui a été simplement immergé dans une solution NaCl 0,5M contenant de la SAB. Les deux spectres montrent la présence d'une contribution vers 163,6 eV. Dans le chapitre I, nous avons signalé que l'albumine contient deux acides aminés soufrés, la cystéine et la méthionine et également des ponts disulfure

(cystine). En effet, la chaîne latérale de la cystéine porte un groupement sulfhydryle (-SH). L'autre acide aminé sulfuré, la méthionine, porte un groupe méthyle supplémentaire (-S-CH<sub>3</sub>).

Quant aux spectres C et D, ils correspondent à des films SnO<sub>2</sub> polarisés à 1,5V/ECS dans une solution de SAB à 0,1%. Par comparaison avec les deux premiers spectres, une contribution supplémentaire est observée entre 167 et 169 eV, elle correspond à du soufre oxydé soit sous forme -SO<sub>2</sub>Cl et/ou -SO<sub>2</sub>-NH- (voir le tableau IV.2).



**Figure IV.12:** Photopies Cl<sub>2p</sub> et S<sub>2p</sub>. Les spectres XPS correspondent respectivement (A) : SAB en poudre, (B) : SnO<sub>2</sub> après immersion dans la solution SAB 0,1%, (C) et (D) : films SnO<sub>2</sub> polarisés à +1,5 V/ECS en présence de SAB à 0,1% et NaCl 0,5M.

Les conclusions générales de cette série d'analyses XPS sur les échantillons C et D polarisés dans une solution de NaCl contenant de la SAB sont résumées dans le tableau IV.2. Le tableau contient, d'une part, le type de liaison chimique impliquée, d'autre part, des données quantitatives sur les concentrations superficielles relatives en éléments soufre et chlore. Les valeurs des concentrations ont été déterminées à partir de l'aire des pics Cl<sub>2p<sub>3/2</sub></sub> et S<sub>2p<sub>3/2</sub></sub> en utilisant des facteurs de sensibilité égaux, respectivement, à 1,51 et 1,11.

L'ensemble de ces résultats est caractéristique du comportement des électrodes SnO<sub>2</sub> lors de la production de HClO en présence de protéines.

Photopics	Cl2p <sub>3/2</sub>	Cl2p <sub>3/2</sub>	S2p <sub>3/2</sub>	S2p <sub>3/2</sub>
Energie de liaison (eV)	200,6	197,8	168,0	163,6
Echantillon D	25,3 %	43,7%	27,3%	3,7%
Echantillon C	19,7 %	43,7 %	25,8 %	10,8 %
Type de liaison	-SO <sub>2</sub> Cl	-NHCl	-SO <sub>2</sub> -Cl et/ou -SO <sub>2</sub> -N-	-SH et/ou -S-S-

**Tableau IV.2:** Composition atomique partielle obtenue par XPS pour les éléments soufre et chlore correspondant aux spectres C et D présentés figure IV.12.

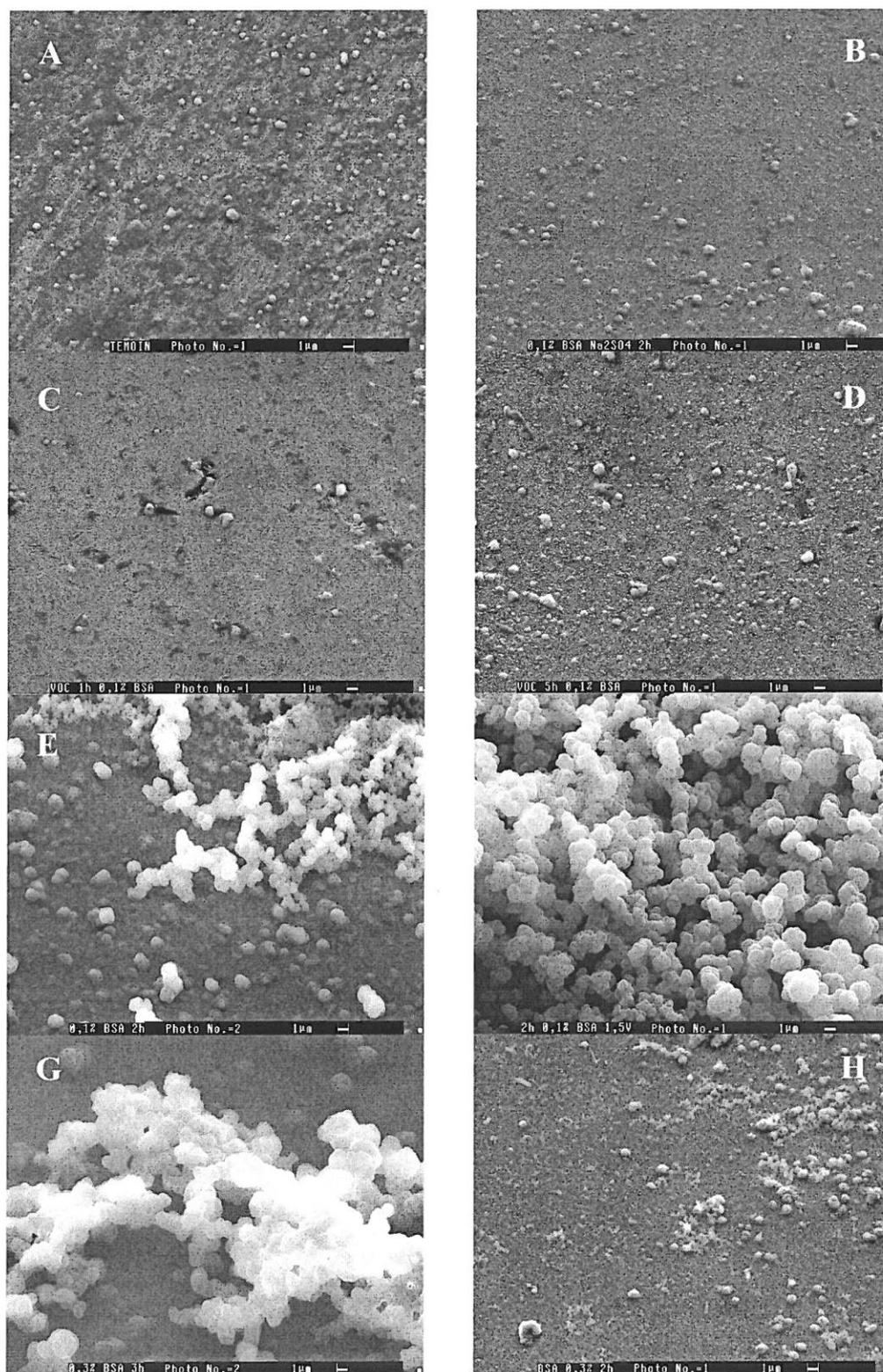
## IV.4. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB)

### IV.4.1. Milieu artificiel

Les observations MEB, présentées dans les figures IV.13A-H, peuvent être classées en deux groupes : (i) électrode en circuit ouvert A à D, (ii) électrode polarisée anodiquement en présence de chlorure et de SAB E à H.

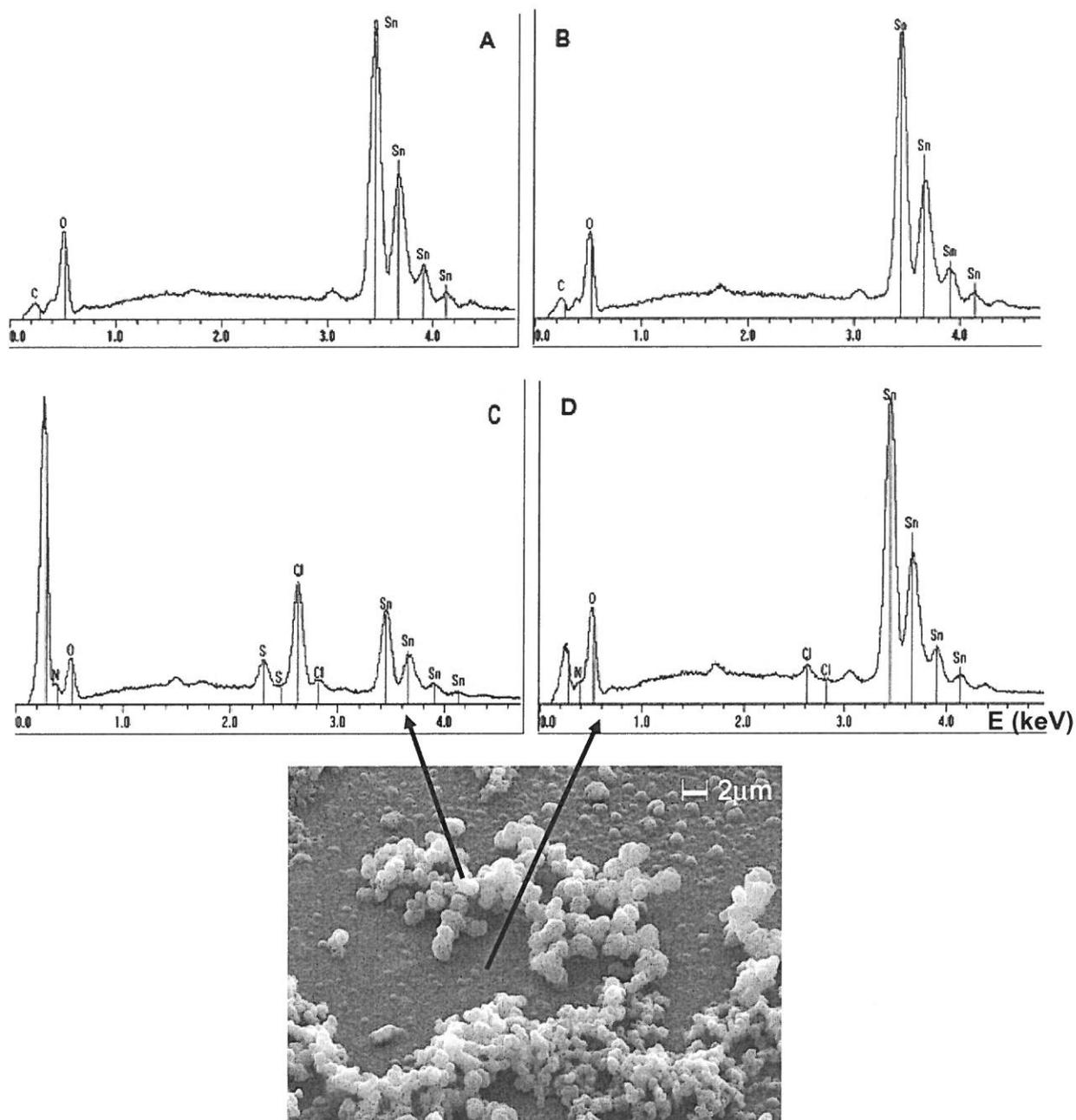
Dans la première catégorie, les échantillons de film SnO<sub>2</sub> ont été simplement immergés dans une solution saline NaCl 0,5M contenant 0,1% d'albumine (figures IV.13C et D) pendant 1 heure et 5 heures respectivement. Toutes les photos MEB sont prises après rinçage 3 fois pendant 10 minutes avec de l'eau bidistillée.

Dans la seconde catégorie, l'effet de la polarisation sur l'adsorption des protéines apparaît nettement dans les figures IV.13 E, F, G et H. On constate la formation d'agrégats à la surface des échantillons, ce qui explique les masses importantes mesurées par électrogravimétrie. La comparaison des images IV.13B (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M + 0,1% SAB) et l'image IV.13E (NaCl 0,5M + 0,1% SAB) permet de vérifier que la présence des ions chlorure dans la solution a un effet spectaculaire sur l'adsorption des protéines sur les films de SnO<sub>2</sub>. Les observations MEB de films SnO<sub>2</sub>, après polarisation anodique à +1,5 V/ECS dans l'eau de mer naturelle et dans NaCl 0,5 M, contenant de la SAB à différentes concentrations (0,05% et 0,1%), montrent également l'effet spectaculaire de la polarisation (voir chapitre IV.4.2).



**Figure IV.13 :** Observations MEB de la surface de films SnO<sub>2</sub> polarisés ou non dans différents milieux artificiels : (A) Témoin SnO<sub>2</sub>; (B) E = +1,5 V/ECS Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+ 0,1% SAB ; en circuit ouvert 0,1% SAB+0,5M NaCl (C) t=1h, (D) t=5h ; (E) et (F) 0,1% SAB + 0,5M NaCl t=2h et E = +1,5VECS, (G) E =

+1,5VECS + 0,3% SAB + 0,5M NaCl t = 3h ; (H) 0,3% SAB + 0,5M NaCl à E = +1,5VECS pour t=2h.



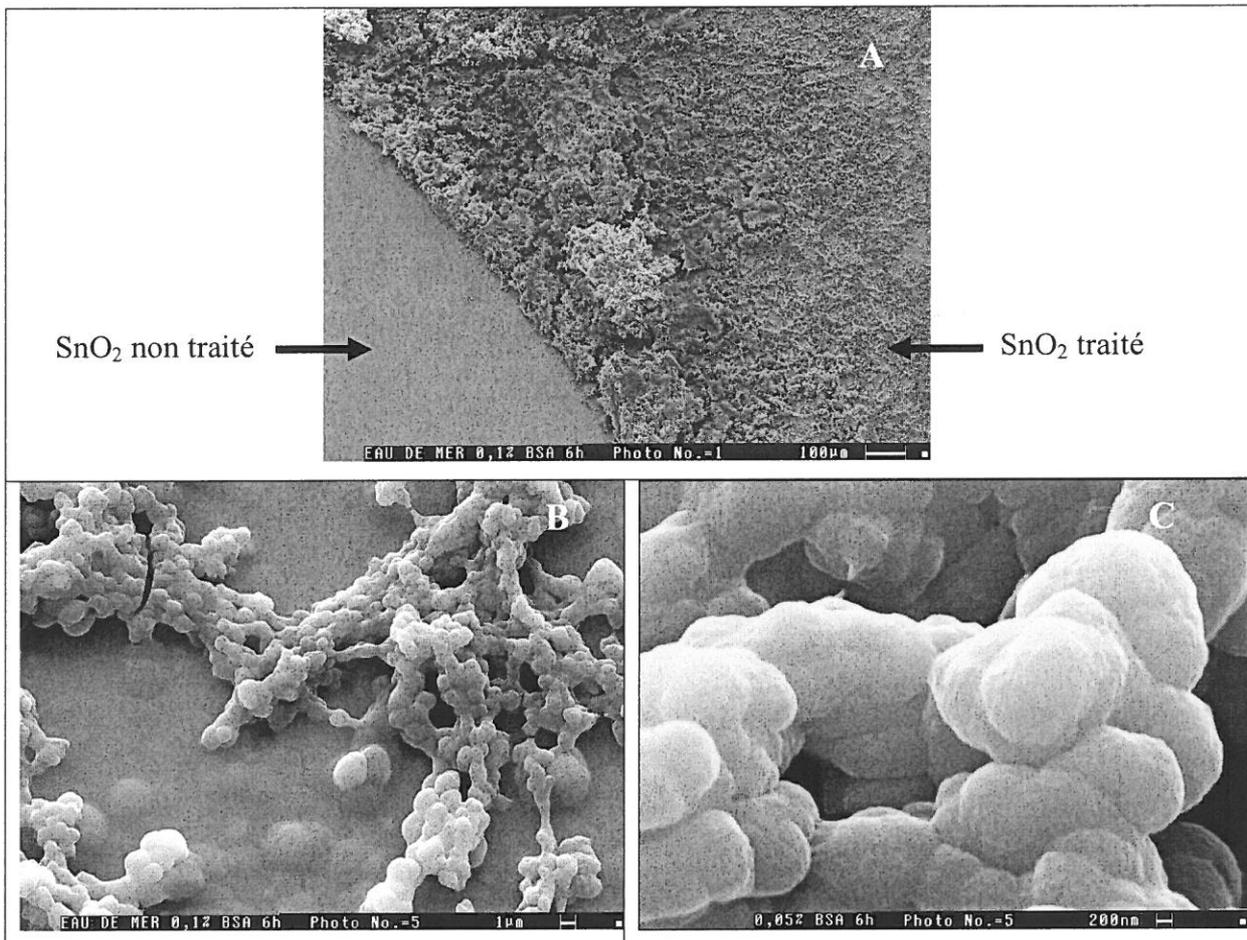
**Figure IV.14** : Spectres EDX obtenus sur des échantillons de SnO<sub>2</sub>: (A) Témoin, (B) après 54 heures d'immersion dans la solution 0,1% SAB + 0,5M NaCl, (C) et (D) après 2 heures de polarisation à 1,5V/ECS dans la solution 0,1% SAB + 0,5M NaCl.

Quelle que soit la concentration en volume de la SAB, nous avons pu mettre en évidence directement par les observations MEB l'adsorption de la protéine sur le film SnO<sub>2</sub> après polarisation.

Les spectres EDX présentés dans la figure IV.14 confirment ce que nous avons obtenu précédemment (figure IV.13). Les spectres A et B ont été obtenus respectivement pour un film SnO<sub>2</sub> non traité et pour un échantillon qui a été immergé pendant 54 heures dans une solution NaCl 0,5M et 1 mg/mL de SAB. Les spectres C et D illustrent l'effet de la polarisation à +1,5 V/ECS sur l'adsorption de la SAB. Le spectre D est relatif aux zones grisées où le dépôt de protéine est moins épais ; le signal du chlore est visible et celui de l'étain encore important. Le spectre C correspond aux agrégats visibles en blanc sur l'image MEB (Fig.IV.14) ; l'intensité des signaux dus à l'étain est diminuée; par contre, celle des signaux dus au chlore, soufre et carbone est augmentée, en accord avec une quantité importante de matière protéique présente sur la surface.

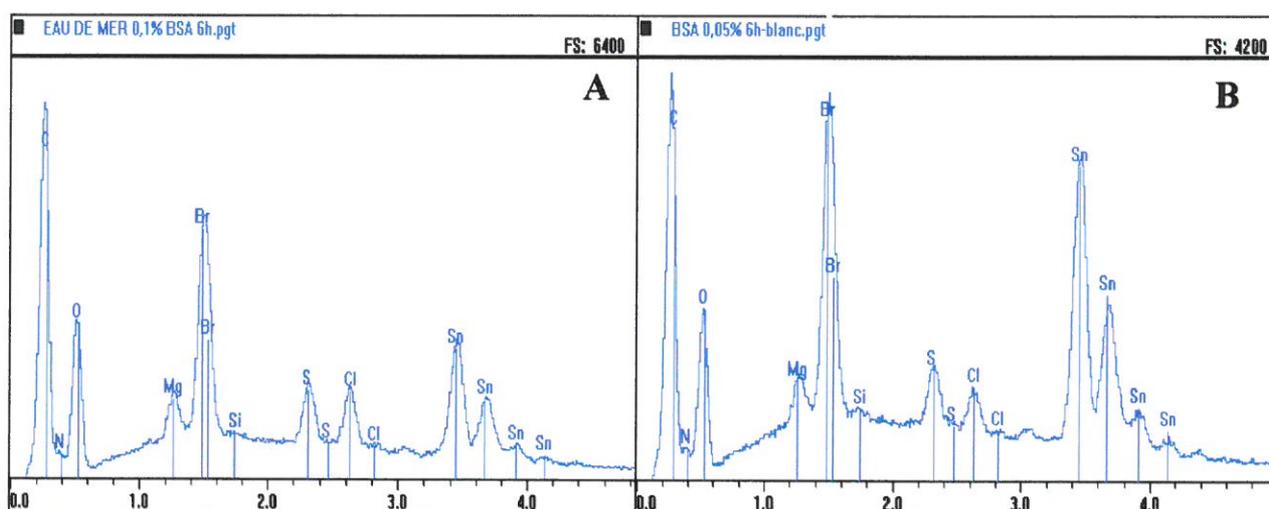
#### IV.4.2. Eau de mer

Une série d'expériences a été effectuée avec de l'eau de mer naturelle dans laquelle de la SAB a été rajoutée. Les images MEB de la figure IV.15 confirment ce qui été obtenu par microbalance à quartz.



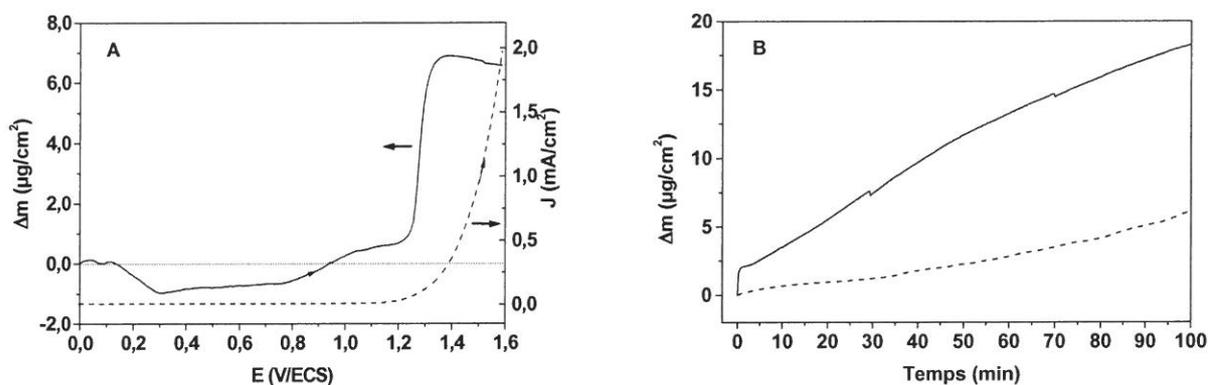
**Figure IV.15:** Observations MEB de la surface SnO<sub>2</sub> polarisée dans l'eau de mer pendant 6 h en présence de SAB à la concentration de : (A) et (B) 0,1% et (C) 0,05%.

Les spectres EDX, obtenus sur des électrodes ayant été polarisées plusieurs heures à +1,5 V/ECS (Fig.IV.16), révèlent la présence des pics des éléments chlore, brome et magnésium. Concernant le calcium, il n'est pas possible de conclure, car le pic correspondant est masqué par le signal de l'étain (3,7 keV). Par contre, comme observé en milieu artificiel, on trouve les pics du carbone et du soufre qui proviennent de la matière organique (SAB).



**Figure IV.16:** Spectres EDX : (A) eau de mer + 0,1% BSA après polarisation à +1,5 V/ECS pendant 6 heures et (B) eau de mer + 0,05% BSA après polarisation à +1,5 V/ECS pendant 6 heures.

A l'appui de ces résultats EDX, nous avons tenté de faire des expériences d'électrogravimétrie et de chronoampérométrie pour étudier l'effet des ions bromure sur l'adsorption des protéines. La figure IV.17 montre la réponse électrochimique de films SnO<sub>2</sub> sous polarisation anodique, au contact d'une solution 0,5M NaBr + 0,1% (1 mg/mL) de SAB. Comme attendu, compte tenu des potentiels redox des couples Br<sup>-</sup>/Br<sub>2</sub> (0,85 V/ECS) et Cl<sup>-</sup>/Cl<sub>2</sub> (1,1 V/ECS), l'oxydation des ions bromure a lieu à des potentiels moins positifs que pour les ions chlorure. Les données électrogravimétriques de la figure IV.17B montrent une forte adsorption des protéines en présence des ions bromure, dès un potentiel de +0,8 V/ECS, la quantité déposée s'accroissant à partir de +1,2 V/ECS.



**Figure IV.17:** Caractéristiques courant-tension,  $v=1mV/s$  et masse-tension (A) et réponse chronoélectrogravimétrique (B) d'un film SnO<sub>2</sub> dans NaBr 0,5M + 0,1% SAB. (B) film SnO<sub>2</sub> polarisé à +1,23 V/ECS (- - -) et à +1,3 V/ECS (—).

Vis-à-vis de l'interaction avec les protéines, les ions bromure et chlorure jouent un rôle symétrique via la formation des espèces HBrO et HClO, qui selon la littérature, peuvent réagir avec la SAB pour former des liaisons de type N-Cl<sup>[25-26]</sup> et N-Br<sup>[27-28]</sup>. L'oxydation des ions bromure, *via* la formation de HBrO, peut conduire à la formation de groupements bromamine dans la matière organique à la surface, comme le font les ions chlorure avec la formation de fonctions chloramine. La présence simultanée d'ions bromure et chlorure permet d'envisager la formation simultanée de fonctions chloramine et bromamine, ce qui pourrait renforcer un éventuel effet antibactérien. L'efficacité de ces dernières sera l'objet du dernier chapitre de ce mémoire. Par ailleurs, la figure IV.17 permet de confirmer que la vitesse de dépôt des protéines est fonction du courant anodique c'est-à-dire de la cinétique de formation de HBrO (ou HClO dans le cas des chlorures).

**Cette étude a permis d'une part de confirmer les phénomènes d'agrégation des protéines sur la surface de SnO<sub>2</sub> lors de la production de HClO (ou de HBrO) et d'autre part de vérifier que du chlore (ou du brome) est présent dans l'ensemble du dépôt organique.**

## IV.5. Méthodes biologiques

### IV.5.1. Dosage des protéines adsorbées

Ces études biochimiques ont été effectuées au laboratoire Biomécanique et Génie Médical à l'Université de Technologie de Compiègne (UTC). Le dosage des protéines adsorbées sur un substrat SnO<sub>2</sub> a été effectué par la méthode BioRad. Des échantillons de SnO<sub>2</sub> ont été immergés dans des solutions NaCl + 3% (30 mg/mL) en SAB, polarisés à +1,5 V/ECS, à une température de 37°C. Le temps de traitement a été fixé à 1 heure pour chaque échantillon. Ce test met clairement en évidence l'effet de la polarisation à +1,5 V par rapport à une simple immersion, ainsi que celui de la concentration en NaCl. Il est important de noter que les quantités de SAB adsorbée sous polarisation déterminées par le test BioRad (Tableau IV.3) sont en accord satisfaisant avec celles obtenues *in situ* par électrogravimétrie, à température ambiante.

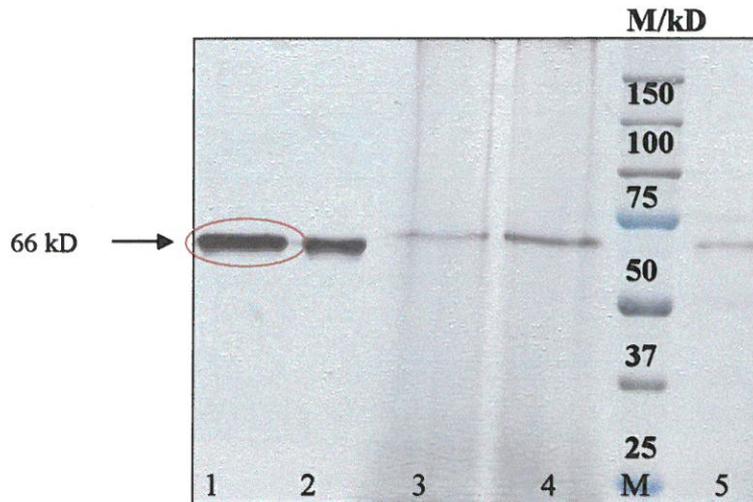
	NaCl 0,15 M	NaCl 0,5 M
Masse de SAB adsorbée ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	5,6 (4)	6,9 (8)

**Tableau IV.3 :** Dosage des protéines adsorbées sur des échantillons de SnO<sub>2</sub> polarisés pendant 1 heure dans une solution 0,5M NaCl + 3% SAB à 1,5V/ECS. (Entre parenthèses, valeurs obtenues par électrogravimétrie tirées de la figure IV.7)

### IV.5.2. Electrophorèse SDS-PAGE

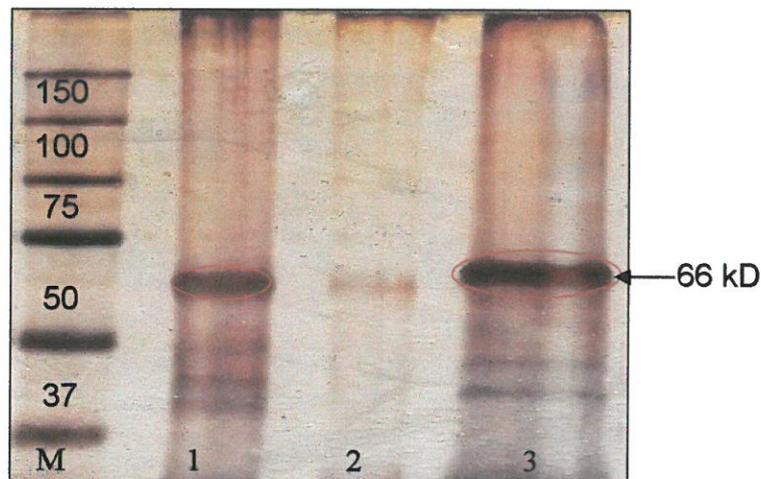
Une des méthodes les plus utilisées pour séparer les protéines est l'électrophorèse. Cette méthode donne essentiellement une information sur le poids moléculaire des protéines. C'est une technique complémentaire des techniques mises en oeuvre précédemment. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des gels de polyacrylamide (4 – 8 %) qui sont transparents, chimiquement inertes, stables sur une bonne plage de pH et de températures.

L'effet du temps de traitement est visible dans la figure IV.18, où l'intensité de la bande à 66 kD augmente avec celui-ci, lorsqu'il varie de 30 minutes à deux heures (pistes 3 et 4). Ces tests montrent qu'il n'y a pas, ou peu, de fragmentation de la SAB lors de la polarisation anodique. L'influence de la concentration en SAB n'est pas clairement caractérisée (pistes 3 et 5).



**Figure IV.18:** Analyse électrophorétique de marqueurs SAB : 0,05% (piste 1) et 0,1% (piste 2) de SAB adsorbée sur des échantillons de SnO<sub>2</sub> polarisés à  $E = +1,5$  V/ECS en présence de NaCl 0,5 M, pendant 30 min à 0,05% en SAB (piste 3), idem mais pendant 120 min (piste 4), idem mais 30 min et 0,1% en SAB (piste 5).

L'effet du temps de traitement, est également visible dans la figure IV.19. En effet, l'intensité de la bande à 66 kD augmente avec le temps de polarisation, soit respectivement 48h, 4h et 24h pour les pistes 1, 2 et 3. Les bandes correspondant à des masses plus faibles laissent supposer qu'il y a eu fragmentation des molécules SAB, toutefois le témoin n'ayant pas été analysé, il est difficile de conclure quant à la pré-existence ou non de ces masses.



**Figure IV.19:** Analyse électrophorétique de SAB adsorbée sur des échantillons de SnO<sub>2</sub> polarisés à  $E = +1,5$  V/ECS en présence de NaCl 0,5 M + 0,1% SAB, pendant 48h (piste 1), 4h (piste 2), 24h (piste 3) et M : Marqueur.

Ces expériences confirment l'augmentation de la quantité de protéine déposée sous polarisation anodique, l'effet de la concentration en NaCl et celui du temps de polarisation. Cependant, on observe une limite pour le temps. Pour les deux temps de polarisation, 24 et 48 heures, on observe à peu près la même intensité de la bande, ce qui peut traduire une certaine saturation de la surface.

## IV.5. Discussion

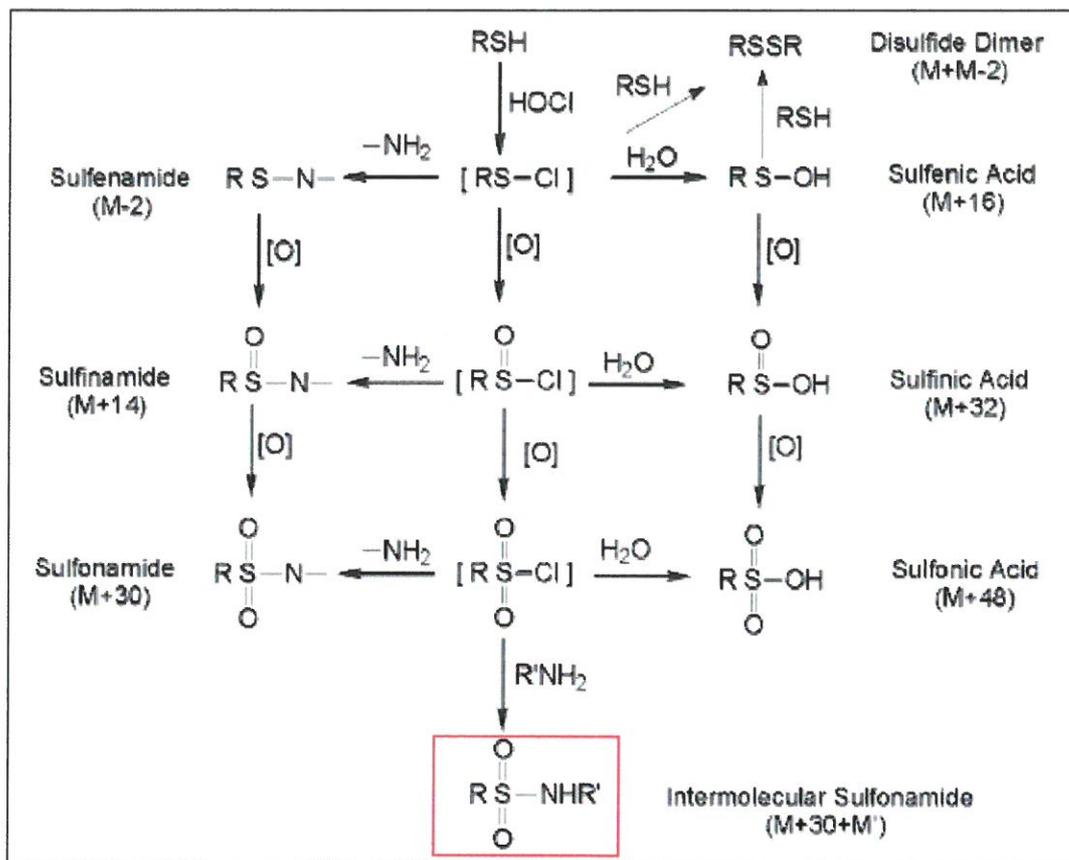
Les études électrochimiques et biochimiques que nous avons réalisées montrent clairement que la protéine albumine s'adsorbe sur le film SnO<sub>2</sub>. Cette adsorption est faible en circuit ouvert, de l'ordre d'une monocouche. Par contre, en présence d'ions chlorure, elle devient très conséquente dès qu'un courant anodique apparaît ; on observe alors un phénomène d'agrégation des protéines sur la surface.

Nos résultats montrent que la croissance de la couche organique s'effectue uniquement lorsque HClO est produit. On doit donc prendre en compte l'interaction de HClO avec les protéines. De nombreuses études biomédicales rapportées dans la littérature concernent la réaction de HClO avec les protéines. *In vivo*, HClO est produit par réaction entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les ions chlorure, cette réaction étant catalysée par la myéloperoxydase qui est produite par les neutrophiles. Ces études ont montré que HClO interagit préférentiellement avec les chaînes latérales des acides aminés soufrés (Met, Cys, cystine) et également avec les fonctions amine primaire (Lys) ou secondaire (His, Trp). Les constantes cinétiques ont été déterminées par différents auteurs, elles sont regroupées dans le tableau IV.4. Il est clair que la réactivité de HClO vis-à-vis des différents acides aminés mentionnés est dans l'ordre : Met ~ Cys > cystine ~ His > Trp > Lys.

L'oxydation des résidus Met par HClO conduit à la formation de groupement sulfoxyde<sup>[29]</sup> :



Le mécanisme d'oxydation de la Cys est plus complexe, il est résumé dans le schéma IV.1.



**Schéma IV.1 :** Mécanisme proposé par Fu et al. concernant l'oxydation de Cys par HClO et la formation de lien S-N entre deux entités (*M* : masse du peptide initial ; Pro-Phe-Lys-Cys-Gly) <sup>[30]</sup>.

Il faut noter que le caractère oxydant de HClO est conservé uniquement dans le cas de la réaction de HClO avec les fonctions amines. Dans ce cas, des liaisons -N-Cl (chloramine) sont formées par simple transfert de Cl(+) entre HClO et l'azote de l'amine :



Elles peuvent évoluer vers la formation de radicaux centrés sur un atome d'azote <sup>[31]</sup>. La présence de telles fonctions sera vérifiée dans le chapitre VI.

Il faut remarquer que la présence de chlore a été mise en évidence (par XPS et EDX) dans le cas des dépôts formés à partir de solutions pas trop concentrées en SAB (0,05 à 0,3%). Pour une concentration en SAB de 3%, aucun signal dû au chlore n'a été détecté. Ce résultat suggère que le rapport entre la concentration en SAB présente en solution et la quantité de HClO formée à l'électrode est un paramètre important qui influe sur l'incorporation de chlore dans la couche organique : une valeur élevée du rapport [HClO]/[SAB] favorise le piégeage

du chlore dans la couche. La figure IV.20, calculée par Pattison et Davies [32] pour la Sérum Albumine Humaine (SAH) qui a une composition très proche de la SAB, permet facilement d'expliquer ce résultat. En effet, si la concentration en SAB est grande, HClO va réagir uniquement avec les acides aminés sulfurés et il n'y aura pas de réaction avec les résidus His et Lys. La figure IV.20 montre par exemple que pour un rapport [HClO]/[SAH] égal à 2, seul les groupements -S- de la Met et de la Cys réagissent. Si ce rapport augmente, les résidus His et Lys réagissent alors et il peut donc y avoir formation de liaisons chloramine.

Acide aminé	Lys	Cystine	His	Met	Cys	Trp
Nombre de résidus [33]	59	17	17	4	1	2
k <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) [32]	8 10 <sup>3</sup>	1,6 10 <sup>5</sup>	1,0 10 <sup>5</sup>	3,8 10 <sup>7</sup>	3,2 10 <sup>7</sup>	1,1 10 <sup>4</sup>
k <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) [29]				8,7 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>9</sup>	

Tableau IV.4: Composition partielle de la SAB et constantes de vitesse du deuxième ordre déterminées pour les réactions entre HClO et les chaînes latérales des acides aminés.

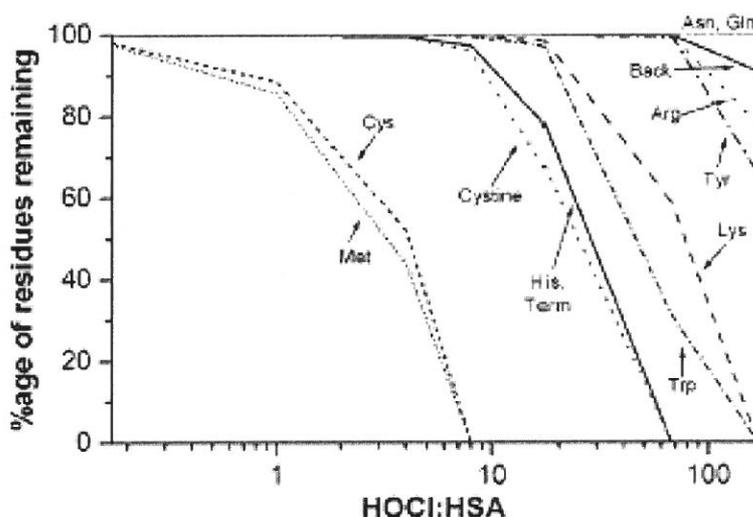


Fig. IV.20 : Pourcentage d'acides aminés constituant la SAH n'ayant pas réagi avec HClO en fonction du rapport entre HClO et SAH, en solution (d'après la réf.32).

Finalement, le phénomène d'agrégation des protéines sur la surface s'explique par la réaction entre un groupement -SO<sub>2</sub>Cl issu de l'oxydation de résidus Cys ou cystine et une fonction amine (voir schéma IV.1):



Dans le cas d'une réaction inter-moléculaire, on obtient alors un lien covalent entre deux entités protéiques. Après désorption, l'électrophorèse a détecté la présence d'entités de SAB, elle n'a pas permis de mettre en évidence des entités de masse plus élevée comme 132 kD (dimère de SAB). Cela est vraisemblablement dû à la non stabilité de la liaison SO<sub>2</sub>-NH lors de l'étape de désorption des protéines.

Enfin, concernant la stabilité des couches déposées, il faut rappeler le comportement particulier observé en présence de cations divalents (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>). En effet, la présence de ces ions en solution permet d'obtenir des films organiques plus stables en solution. Les analyses EDX ont confirmé la présence de Mg dans le dépôt.

## **IV.6. Conclusion**

Ce chapitre montre clairement qu'il existe une corrélation entre le dégagement de HClO et l'agrégation de la SAB à la surface de SnO<sub>2</sub> ainsi que sa chloration. Par ailleurs, il est important de signaler que les analyses XPS et MEB-EDX ont été effectuées sur des échantillons sortis du milieu liquide, rincés abondamment, séchés et stockés plusieurs jours. Ceci signifie que le film organique est bien adhérent et que la modification induite par HClO est stable dans le temps. Si l'on admet que la présence de chlore reflète la formation de groupements chloramine, sachant que les liaisons chloramine gardent le caractère oxydant de HClO (Cl<sup>+</sup>), on peut penser avoir recouvert la surface de SnO<sub>2</sub> par un 'film' organique ayant des propriétés antibactériennes. Le chapitre VI consistera à apprécier ce caractère antibactérien par des tests de colonisation bactérienne.

## Références du chapitre IV

- <sup>1</sup> L.J. Yan, M.G. Traber, H. Kobuchi, S. Matsugo, H.J. Tritschler, L. Packer, *J. Biochem. Biophys.* **327** (1996) 330.
- <sup>2</sup> A.C. Carr, C.L. Hawkins, S.R. Thomas, R. Stocker, B. Frei, *Free Radical Biology & Medicine* **30** (2001) 526.
- <sup>3</sup> P.A. Kulcharky, J.W. Heinecke. *J. Biochem.* **40** (2001) 3648.
- <sup>4</sup> C. Poleunis, C. Rubio, C. Compère, P. Bertrand, *Appl. Surf. Sci.* **203-204** (2003) 693.
- <sup>5</sup> Z.G. Peng, K. Hidajat, M.S. Uddin, *J. Colloid Interface Sci.* **271** (2004) 277.
- <sup>6</sup> S. Ashoka, J. Seetharamappa, P.B. Kandagal, S.M.T. Shaikh, *Journal of Luminescence* **121** (2006) 179.
- <sup>7</sup> C. Rubio, « Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. », Thèse de l'université Paris 6, juillet 2002.
- <sup>8</sup> S. Oscarsson, *J. of Chromatography B*, **699** (1997) 117.
- <sup>9</sup> O. Mori, T. Imae, *Colloids and Surfaces* **9** (1997) 31.
- <sup>10</sup> S. Salgin, S. Takaç, T.H. Özdamar, *Journal of Membrane Science* **278** (2006) 251.
- <sup>11</sup> I. Frateur, L. Lartundo-Rojas, C. Méthivier, A. Galtayries, P. Marcus, *Electrochim. Acta* **51** (2006) 1550.
- <sup>12</sup> C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Biochem. J.* **332** (1998) 617.
- <sup>13</sup> C.L. Hawkins, M.D. Rees, M.J. Davies, *FEBS Lett.* **510** (2002) 41.
- <sup>14</sup> A.V. Peskin, R.G. Midwinter, D.T. Harwood, C.C. Winterbourn, *Free Radical Biology* **37** (2004) 1662.
- <sup>15</sup> A.V. Peskin, C.C. Winterbourn, *Free Radical Biology* **35** (2003) 1252.
- <sup>16</sup> Y.Mao, W. Wei, J. Zhang, H. Peng, L. Wu, *Microchemical. J.* **70** (2001) 133.
- <sup>17</sup> C. Poleunis, C. Rubio, C. Compère, P. Bertrand, *Surf. Interface Anal.* **34** (2002) 55.
- <sup>18</sup> M.A. Bos, Z. Shervani, A.C.I. Anusiem, M. Giesbers, W. Norde, J.M. Kleijn, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **3** (1994) 91.
- <sup>19</sup> A.N. Asanov, L.J. DeLucas, P.B. Oldham, W.W. Wilson, *J. Colloid Interface Sci.* **191** (1997) 222.
- <sup>20</sup> H. Cachet, F. Zenia, M. Froment, *J. Electrochem. Soc.* **146** (1999) 977.
- <sup>21</sup> H. Cachet, M. Froment, F. Zenia, *J. Electrochem. Soc.* **143** (1996) 442.

- <sup>22</sup> Y. Zhang, Y. Fung, H. Sun, D. Zhu, S. Yao, *Sensors and Actuators B* **108** (2005) 933.
- <sup>23</sup> Z.G. Peng, K. Hidajat, M.S. Uddin, *J. Colloid Interface Sci.* **271** (2004) 277.
- <sup>24</sup> C.M. Pradier, F. Karman, J. Telegdi, E. Kalman, P. Marcus, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 6766.
- <sup>25</sup> A.V. Peskin, C.C. Winterbourn, *Free Radical Biology and Medicine* **40** (2006) 45.
- <sup>26</sup> C.L. Hawkins, M.J. Davies. *Chem. Res. Toxicol.* **18** (2005) 1600.
- <sup>27</sup> A.C. Carr, J.J.M. van den Berg, C.C. Winterbourn, *Biochim. Biophys. Acta* **1392** (1998) 254.
- <sup>28</sup> W. Wu, Y. Chen, A. d'Avignon, S.L. Hazen. *Biochemistry* **38** (1999) 3538.
- <sup>29</sup> X.L. Armesto, M.L. Canle, M.I. Fernandez, M.V. Garcia, J.A. Santaballa, *Tetrahedron* **56** (2000) 1103
- <sup>30</sup> X. Fu, D.M. Mueller, J.W. Heinecke, *Biochem.* **41** (2002) 1293.
- <sup>31</sup> C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Biochem. J.* **340** (1999) 539.
- <sup>32</sup> D.I. Pattison, M.J. Davies, *Chem. Res. Toxicol.* **14** (2001) 1453.
- <sup>33</sup> K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K.I. Fukuhara, *Biochem. Biophys. Research Comm.* **173** (1990) 639.

## **CHAPITRE V**

# **ETUDE DES INTERACTIONS SAB/SnO<sub>2</sub> PAR MESURE DE LA CAPACITE INTERFACIALE**

## Chapitre V : Etude des interactions SAB/SnO<sub>2</sub> par mesure de la capacité interfaciale

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, les molécules de SAB s'adsorbent spontanément à la surface de SnO<sub>2</sub> au potentiel d'abandon. Dans ces conditions, la quantité adsorbée est de l'ordre de la monocouche. A des pH voisins de la neutralité, les molécules de SAB sont chargées négativement. En regard, compte tenu des valeurs prises par le potentiel d'abandon, l'électrode SnO<sub>2</sub> est en régime d'appauvrissement, c'est-à-dire dans un régime où l'interface SnO<sub>2</sub>/électrolyte est bloquante. A l'absence d'électrons de conduction en surface, il correspond une charge d'espace positive, dont l'extension spatiale est de l'ordre du nanomètre pour les films SnO<sub>2</sub> fortement dopés considérés dans ce travail. Cette charge d'espace positive constitue donc un facteur favorable à l'adsorption de la SAB par simple considération électrostatique. Toutefois, en présence de HClO, nous avons montré qu'il était possible d'accrocher à la surface de l'oxyde d'étain des quantités très importantes de SAB, équivalentes à plusieurs dizaines de monocouches. Ceci laisse supposer que les molécules de SAB directement au contact de la surface de l'oxyde sont fortement liées à celui-ci, plus fortement que par simple attraction coulombienne. Pour apporter des éléments de réponse à cette question, nous présentons ici une étude systématique de la capacité interfaciale lorsque l'interface SnO<sub>2</sub>/électrolyte est bloquante, en fonction du potentiel, de la présence ou non de SAB, de l'état d'hydroxylation de la surface, en fonction également de la nature de l'élément dopant (F ou Sb). Le principal résultat de cette étude est la mise en évidence d'états électroniques de surface dans la bande interdite de SnO<sub>2</sub>, caractéristiques de liaisons chimiques formées entre la SAB et l'oxyde d'étain.

### V.1. Procédure expérimentale

Dans le cas d'une jonction semiconducteur/électrolyte, la capacité interfaciale globale comprend au moins deux contributions capacitatives bien identifiées, celle relative à la charge d'espace dans le semiconducteur notée  $C_{sc}$ , celle relative à la charge d'espace dans l'électrolyte, notée  $C_H$ . La situation se complique en présence d'états de surface dans la bande interdite du semiconducteur. Si ces états sont en équilibre avec le semiconducteur, leur remplissage suit une statistique de Fermi. Lorsque l'on fait varier le potentiel appliqué à la jonction, le niveau de Fermi du semiconducteur balaye la bande interdite et définit la séparation entre les états pleins et les états vides. Si le potentiel appliqué est modulé, un état de surface donnera lieu à une réponse

capacitive  $C_{ss}$  lorsque le niveau de Fermi du semiconducteur sera aligné avec le niveau de l'état. Pour un état de densité  $N_{ss}$  (cm<sup>-2</sup>) situé à une énergie  $\Delta E_{ss}$  (eV) sous la bande de conduction, la capacité  $C_{ss}$  s'écrit classiquement [1-2-3]:

$$C_{ss} = e^2 N_{ss} f_{ss} (1 - f_{ss}) / kT \quad \text{Eq. V.1}$$

où  $f_{ss}$  est le facteur de remplissage de l'état suivant la statistique de Fermi :

$$f_{ss} = [1 + \exp(\Delta E_{ss} / kT)]^{-1} \quad \text{Eq. V.2}$$

La réponse d'un état monoénergétique sera donc un pic de capacité observable à un potentiel correspondant à une courbure de bande égale à  $\Delta E_{ss}/e$ . L'expression de  $C_{ss}$  peut se généraliser à une distribution d'états, ce qui sera notre cas dans la suite (voir relation V.7). Il est communément admis que les états de surface « voient » la même différence de potentiel que la charge d'espace du semiconducteur. La conséquence est que la capacité interfaciale globale  $C$  est la combinaison en série de la capacité de double couche  $C_H$  avec la somme ( $C_{sc}+C_{ss}$ ) des réponses capacitives des états et de la charge d'espace, soit :

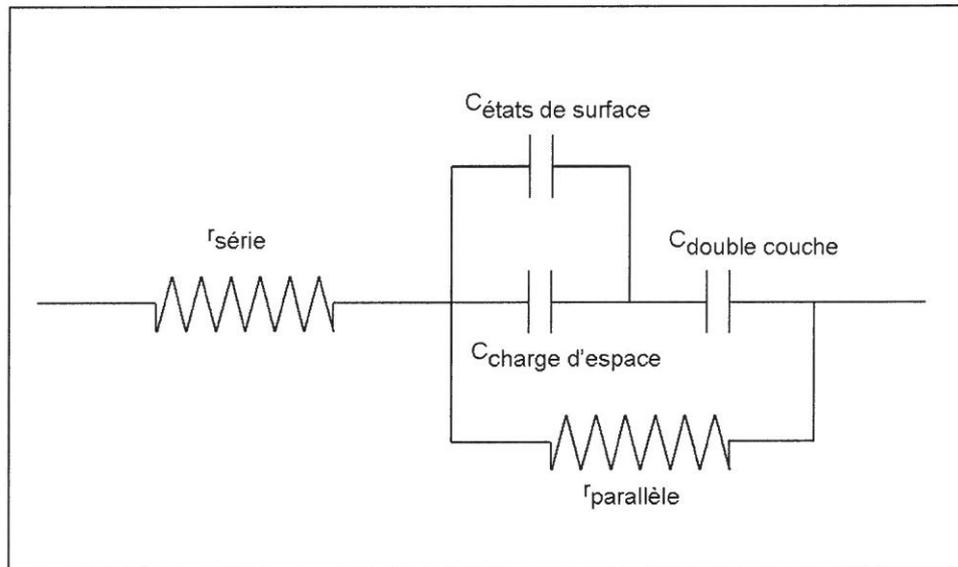
$$1/C = 1/C_H + 1/(C_{sc}+C_{ss}) \quad \text{Eq. V.3}$$

On voit ainsi qu'à partir de la connaissance de  $C$  à différents potentiels, on peut espérer obtenir des informations sur  $C_{ss}$  en fonction du potentiel, et donc sur la présence éventuelle d'états de surface attribuables à des liaisons chimiques à la surface du semiconducteur. C'est cette stratégie que nous avons mise en œuvre pour caractériser l'adsorption des molécules de SAB sur la surface d'un film de dioxyde d'étain.

### V.1.1. Analyse des données d'impédance

Pour chacun des différents systèmes étudiés, on a relevé systématiquement les diagrammes d'impédance entre 0,1 Hz et 33 kHz en mode potentiostatique, tous les 50 mV, entre 0 et +1,2 V/ECS. Ces diagrammes sont caractéristiques d'une interface bloquante, c'est-à-dire qu'ils présentent une branche capacitive quasi verticale. On constate la présence d'une légère déformation vers les hautes fréquences qui correspond à la contribution d'un circuit résistance-

capacité en parallèle ( $R_c, C_c$ ) : il s'agit de la réponse de la portion de film d'oxyde non immergée à travers laquelle on établit le contact électrique entre le circuit extérieur et l'électrode de travail proprement dite. Les spectres expérimentaux sont correctement décrits à une précision relative de 1 à quelques %, par le circuit électrique équivalent constitué d'une résistance  $R_s$  en série avec deux cellules résistance-capacité en parallèle ( $R_c, C_c$ ) et ( $R_p, C$ ). Le circuit ( $R_p, C$ ) correspond à la réponse de l'interface oxyde/électrolyte. Le schéma électrique équivalent est illustré dans la figure V.1.



**Figure V.1:** Schéma équivalent

Suivant le formalisme de B. Boukamp <sup>[4]</sup> utilisé dans le programme d'ajustement non linéaire des paramètres du modèle électrique (ZSimpWin™, Princeton Applied Research), le code du circuit équivalent s'écrit :  $R_s(R_c C_c)(R_p C)$ . Le nombre de paramètres indépendants à rechercher est dans ces conditions de 5. Pour certains spectres, il s'est avéré nécessaire de remplacer la capacité  $C$  par un élément à phase constante  $Q$ . Si cela améliore la qualité de représentation des données expérimentales, on est confronté au fait que, par définition, l'élément  $Q$  dépend de la fréquence. Comme, pour les exemples que nous avons traités, le coefficient de non idéalité  $n$  était supérieur à 0,9, nous avons admis de substituer à  $Q$  une capacité indépendante de la fréquence  $C$  qui se déduit de  $Q$  par l'expression :

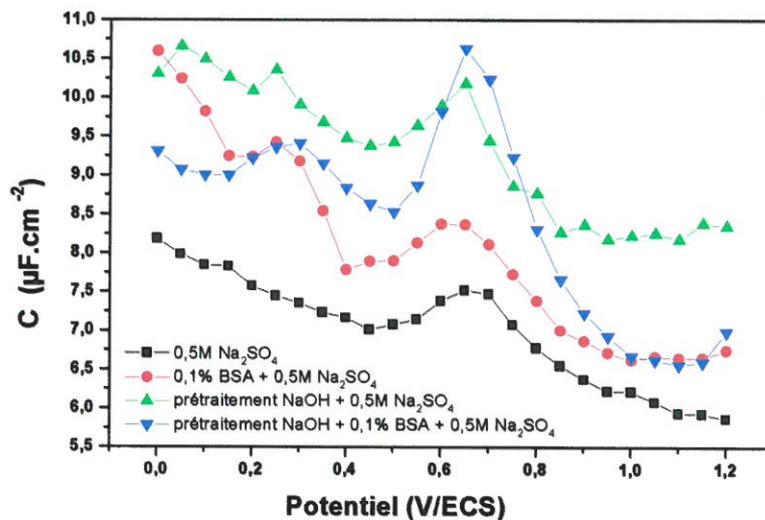
$$C = (R_p Q)^{1/n} / R_p \quad \text{Eq. V.4}$$

dans l'hypothèse où le circuit R<sub>p</sub>-C de substitution a la même résistance R<sub>p</sub> en parallèle et possède la même fréquence de relaxation que le circuit R<sub>p</sub>-Q. Cette approximation est d'autant plus acceptable que le coefficient de non idéalité n est proche de 1.

### V.1.2. Courbes capacité interfaciale – potentiel

L'analyse des spectres d'impédance relevés à différents potentiels permet, suivant le protocole exposé ci-dessus, de tracer les variations de la capacité interfaciale C(V) en fonction du potentiel appliqué V. Pour un type de substrat donné (SnO<sub>2</sub>:F ou SnO<sub>2</sub>:F/Sb), nous disposons d'un ensemble de courbes C(V) correspondant à différentes conditions expérimentales, particulièrement en l'absence ou en présence de SAB, comme illustré dans la figure V.2 sur des électrodes SnO<sub>2</sub>:F. Ces résultats seront discutés plus loin.

Pour que les comparaisons des valeurs de capacité aient un sens, il faut prendre en compte les surfaces réelles des électrodes, car du fait de leur dopage élevé les effets de charge d'espace s'étendent sur environ 1 nm. Les valeurs de capacité sont donc sensibles à la rugosité, rugosité qui peut changer de quelques 10-20 pourcents d'un échantillon à l'autre.



**Figure V.2:** Exemple de courbes C(V) déduites des spectres d'impédance pour des électrodes SnO<sub>2</sub>:F au contact d'une solution 0,5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (■), idem mais après adsorption de SAB 0,1% en circuit ouvert (●), idem au premier cas mais après prétraitement d'hydroxylation dans NaOH 1M (▲), idem au second cas mais après prétraitement d'hydroxylation (▼)

Dans la suite, les surfaces des différentes électrodes de même dopant sont normalisées par rapport à la surface de l'électrode testée en milieu inerte 0,5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cette normalisation est effectuée dans la région de potentiel autour de 1 V/ECS dans laquelle la capacité varie peu. A

titre indicatif, le rapport surface réelle/surface géométrique est pour nos échantillons de l'ordre de 1,4, estimation déduite de la pente des diagrammes de Mott-Schottky (Eq. II.3) connaissant la densité de porteurs dans le film SnO<sub>2</sub> « par construction » (SnO<sub>2</sub> :F N= 4,5 10<sup>20</sup> cm<sup>-3</sup> ; SnO<sub>2</sub> :F/Sb N= 1,5 10<sup>21</sup> cm<sup>-3</sup>).

L'étape suivante dans l'exploitation des courbes C(V) consiste à éliminer la contribution de la capacité de double couche dans l'électrolyte C<sub>H</sub> afin d'atteindre la combinaison (C<sub>sc</sub>+ C<sub>ss</sub>) des capacités de charge d'espace C<sub>sc</sub> et d'états de surface C<sub>ss</sub> (Eq. V.3). La difficulté est que C<sub>H</sub> n'est pas connu expérimentalement, de manière indépendante. On est donc obligé de faire une hypothèse sur C<sub>H</sub>, dont on vérifie la cohérence sachant que pour

$V = V_0 + \varepsilon\varepsilon_0 eNS^2/2C_H^2$ , on doit avoir :  $1/C^2 = 1/C_H^2$  avec V<sub>0</sub> défini par C<sup>-2</sup>(V<sub>0</sub>)=0.

Pour nos systèmes, une telle cohérence est obtenue en posant : C<sub>H</sub> = 20 μF.cm<sup>-2</sup>. Ayant une valeur numérique pour C<sub>H</sub>, on peut calculer la somme (C<sub>sc</sub>+C<sub>ss</sub>) en inversant la relation V-3, c'est-à-dire :

$$C_{sc} + C_{ss} = C.(1-C/C_H) \quad \text{Eq. V.5}$$

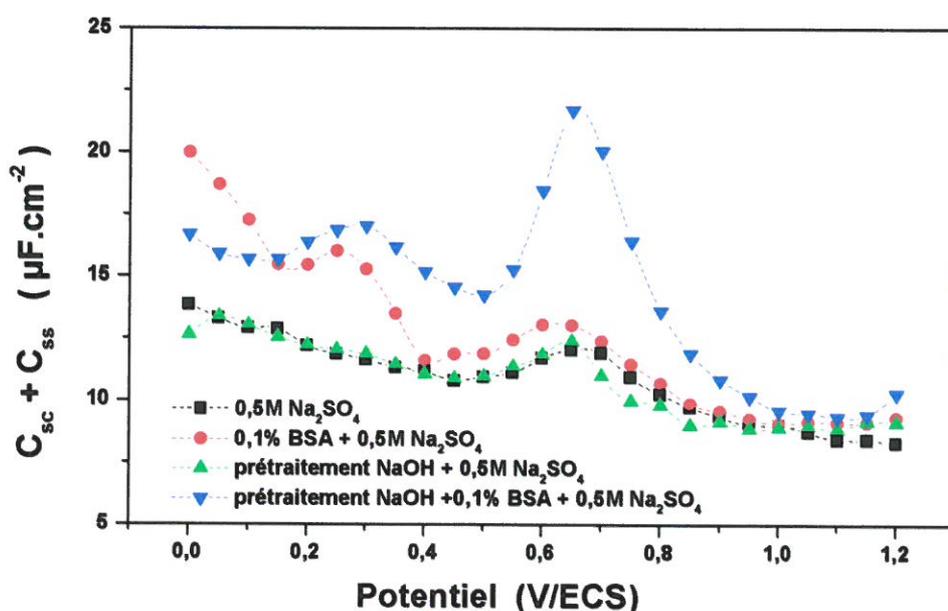


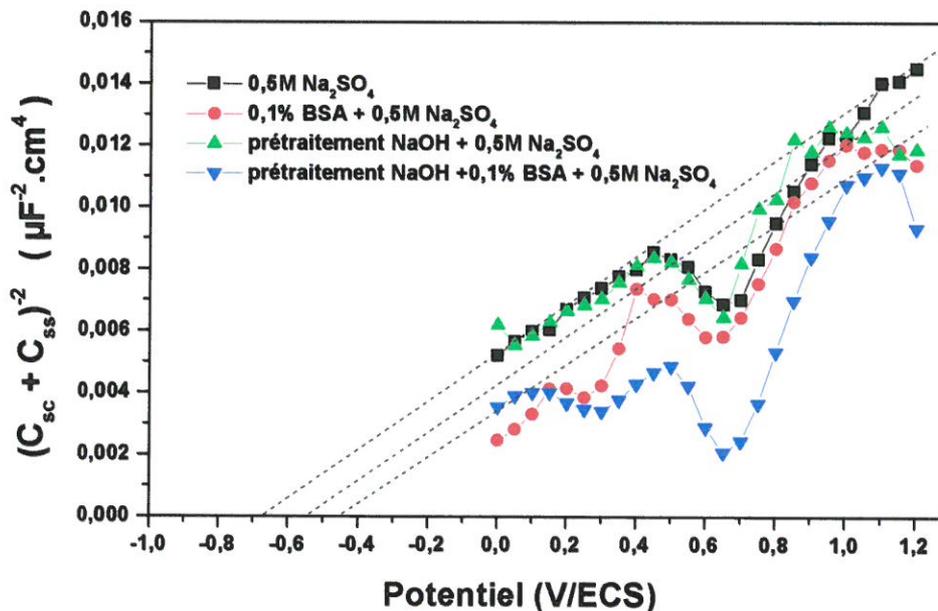
Figure V.3 : Exemple de courbes ( $C_{sc}+C_{ss}$ ) extraites des courbes C(V) données dans la figure V-1 en fixant C<sub>H</sub>=20 μFcm<sup>-2</sup> pour des électrodes SnO<sub>2</sub> :F, après normalisation des surfaces.

La figure V.3 donne un exemple de courbes (C<sub>ss</sub>+C<sub>sc</sub>) calculées selon la relation Eq.V.5 à partir des courbes brutes C(V) de la figure V.1 après avoir fixé C<sub>H</sub> à 20 μFcm<sup>-2</sup> et avoir normalisé les surfaces des différents échantillons par rapport à l'échantillon testé en milieu 0,5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en l'absence de SAB. Les courbes C<sub>ss</sub>+C<sub>sc</sub> présentent des pics en fonction du potentiel, qui sont la

signature d'états de surface car les variations de la capacité de charge d'espace  $C_{sc}$  avec le potentiel sont *a priori* monotones (en  $V^{-1/2}$  dans le cas idéal où il n'y a pas de distribution de potentiel à l'interface). Le problème est alors de séparer  $C_{ss}$  de  $C_{sc}$  pour atteindre les propriétés des états de surface.

### V.1.3. Extraction de la capacité $C_{ss}$ liée aux états de surface

En l'absence d'une démarche rigoureuse dans le cas où il y a distribution du potentiel à l'interface, nous avons établi une démarche semi-empirique pour extraire  $C_{ss}$  de la combinaison  $C_{ss}+C_{sc}$ . Pour ce faire, nous avons tracé  $(C_{ss}+C_{sc})^{-2}$  dans la représentation de Mott-Schottky, c'est-à-dire  $(C_{sc}+C_{ss})^{-2}$  en fonction du potentiel appliqué  $V$  (Fig. V.4).



**Figure V.4 :** Allure des courbes  $(C_{sc}+C_{ss})^{-2}$  en fonction du potentiel appliqué  $V$  calculées à partir des données de la figure V-2 (Electrodes SnO<sub>2</sub> :F et surfaces normalisées). Les droites en tireté représentent l'approximation linéaire utilisée pour représenter la contribution de  $C_{sc}(V)$ .

En dehors des pics de capacité,  $(C_{ss}+C_{sc})^{-2}$  suit plus ou moins nettement une loi linéaire en fonction de  $V$ . Nous admettons alors que  $C_{sc}^{-2}$  suit cette loi linéaire en fonction du potentiel appliqué  $V$ , ce qui permet de calculer  $C_{sc}(V)$  et donc de le retrancher de  $(C_{ss}+C_{sc})$ . La figure V.45 donne en final les variations de  $C_{ss}$  avec le potentiel appliqué  $V$ , pour les données initiales de la figure V.2. A noter que les différentes étapes de traitement des données de capacité nous ont permis d'obtenir une représentation des variations de la capacité des états de surface  $C_{ss}(V)$  par rapport à une ligne de base horizontale, de valeur zéro.

Il faut rappeler que les états de surface ne voient qu'une fraction  $V_{sc}$  de la différence de potentiel  $(V - V_{bp})$  appliquée à l'interface.  $V_{sc}$  est définie par le diviseur capacitif formé de  $C_H$  en série avec  $(C_{ss} + C_{sc})$ , ce qui conduit à :

$$V_{sc}(V) = (V - V_{bp}) C_H / (C_H + C_{ss} + C_{sc}) \quad \text{Eq. V.6}$$

En final, ce sont donc les courbes  $C_{ss}(V_{sc})$ , et non  $C_{ss}(V)$ , qui pourront être comparées à des modèles de distribution d'états de surface situés dans la bande interdite de SnO<sub>2</sub>.

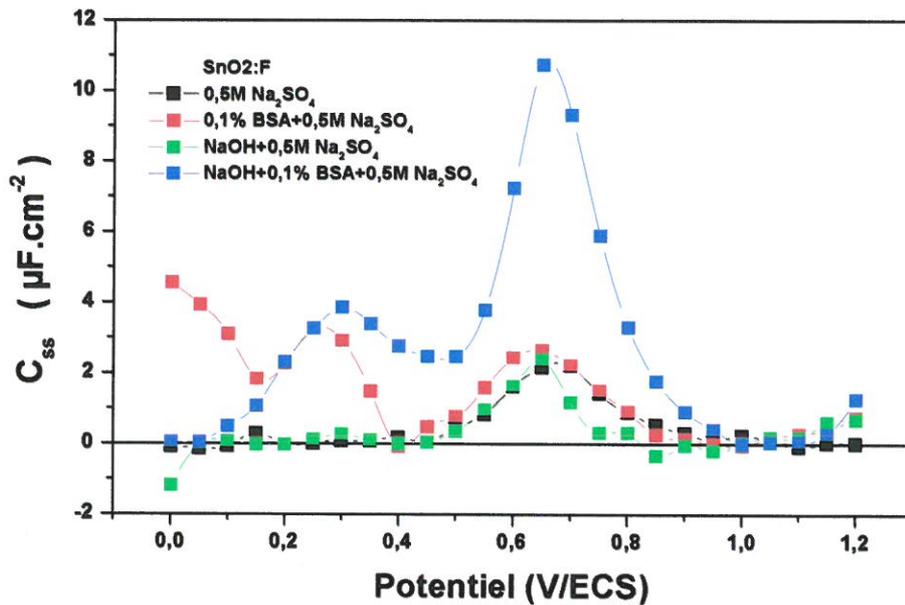


Figure V.5: Variations de la capacité des états de surface  $C_{ss}(V)$  en fonction du potentiel appliqué  $V$ , déduites de la capacité interfaciale  $C$  mesurée, après retrait des contributions des capacités  $C_H$  et  $C_{sc}$ .

#### V.1.4. Modélisation de $C_{ss}$ par une distribution d'états

Pour l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, il s'est avéré suffisant de considérer l'existence de 1 à 2 états de surface de distribution constante (distribution rectangulaire). Chaque état  $i$  est caractérisé par trois paramètres : une énergie seuil  $E_{ssi}$  (en eV par rapport au bas de la bande de conduction  $E_c$ ), une largeur de la distribution  $dE_{ssi}$  (en eV) et la valeur de la densité d'états  $N_{ssi}$  (en  $eV^{-1}cm^{-2}$ ). A partir des relations Eq.V.1 et Eq.V.2, on peut calculer la capacité  $C_{ss}$  pour un ensemble d'états de densité constante suivant l'expression :

$$C_{ss}(E) = \frac{e^2}{kT} \sum_i N_{ss_i} \sum_k \frac{f_{ss}(Ess_i + k.dE - E)}{1 - f_{ss}(Ess_i + k.dE - E)} dE \quad \text{Eq. V.7}$$

où dE est un pas en énergie, par exemple 0,01 eV. La sommation sur l'indice k porte sur la largeur dE<sub>ssi</sub> de l'état i considéré. Les données expérimentales C<sub>ss</sub>(V<sub>sc</sub>) ont été simulées à l'aide de cette expression en considérant de 1 à 3 états, les calculs étant effectués à l'aide du logiciel Mathcad™ (de Mathsoft). Pour mémoire, V<sub>sc</sub> = (E<sub>c</sub> - E)/e, E<sub>c</sub> étant le niveau en énergie correspondant à V<sub>bp</sub> dans l'échelle des potentiels.

Pour chaque état i, on peut calculer un nombre de sites N<sub>si</sub> que l'on définit simplement par le produit de la densité d'états N<sub>ssi</sub> par la largeur de la distribution dE<sub>ssi</sub>, soit :

$$N_{si} = N_{ssi} \cdot dE_{ssi} \quad \text{Eq. V.8}$$

N<sub>si</sub> peut s'interpréter comme un nombre de liaisons chimiques à la surface, d'un type donné.

## V.2. Résultats expérimentaux

### V.2.1. Systèmes étudiés et courbes C<sub>ss</sub>(V)

A l'aide de la procédure décrite ci-avant, nous avons étudié la distribution des états de surface sur des électrodes SnO<sub>2</sub>:F et SnO<sub>2</sub>:F/Sb (i) simplement immergées au contact d'électrolytes comme 0,5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou 0,5M NaCl ou en eau de mer naturelle, en l'absence ou en présence de SAB, (ii) ayant subi un prétraitement d'hydroxylation de la surface par voie électrochimique (polarisation à +0,4 V/ECS pendant 1 heure dans 1M NaOH), suivi ou non par l'adsorption de SAB au potentiel de circuit ouvert et test dans 0,5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Comme expliqué précédemment, les spectres d'impédance ont été relevés dans des conditions potentiostatiques tous les 50 mV entre 0 et 1,2 V/ECS. Ces différentes conditions expérimentales sont rappelées dans le tableau V-1 donné dans la section V.2.2 qui regroupe les informations obtenues sur les états de surface.

L'ensemble des résultats expérimentaux présentés sous la forme des courbes C<sub>ss</sub>(V) est illustré dans les figures V.5 et V.6 pour les électrodes SnO<sub>2</sub>:F et la figure V.7 pour les électrodes SnO<sub>2</sub>:F/Sb.

### V.2.2. Caractérisation des états de surface

Les courbes C<sub>ss</sub>(V), après transformation en C<sub>ss</sub>(V<sub>sc</sub>) (suivant la relation **Eq. V.6**), ont été simulées à l'aide du modèle d'états de surface décrit par l'expression **Eq. V.7**. Suivant les cas, 1 ou 2 états ont été pris en compte et les paramètres associés déterminés par approximations

successives, jusqu'à obtenir une représentation graphique qualitativement satisfaisante. Cette simulation permet d'accéder aux paramètres caractéristiques de ou des états : la position dans la bande interdite  $E_{ssi}$ , la largeur de la distribution  $dE_{ssi}$  et la densité d'états  $N_{ssi}$ . Les résultats de nos simulations sont consignés dans le tableau V.1 ci-après.

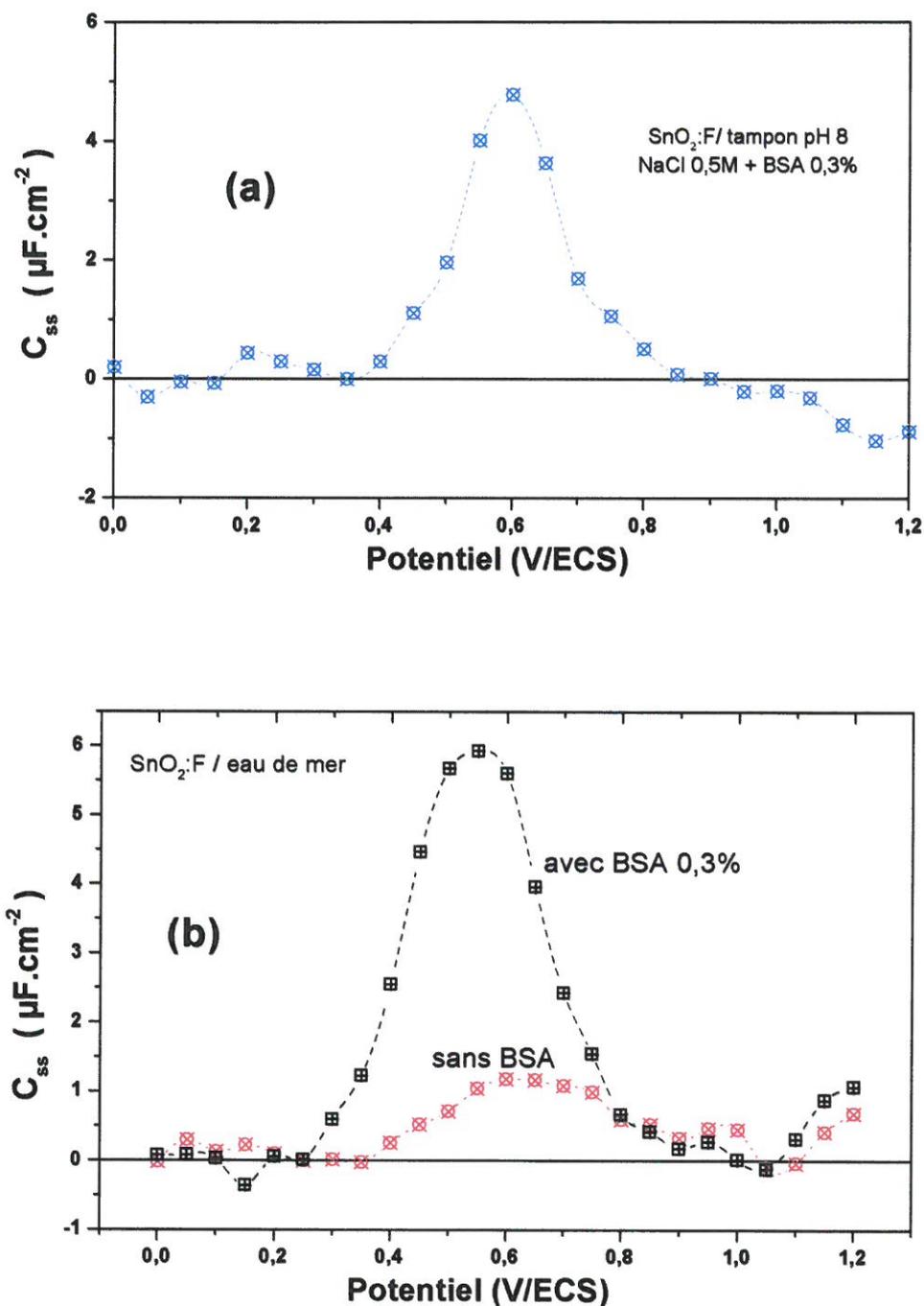
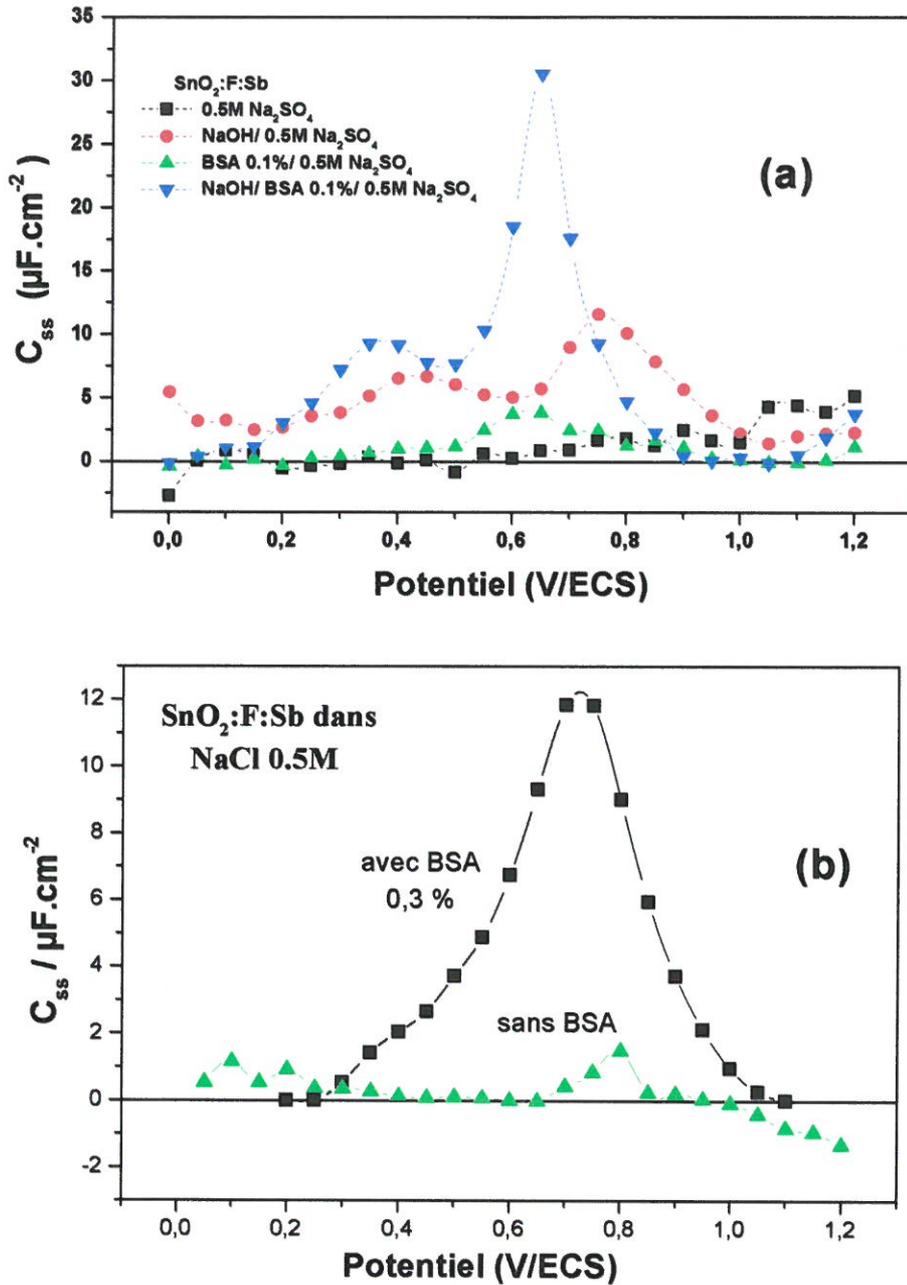


Figure V.6 : Capacité des états de surface en fonction du potentiel appliqué ( $C_{ss}(V)$ ) pour des électrodes SnO<sub>2</sub>:F au contact : (a) d'une solution NaCl 0,5M tamponnée à pH=8 ; (b) d'eau de mer naturelle en absence et en présence de SAB à la concentration de 0,3%.

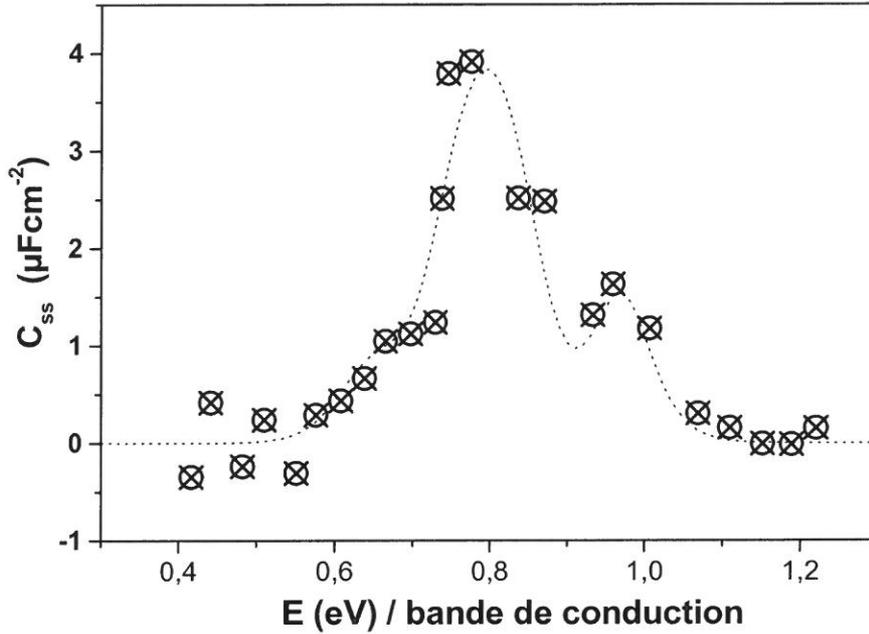


**Figure V.7:** Capacité des états de surface en fonction du potentiel appliqué ( $C_{ss}(V)$ ) pour des électrodes  $\text{SnO}_2:\text{F}:\text{Sb}$  au contact : (a) d'une solution 0,5M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (■), idem mais après adsorption de SAB 0,1% en circuit ouvert (●), idem au premier cas mais après prétraitement d'hydroxylation dans NaOH 1M (▲), idem au second cas mais après prétraitement d'hydroxylation (▼) ; (b) d'une solution 0,5M NaCl en l'absence de SAB (▲) et en présence de SAB à 0,3% (■).

SnO <sub>2</sub>	Conditions	Electrolyte	V <sub>o</sub> V/ecs	V <sub>bp</sub> V/ecs	N <sub>ss</sub> · eV <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	E <sub>ss</sub> eV	dE <sub>ss</sub> eV	N <sub>s</sub> cm <sup>-2</sup>
F	0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-1,30	-1,22	1,9 10 <sup>13</sup>	1,15	0,12	2,3 10 <sup>12</sup>
F	Hydroxylation 0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-1,30	-1,22	3,7 10 <sup>13</sup> 3,0 10 <sup>12</sup>	1,07 0,84	0,05 0,04	1,9 10 <sup>12</sup> 1,2 10 <sup>11</sup>
F	SAB 0,1% à V <sub>co</sub> 0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-1,16	-1,08	2,6 10 <sup>13</sup> 3,0 10 <sup>13</sup>	1,10 0,80	0,10 0,09	2,6 10 <sup>12</sup> 2,7 10 <sup>12</sup>
F	Hydroxylation SAB 0,1% à V <sub>co</sub> 0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-1,10	-1,02	7,5 10 <sup>13</sup> 3,3 10 <sup>13</sup>	0,90 0,71	0,20 0,10	1,5 10 <sup>13</sup> 3,3 10 <sup>12</sup>
F	0 → 1,2V	Eau de mer	-1,20	-1,12	8,0 10 <sup>12</sup> 4,0 10 <sup>12</sup>	0,98 1,29	0,21 0,12	1,7 10 <sup>12</sup> 0,5 10 <sup>12</sup>
F	Après 1 run 0 → 1,2V puis 1 nuit dans eau de mer + SAB et 0 → 1,2V	Eau de mer + SAB 0,3%	-1,10	-1,02	4,1 10 <sup>13</sup>	0,72	0,17	0,7 10 <sup>13</sup>
F	0 → 1,5V	NaCl 0,5M tampon pH8 + SAB 0,3%	-1,20	-1,12	3,2 10 <sup>13</sup>	1,12	0,14	4,5 10 <sup>12</sup>
F :Sb	0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-1,08	-0,88	2,1 10 <sup>13</sup>	0,85	0,14	2,9 10 <sup>12</sup>
F/Sb	0 → 1,2V	NaCl 0,5M	-1,18	-0,98	2,6 10 <sup>13</sup>	1,08	0,04	1,0 10 <sup>12</sup>
F :Sb	0 → 1,2V	NaCl 0,5M +SAB 0,3%	-0,94	-0,74	7,7 10 <sup>13</sup>	0,61	0,16	1,2 10 <sup>13</sup>
F :Sb	Hydroxylation 0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-0,97	-0,77	8,2 10 <sup>13</sup> 6,0 10 <sup>13</sup>	0,62 0,48	0,17 0,09	1,4 10 <sup>13</sup> 5,4 10 <sup>12</sup>
F :Sb	SAB 0,1% à V <sub>co</sub> 0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-1,08	-0,88	8,0 10 <sup>12</sup> 2,8 10 <sup>13</sup> 8,0 10 <sup>12</sup>	0,86 0,74 0,62	0,10 0,12 0,07	8,0 10 <sup>11</sup> 3,4 10 <sup>12</sup> 5,6 10 <sup>11</sup>
F :Sb	Hydroxylation SAB 0,1% à V <sub>co</sub> 0 → 1,2V	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M	-0,97	-0,77	4,0 10 <sup>14</sup> 1,5 10 <sup>14</sup>	0,54 0,40	0,08 0,04	3,2 10 <sup>13</sup> 6,0 10 <sup>12</sup>

**Tableau V.1 :** Simulation de la réponse des états de surface à l'interface SnO<sub>2</sub>/électrolyte à partir des courbes C<sub>ss</sub>(V) en considérant 1 à 3 états de densité constante. V<sub>co</sub> signifie potentiel en circuit ouvert.

La figure V.8 donne un exemple de simulation d'une courbe  $C_{ss}(V_{sc})$  suivant le modèle simplifié d'états de surface à densité constante que nous avons retenu (relation Eq. V.7). Pour l'exemple choisi, trois états doivent être introduits pour rendre compte du profil observé.



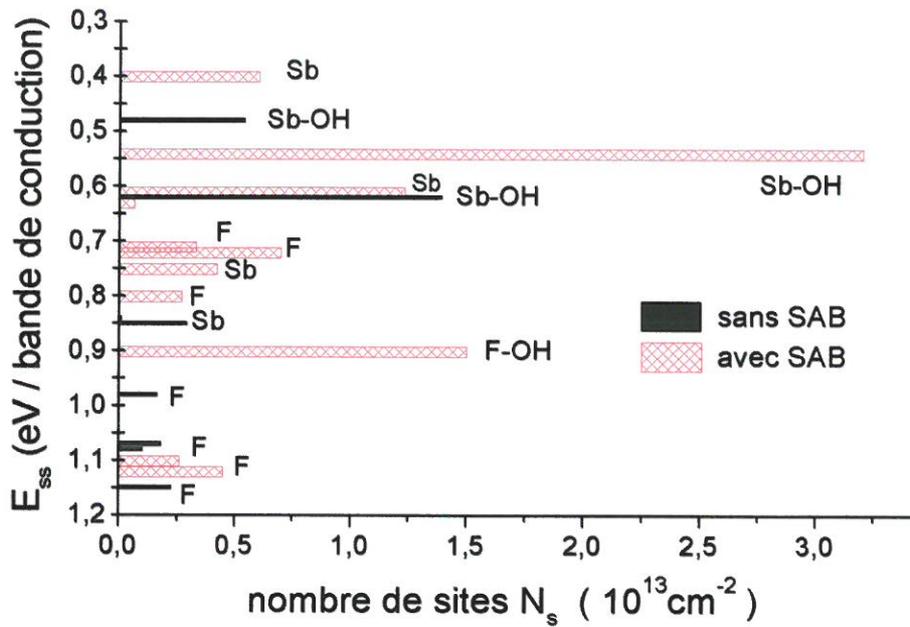
**Figure V.8:** Simulation de la capacité  $C_{ss}$  associée à des états de surface par un modèle de trois états discrets de densité constante relative au système SnO<sub>2</sub>:F/Sb dans Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M après adsorption préalable de SAB en circuit ouvert.

### V.2.3. Discussion

Tous les résultats consignés dans le tableau V.1 sont schématiquement reportés dans la figure V.8. Cette figure représente le nombre de sites  $N_s$  par états en fonction de la position de l'état dans la bande interdite définie par rapport au bas de la bande de conduction de SnO<sub>2</sub>. En première approximation, les régions où existent les états d'interface sont relativement étroites et, en partie, dépendantes de l'élément dopant, comme le montre le tableau V.2.

Type SnO <sub>2</sub>	SnO <sub>2</sub> :F/Sb	SnO <sub>2</sub> :F
Positions des états (eV)	0,4 – 0,6	0,7 – 0,8
	0,7 – 0,8	0,9 – 1,1

**Tableau V.2 :** Positions des états d'interface pour les deux types d'électrodes utilisées, SnO<sub>2</sub>:F et SnO<sub>2</sub>:F/Sb, toutes conditions expérimentales confondues, suivant les résultats du tableau V.1.

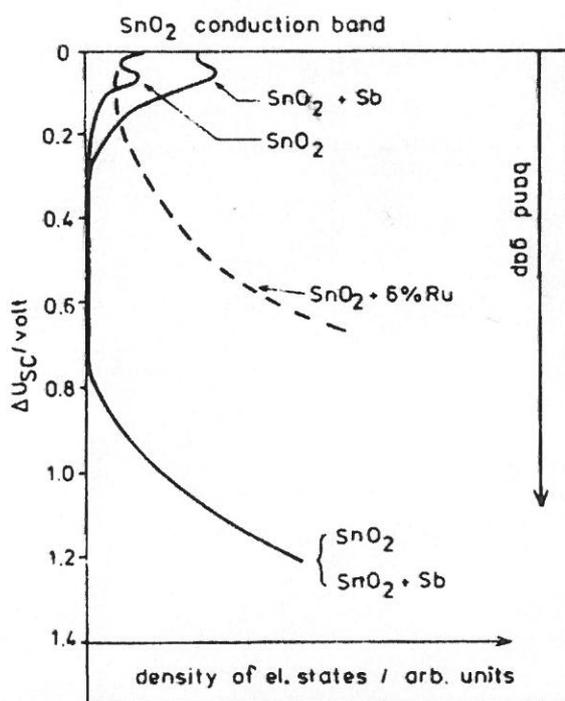


**Figure V.9:** Représentation schématique de la concentration en sites de surface  $N_s$  par rapport à leur niveau en énergie  $E_{ss}$  dans la bande interdite de SnO<sub>2</sub> mesurée par rapport au bas de la bande de conduction, d'après les données du tableau V.1. Les notations Sb-OH et F-OH se réfèrent aux surfaces prétraitées en milieu NaOH.

Il existe une région commune (0,7-0,8 eV) aux deux dopants. Par contre, il y a deux régions bien distinctes suivant le dopant, les états formés en présence de Sb sont situés plus près de la bande de conduction (0,4 à 0,6 eV) que ceux formés en présence du fluor (0,9 à 1,1 eV). Il faut mentionner que dans le cas de l'antimoine comme dopant, il est connu dans la littérature qu'il y a une forte ségrégation de cet élément à la surface [5-6-7-8]. Pour une concentration en volume de l'ordre de Sb/Sn = 0,02, la concentration superficielle peut atteindre Sb/Sn ≈ 0,05 à 0,1 pour des températures de formation de 400 à 600°C, et beaucoup plus au-delà [7-8]. Par ailleurs, le prétraitement d'hydroxylation de la surface, par électrolyse à +0,4 V/ECS dans 1M NaOH, ne semble pas augmenter de manière sensible le nombre de liaisons de surface associées à ces états. Par contre, en présence de SAB, le nombre de liaisons est multiplié par trois, quel que soit le dopant. Le nombre de sites par état est typiquement compris entre 0,5 et 3.10<sup>13</sup> cm<sup>-2</sup>. Sachant que la densité atomique de la surface d'un solide est voisine de 10<sup>15</sup> atomes/cm<sup>2</sup>, on voit que les liaisons de surface associées à chacun de ces états occupent 0,5 à 3 % de la surface totale. Dans le cas où la densité de sites est la plus forte, surface hydroxylée et adsorption de SAB, la densité totale de sites (en sommant les deux états identifiés) atteint 2.10<sup>13</sup> sites/cm<sup>2</sup> pour SnO<sub>2</sub> :F/SAB et 4.10<sup>13</sup> sites/cm<sup>2</sup> pour SnO<sub>2</sub> :F/Sb/SAB, correspondant respectivement à 2 et 4 %

de la surface de chaque électrode. Par comparaison, en l'absence de traitement d'hydroxylation, l'adsorption seule de la SAB au potentiel de circuit ouvert correspond à une densité totale de sites en surface de l'ordre de  $5 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2}$ , plus faible qu'après hydroxylation de la surface.

Il reste la question de l'identification des états de surface dont nous avons mis en évidence l'existence par mesures d'impédance. Un premier état de cette question a été dressé dans un article de Badawy *et al*, basé sur des analyses UPS (UV photoelectron Spectroscopy) effectuées sur des films polycristallins [9]. Les résultats sont synthétisés dans la figure V.10 extraite de la référence [9]. Les données UPS y ont été complétées par des résultats plus anciens, tirés de mesures de capacité effectuées à une seule fréquence [10-11], suggérant une absence d'états de surface entre 0,2 et 0,8 eV sous la bande de conduction.



**Figure V.10:** Représentation de la distribution d'états de surface dans la bande interdite de SnO<sub>2</sub> pour différentes électrodes (SnO<sub>2</sub> ; SnO<sub>2</sub> :Sb ; SnO<sub>2</sub> :Ru) estimée à partir de mesures UPS et de capacité, d'après la référence [9]. La position des états est repérée par la chute de tension  $\Delta U_{sc}$  à travers la charge d'espace dans l'oxyde, ce qui est justifié compte tenu du niveau de dopage des échantillons considérés ( $N < 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ ).

La figure V.10 montre la présence d'une distribution d'états entre 0 et 0,3 eV sous la bande de conduction, et d'une autre distribution augmentant exponentiellement à partir de 0,7 eV, toutes les deux indépendantes de la présence ou non de l'antimoine. En présence de ruthénium, le profil est profondément modifié, avec une forte densité d'états démarrant depuis la

bande de conduction. Dans la référence <sup>[9]</sup>, l'origine physicochimique de ces états et leur densité respective n'est pas précisée. Les données de la figure V.10, essentiellement déduites de mesures en ultraviolet ne semblent pas aisément comparables à nos propres résultats obtenus en milieu liquide (Fig. V.9).

Dans une revue récente sur le matériau SnO<sub>2</sub>, centrée sur les propriétés de surface en relation avec la catalyse ou la détection de gaz, il est fait état d'un nombre relativement limité de travaux en ce domaine si l'on compare, par exemple, à ceux sur TiO<sub>2</sub> <sup>[12]</sup>. L'origine de cette différence réside, semble-t-il, dans l'absence de disponibilité commerciale de monocristaux de SnO<sub>2</sub> permettant des études physiques fines, basées essentiellement sur des techniques de photoémission électronique en ultraviolet. Concernant l'effet de l'incorporation de l'antimoine, celui-ci agit comme dopant sous la forme Sb<sup>5+</sup> en substitution de Sn<sup>4+</sup> dans le réseau de SnO<sub>2</sub>. Il est connu qu'il peut coexister sous la forme Sb<sup>3+</sup> qui tend à ségréger à la surface en créant des états de surface agissant comme pièges à électrons <sup>[8]</sup>. Selon la littérature, ces états seraient plutôt situés dans le tiers inférieur de la bande interdite, à proximité de la bande de valence et donc non identifiables à ceux que nous avons observés dans ce travail. Un autre facteur gouvernant les propriétés de surface de SnO<sub>2</sub> est la double valence (II et IV) de l'étain, permettant des transformations réversibles entre des surfaces comportant des cations Sn<sup>4+</sup> et des surfaces réduites comportant des cations Sn<sup>2+</sup>, ces deux situations étant associées à un environnement en oxygène différent. Toutefois, il a été montré pour des surfaces (110), (100) et (101), que les états de surface associés à des surfaces réduites et à des défauts induits par des lacunes d'oxygène étaient situés très bas dans la bande interdite <sup>[12]</sup>. Un autre élément à prendre en considération est l'interaction de l'eau avec la surface de SnO<sub>2</sub>. Il a été montré que les molécules d'eau sont désorbées à partir de 150°C, tandis que les groupements hydroxyles, plus stables, ne désorbent qu'entre 250 et 500°C <sup>[13]</sup>. L'hydrolyse progressive de la surface de SnO<sub>2</sub> en contact avec un électrolyte aqueux (1M KCl) a été mise en évidence par la chute du rendement quantique avec le temps d'immersion d'un film SnO<sub>2</sub> sensibilisé par de la rhodamine <sup>[14]</sup>. Dans ce même travail, la présence de groupements OH à la surface a été confirmée par spectroscopie infrarouge par réflexion.

*De cet examen de la littérature existante, en l'absence de comparaison précise, on peut conclure, au moins provisoirement, que les états de surface que nous avons détectés, correspondraient à des sites Sn-OH, et éventuellement Sb-OH pour les électrodes SnO<sub>2</sub> :F/Sb, résultant des interactions H<sub>2</sub>O/SnO<sub>2</sub> compte tenu des propriétés acido-basique de la surface de l'oxyde. L'ancrage de la SAB à la surface de l'oxyde d'étain aurait lieu via ce type de sites.*

### V.3. Conclusion

L'analyse faite à partir de mesures de la capacité interfaciale nous a permis de montrer l'existence et de caractériser les états de surface formés à l'interface SnO<sub>2</sub>/électrolyte, en l'absence de réactions faradiques (pas de dégagement de chlore, ni d'oxygène), en l'absence ou en présence de SAB. Ces états électroniques sont la signature de liaisons chimiques à la surface de l'oxyde d'étain. Elles représentent environ 0,5 à 4% de la totalité des sites à la surface de l'oxyde. Pour un élément dopant donné, le nombre de sites concernés est maximum après adsorption de SAB sur la surface préalablement hydroxylée. Il est trois fois plus élevé dans le cas du dopage à l'antimoine comparé à celui au fluor. Un inconvénient de cette approche est que nous n'avons pas d'identification chimique fiable de la nature de ces états, seulement la présomption de sites Sn-OH et Sb-OH. Une possibilité a été démontrée dans la littérature : il s'agit de l'utilisation de l'effet SERRS (Surface Enhanced Resonance Raman Scattering) pour identifier des liaisons covalentes formées entre des complexes organiques et une surface d'oxyde d'étain <sup>[15]</sup>. Le procédé nécessite le dépôt d'une fine (5 nm) couche d'argent à la surface pour produire l'effet SERRS. Cette technique pourrait être envisagée dans les travaux futurs.

## Références du chapitre V

- 
- <sup>1</sup> S.R. Morrison, « Electrochemistry at semiconductor and oxidized metal electrodes », Plenum, New York (1980).
- <sup>2</sup> P. Allongue, H. Cachet, *J. Electrochem. Soc.* **132** (1985) 45.
- <sup>3</sup> W.P. Gomes, « Semiconductor electrolyte junctions », dans « L'interface semiconducteur / électrolyte », CNRS, Ecole d'hiver, Aussois, 1984, p. 113.
- <sup>4</sup> B.A. Boukamp, *Solid State Ionics*, **20** (1986) 31. Logiciel « Equivalent circuit », Université de Twente (Pays-Bas), (1989).
- <sup>5</sup> H. Cachet, J. Stoch, A. Kowal, "Characterization of highly doped tin dioxide polycrystalline layers by AFM, XPS and AES", 3rd European Congress on Catalysis (EuropaCat-3), J. Haber, K. Dyrek and J.M. Lagan editors, Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Cracovie (Pologne), Abstracts vol.2, p. 493 (1997).
- <sup>6</sup> B. Correa-Lazano, Ch. Comminellis, A. De Battisti, *J. Electrochem. Soc.* **143** (1996) 203.
- <sup>7</sup> D. Szczuko, J. Werner, S. Oswald, G. Behr, K. Wetzig, *Appl. Surf. Sci.* **179** (2001) 301.
- <sup>8</sup> V. Dusastre, D.E. Williams, *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 6732.
- <sup>9</sup> W. Badawy, K. Doblhofer, I. Eiselt, H. Gerischer, S. Krause, J. Melsheimer, *Electrochim. Acta* **29** (1984) 1623.
- <sup>10</sup> F. Möller, R. Memming, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **76** (1972) 469.
- <sup>11</sup> D. Elliott, D.L. Zellmer, H.A. Laitinen, *J. Electrochem. Soc.* **117** (1970) 1343.
- <sup>12</sup> M. Batzill, U. Diebold, *Progress in Surf. Sci.* **79** (2005) 47.
- <sup>13</sup> E.W. Thornton, P.G. Harrison, *J. Chem Soc. Faraday Trans. I* **71** (1975) 2468.
- <sup>14</sup> B. Bressel, H. Gerischer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **87** (1983) 398.
- <sup>15</sup> B.B. Kaul, R.E. Holt, V.L. Schlegel, T.M. Cotton, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1580.

## **CHAPITRE VI**

### **MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES ACQUISES PAR SnO<sub>2</sub> APRES TRAITEMENT ELECTROCHIMIQUE**

## Chapitre VI: Mise en évidence des propriétés antibactériennes acquises par SnO<sub>2</sub> après traitement électrochimique

### VI.1. Introduction

Nous avons vu dans le chapitre IV que les deux techniques d'analyse, XPS et MEB-EDX, révèlent la présence de chlore (voire de brome lors de l'utilisation d'eau de mer) et l'absence de sodium dans la couche organique déposée sur SnO<sub>2</sub> lors de la production de HClO en présence de protéines. Ces résultats suggèrent la formation de groupements chloramine connus comme ayant une action biocide. En effet, l'acide hypochloreux, formé lors de l'étape de la polarisation, peut donner des chloramines en réagissant avec les fonctions amine des acides aminés <sup>[1]</sup> selon la réaction suivante <sup>[2-3]</sup> :



Le transfert du chlore (Cl(+I)) aux composés organiques azotés peut s'effectuer par transfert direct en substituant (H) par (Cl) <sup>[4]</sup>, le chlore conserve alors son caractère oxydant.

Au cours de ce chapitre, dans un premier temps, nous nous attacherons à vérifier la présence de tels groupements. La caractérisation de ces derniers sera assurée par spectroscopie UV-visible grâce à l'emploi du réactif d'Ellman (TNB : 5 thio-2-nitrobenzoic acid) <sup>[5-6]</sup>. Une approche semi-quantitative sera également présentée.

Dans un deuxième temps, le caractère antibactérien des surfaces de SnO<sub>2</sub> polarisées en présence de protéines et de chlorures sera démontré par le suivi de la croissance bactérienne sur ces surfaces, d'une part, par microscopie électronique à balayage (MEB) et, d'autre part, par microscopie à fluorescence (coloration).

### VI.2. Caractérisation des groupements chloramine

#### VI.2.1. Mise en évidence des chloramines

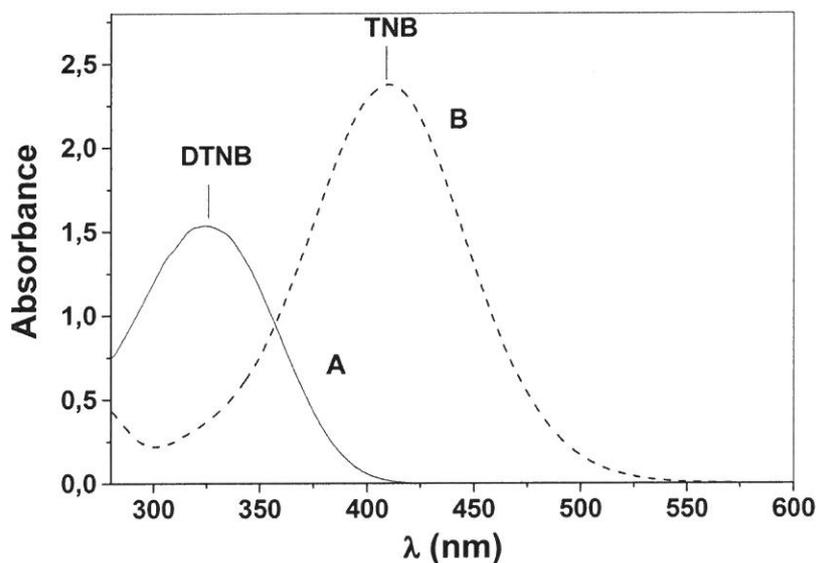
Nous allons mettre en évidence les chloramines avec l'utilisation du réactif TNB obtenu par addition de DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) <sup>[7]</sup> à une solution de

cystéine [8] (voir le schéma I.7 [9] dans le chapitre I et la réaction VI.2). Le TNB réagit avec les chloramines pour reformer le DTNB (réaction VI.3).



Expérimentalement, nous avons préparé deux solutions ; la première est une solution de DTNB 10<sup>-3</sup> M et la deuxième une solution de cystéine 2.10<sup>-3</sup> M. Ensuite, un volume égal de chacune des solutions est ajouté à une solution tampon de pH 7,4.

La réaction produit une couleur jaune intense et l'absorbance est mesurée dans une cuve de trajet optique 1 cm (figure VI.1, spectre B). Le spectre A reporté sur la figure VI.1 correspond à la solution de DTNB.



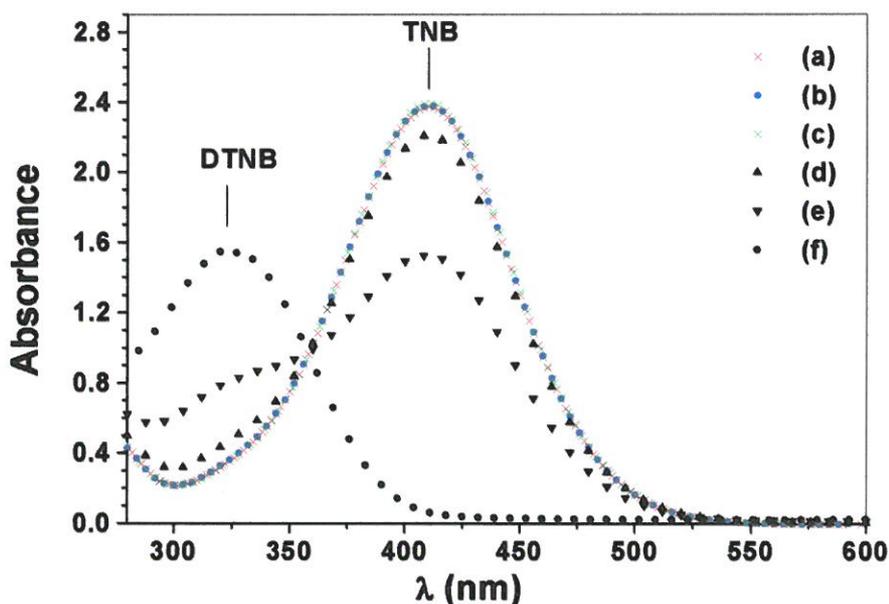
*Figures VI.1 : Spectres d'absorbance UV-visible d'une solution de DTNB (A), et d'une solution de TNB (B).*

Après la préparation du réactif TNB, nous avons rempli trois cuves dans lesquelles ont été ajoutées (1) de la protéine (SAB), (2) une lame de verre recouverte de SnO<sub>2</sub> non traitée et (3) une autre lame préalablement traitée électrochimiquement (polarisée à 1,5 V/ECS pendant 4 heures dans une solution de NaCl 0,5M et 1 mg/mL en SAB). Concernant la lame de SnO<sub>2</sub> traitée, elle a été immergée successivement pendant 30 s, 2 min et 5 min, jusqu'à réaction complète des molécules de TNB présentes dans la cuve.

La figure VI.2 présente les spectres enregistrés pour ces trois échantillons ; la courbe (a) représente la solution initiale de TNB ; la courbe (b) représente le spectre obtenu après ajout de l'albumine ; enfin, le spectre (c) a été obtenu après immersion de la lame de

SnO<sub>2</sub> non traitée. On remarque que ces trois spectres sont superposés. Les spectres (d), (e) et (f) correspondent à la lame de SnO<sub>2</sub> polarisée et SAB adsorbée. On remarque une diminution de l'absorbance à 412 nm qui correspond au TNB et l'augmentation de celle-ci à 324 nm qui correspond au DTNB.

Ces résultats nous permettent de dire que le réactif TNB réagit parfaitement avec les protéines modifiées et immobilisées sur la surface de SnO<sub>2</sub>, ce qui explique, qu'après 5 min (spectre f) d'immersion, on a reformé le DTNB (voir la réaction (VI.2)). On en conclut donc que des liaisons chloramine sont bien présentes au sein du dépôt organique formé sur la surface de SnO<sub>2</sub> lors du dégagement de HClO en présence de protéines.



**Figures VI.2:** Spectres d'absorbance UV-visible de la solution de TNB (a) sans ajout, (b) après ajout d'albumine, (c) après immersion d'une lame de SnO<sub>2</sub> non traitée, (d),(e), (f) après immersions successives pendant respectivement 30 s, 2 min et 5 min d'une lame traitée électrochimiquement (voir texte).

### VI.2.2. Approche quantitative

Le but de cette étude était de déterminer le nombre moyen de liaisons chloramine formées par entité de SAB immobilisée sur la surface de SnO<sub>2</sub> polarisée.

Le dépôt organique formé lors de la polarisation de SnO<sub>2</sub> en présence d'ions chlorure et de protéines a été retiré mécaniquement de la surface, broyé puis pesé avant d'être mis en contact avec une solution de TNB. La figure VI.3 montre les spectres obtenus pour la solution de TNB initiale et après ajout de la poudre et solubilisation à l'obscurité pendant 30 minutes et 45 minutes (la solution de TNB n'est pas très stable).

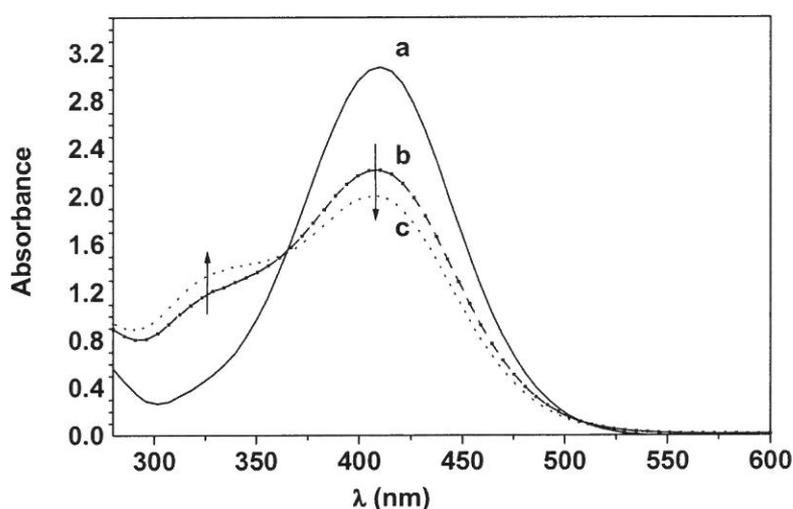
La concentration du réactif TNB était de  $2,1 \cdot 10^{-4}$  M. Pour la mesure du spectre de référence, nous avons utilisé une cuve de 0,5 cm de trajet optique et, afin de le comparer avec les autres spectres, on a multiplié la DO par 2 (Figure VI.3). Puis, nous avons solubilisé la masse récupérée de la SAB (0,0028g) dans 6,4 mL de solution TNB. En comparant les deux spectres (b) et (c) correspondant à deux temps  $t_1$  (30 min) et  $t_2$  (45 min) respectivement, on remarque une nette diminution de la densité optique pour la longueur d'onde 412 nm qui correspond au TNB, et une augmentation de celle-ci pour la longueur d'onde 324 nm qui correspond au DTNB.

Le nombre de liaisons chloramine ayant réagi a été estimé à partir du spectre (c). Selon la réaction (VI.3), 2 moles de TNB réagissent avec une mole de chloramine. D'après la loi de

Beer-lambert ( $DO = \epsilon \cdot l \cdot c$ ), on obtient 
$$c = \frac{\Delta DO}{2 \cdot \epsilon \cdot l}$$

Sachant que  $\Delta DO = 1$ ,  $\epsilon = 14100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [10] et  $l = 1 \text{ cm}$ , on calcule  $c = 3,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  d'où, pour un volume de 6,4 mL,  $n = 2,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$  de chloramines.

Le nombre de moles de SAB (masse molaire : 66000 Da) présent dans les 0,0028g récupéré est de  $4,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ , on en déduit que le nombre moyen de liaisons chloramine est de 5,4 par entité de SAB immobilisée sur la surface de SnO<sub>2</sub>. Cette valeur semble faible compte tenu que la SAB comprend 17 His et 59 Lys (voir tableau IV.3). Cette étude préliminaire doit être affinée. Les principaux problèmes d'ordre expérimental sont la solubilisation des agrégats et la stabilité de la solution de TNB.



**Figures VI.3:** Spectres d'absorbance UV-visible : de la solution initiale de TNB (—) ; après respectivement 30 min (---) et 45 min (....) de solubilisation de la poudre récupérée.

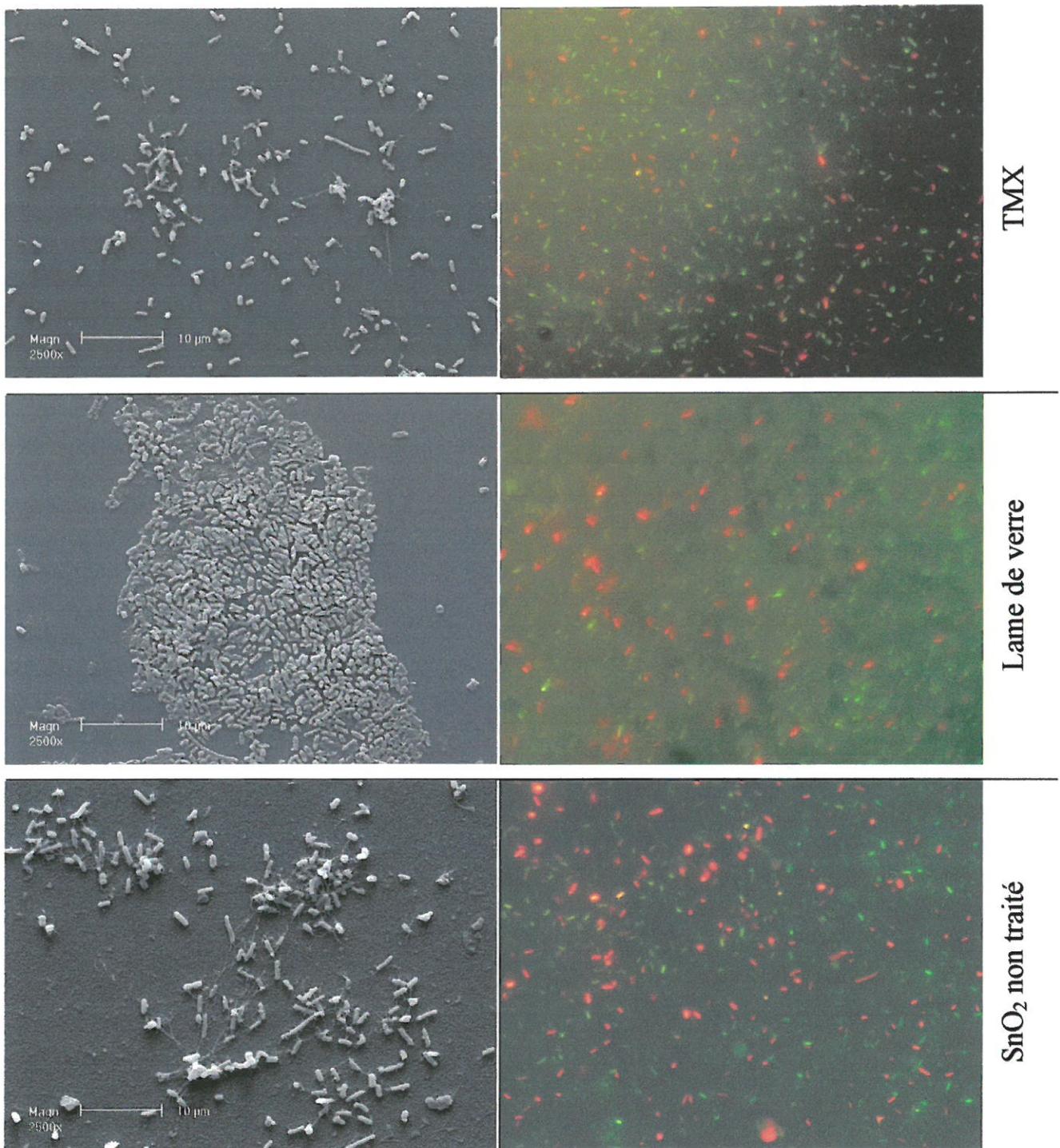
### VI.3. Propriétés antibactériennes de la surface SnO<sub>2</sub> [11]

Après avoir établi la présence de groupements chloramine, nous nous proposons de tester le caractère antibactérien d'une surface SnO<sub>2</sub>, en présence ou non du film organique. Ces expériences ont été faites en collaboration avec le laboratoire Biomécanique et Génie médical (UMR 6600) de l'Université de Technologie de Compiègne. Pour cela, nous avons préparé des échantillons de films SnO<sub>2</sub>, immergés en circuit ouvert ou polarisés anodiquement dans des milieux chlorurés (eau de mer naturelle ou solutions de NaCl), en présence ou non de protéines. Tous les résultats présentés dans le chapitre IV montrent qu'il y a formation d'un film organique épais (agrégation) sur la surface de SnO<sub>2</sub>. Notre but dans ce chapitre est d'étudier l'effet de ce film organique sur la colonisation bactérienne de SnO<sub>2</sub>. Pour cela, nous avons utilisé une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) comme bactérie modèle. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé deux techniques d'observation : la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie à fluorescence (MF).

#### VI.3.1. Colonisation de surfaces "non modifiées"

Afin d'étudier l'adhésion bactérienne de *E. coli* sur différents substrats, divers échantillons (i) SnO<sub>2</sub>, (ii) thermanox (matériau traité pour la culture de cellules et considéré comme un matériau de référence) et (iii) une lame de verre, tous trois non conditionnés par un film organique, ont été immergés dans une suspension bactérienne de charge bactérienne  $5 \times 10^7$  UFC /mL (Unités Formant des Colonies/mL). Après 17 heures de contact à 37 °C, les échantillons sont rincés à la verticale à l'aide de PBS puis observés par les deux techniques, MEB et MF. Pour les observations MEB, les échantillons sont immergés pendant 1 heure dans un fixateur (3% glutaraldéhyde tampon Rembaum pH = 7,4) dans le but de fixer les bactéries sur les surfaces, puis séchés dans une étuve à 10% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. En moyenne, 15 photos (grossissement 5000) ont été prises par échantillon à des endroits différents pour obtenir une information moyenne sur les concentrations superficielles, suffisamment représentative.

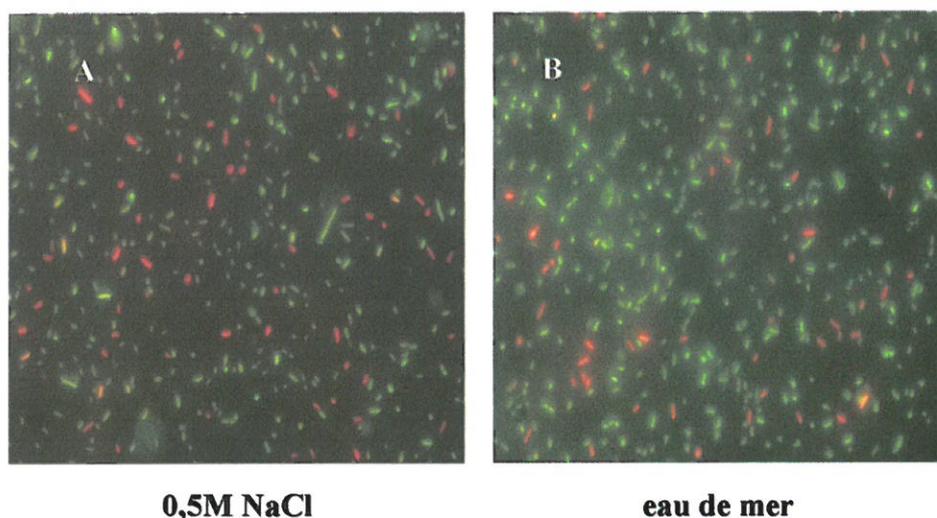
Les résultats obtenus pour les trois témoins sont reportés sur la figure VI.4. Ces photos montrent clairement que les différents substrats sont colonisés par les bactéries.



**Figure VI.4:** Images de différents substrats après 17h de contact avec une suspension de  $5 \cdot 10^7$  *Escherichia. coli* /mL obtenues par MEB (à gauche) et par microscopie à fluorescence (à droite). Les spots rouges et verts correspondent respectivement à des bactéries endommagées et non endommagées.

### VI.3.2. Adhésion de *E. coli* sur un film SnO<sub>2</sub> polarisé en l'absence de protéines

Afin d'étudier le rôle du film organique vis-à-vis de l'adhésion bactérienne sur l'électrode SnO<sub>2</sub>, nous avons polarisé les électrodes dans deux milieux différents, NaCl 0,5 M et l'eau de mer, sans ajout de SAB, pendant 1h30. La figure VI.5 montre que la surface est bien colonisée par des bactéries, et qu'il existe des bactéries non endommagées (couleur verte) et des bactéries endommagées (couleur rouges).

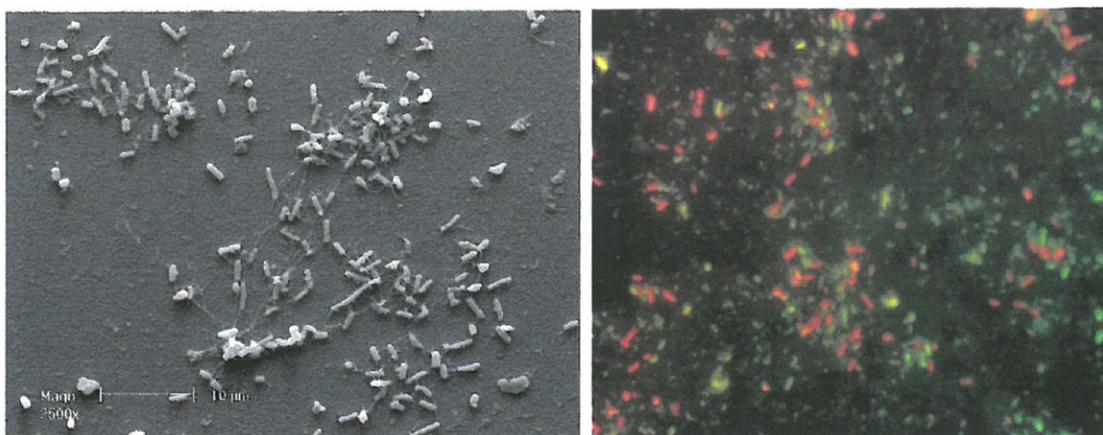


**Figure VI.5:** Images obtenues par fluorescence de films de SnO<sub>2</sub> immergés dans ; (A) : NaCl 0,5M et (B) : l'eau de mer, après avoir été polarisés à  $E = +1,5$  V/ECS pendant 1h30.

### VI.3.3. Adhésion de *E. coli* sur un film SnO<sub>2</sub> en circuit ouvert en présence de SAB

Les études présentées dans le chapitre IV nous ont permis de montrer l'accrochage de la matière organique à la surface de SnO<sub>2</sub>, même en circuit ouvert. Pour les tests de colonisation bactérienne présentés ci-après, nous avons choisi deux concentrations différentes 0,1 (1 mg/mL) et 0,05% (0,5 mg/mL) de SAB.

La figure VI.6 présente les résultats relatifs à un échantillon de SnO<sub>2</sub> simplement immergés pendant trois jours dans NaCl 0,5M en présence de 0,1% d'albumine.



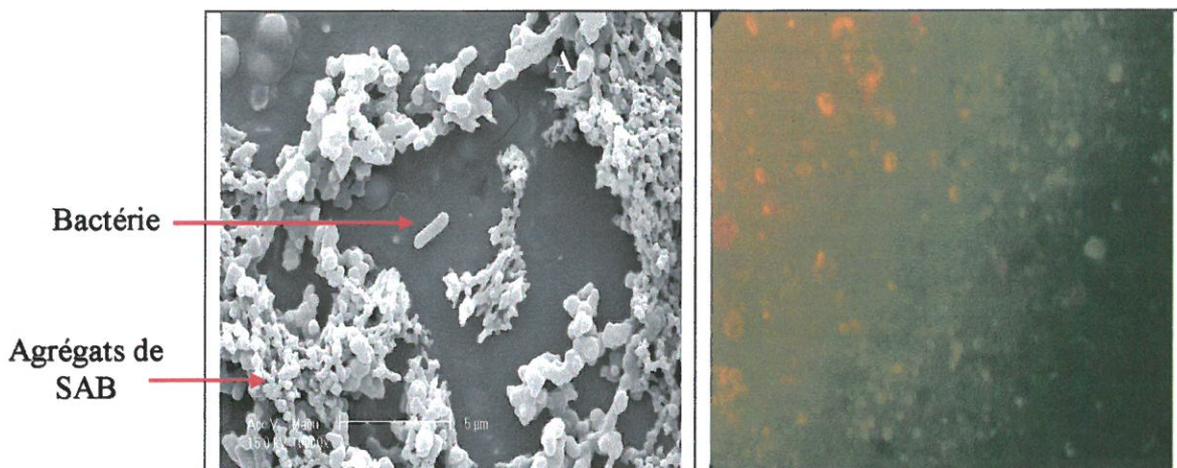
**Figure VI.6:** Images obtenues par MEB (gauche) et par fluorescence de films SnO<sub>2</sub> traité dans NaCl 0,5M pendant 3 jours en présence de 1mg/mL de SAB puis mis au contact d'une suspension bactérienne. Les spots rouges (verts) correspondent à des bactéries mortes (vivantes) respectivement.

Les résultats de la figure VI.6 montrent clairement que l'existence d'un voile biologique sur une surface qui a été immergée dans une solution contenant des protéines et des chlorures, mais qui n'a pas subi un traitement électrochimique préalable sous polarisation anodique, ne possède aucun caractère antibactérien, quelle que soit la concentration en volume de la SAB et quel que soit le milieu choisi. La suite de notre étude consiste donc à vérifier si une surface d'oxyde d'étain qui a été polarisée anodiquement en présence de SAB en milieu salin présente, ou non, un effet antibactérien.

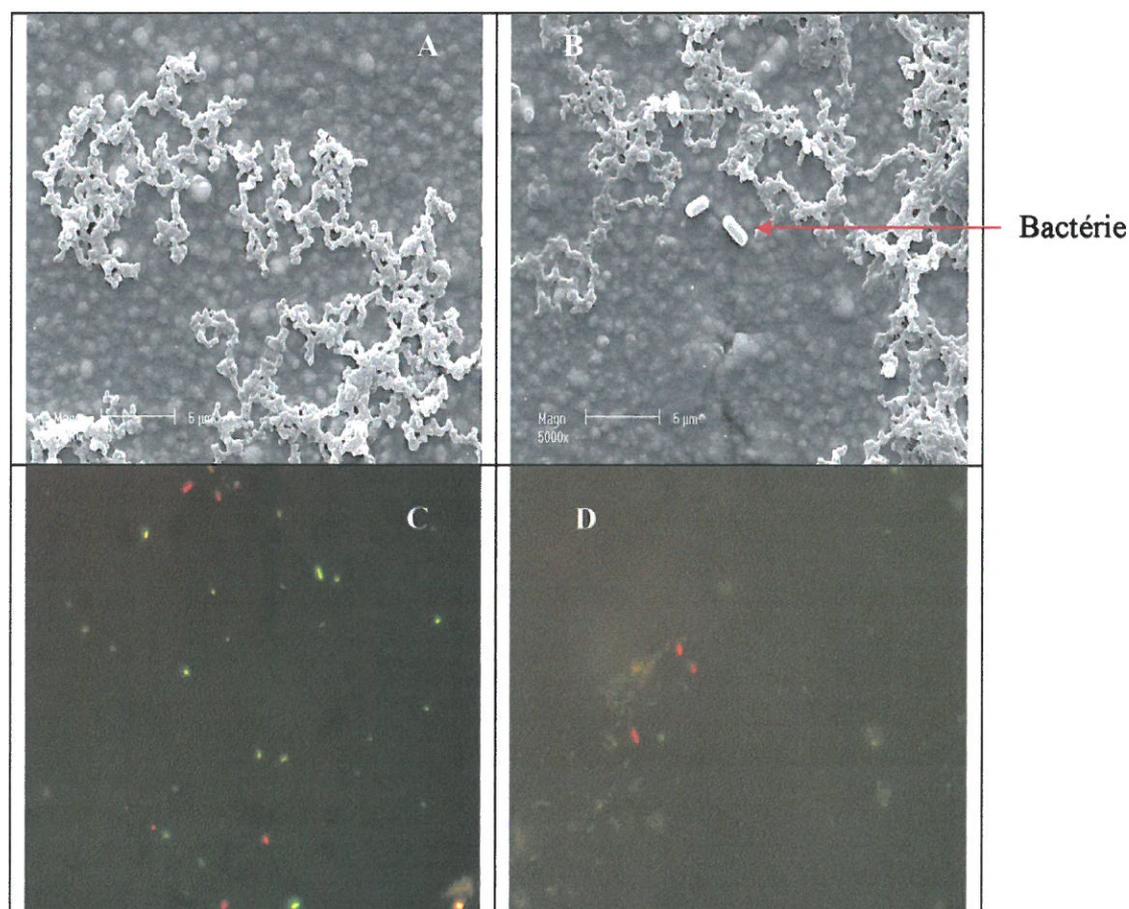
#### **VI.3.4. Adhésion de *E. coli* sur des films SnO<sub>2</sub> ayant été polarisés anodiquement en présence de SAB**

##### ***VI.3.4.1. Milieu artificiel en présence de l'albumine SAB***

Dans un premier temps, nous avons travaillé dans le milieu NaCl 0,5M en présence de 0,1 et 0,05% d'albumine. Après polarisation, nous avons montré qu'un film organique renfermant des liaisons chloramine est présent sur la surface. Pour chaque technique d'observation, on a préparé des échantillons séparés. Les observations MEB montrent que l'adsorption des protéines n'est pas uniforme, avec la formation d'agrégats, qui résultent d'une interaction forte entre la protéine et l'acide hypochloreux <sup>[12]</sup> formé lors de la polarisation anodique. La comparaison des images obtenues après polarisation anodique à E = + 1,5 V/ECS (Fig. VI.7) avec celles obtenues pour des électrodes non polarisées (Fig. VI.6) montre un effet spectaculaire de la polarisation sur la colonisation bactérienne de la surface.



**Figure VI.7:** Images de SnO<sub>2</sub> traité électrochimiquement (2 heures à +1,5 V/ECS dans une solution contenant NaCl 0,5M + 0,1% de SAB) après incubation en présence de bactéries. Images obtenues par microscopie électronique à balayage (à gauche) et par microscopie à fluorescence (à droite).



**Figure VI.8:** Images de *E. coli* obtenues par microscopie électronique à balayage (A,B) et par microscopie fluorescence (C,D) après 2 heures de polarisation à +1,5 V/ECS dans une solution contenant NaCl 0,5M + 0,05% d'albumine SAB.

Pour confirmer ces résultats, nous avons choisi une autre concentration en albumine en conservant le même milieu. La figure VI.8 montre les images obtenues par microscopie électronique à balayage et par microscopie à fluorescence dans le milieu NaCl 0,5M et 0,05% en albumine. Ces images prouvent clairement qu'après un traitement électrochimique (polarisation anodique) en présence simultanément de protéines et d'ions chlorure, les surfaces des films SnO<sub>2</sub> acquièrent un caractère antibactérien.

L'ensemble des résultats est regroupé dans le tableau VI.1. Ce tableau comprend : le nombre moyen de bactéries par image MEB et la densité bactérienne correspondante, après 17 heures de contact avec la surface SnO<sub>2</sub> à 37 °C. Les résultats obtenus montrent clairement qu'après la polarisation anodique à E = +1,5 V/ECS en présence de la SAB et d'ions chlorure, pour les deux concentrations en volume choisi en SAB (0,05 et 0,1%), le nombre de bactéries est inférieur, de 20 à 150, par rapport aux valeurs constatées sur les témoins (TMX, SnO<sub>2</sub> non polarisé).

Echantillon	TMX	SnO <sub>2</sub>	SnO <sub>2</sub>	SnO <sub>2</sub>	SnO <sub>2</sub>
Pré-traitement	–	a	b	c	d
Nombre de bactéries par image MEB	34	31	25	1,5	0,2
Densité de bactéries (10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> )	<b>4,7</b>	<b>4,3</b>	<b>3,5</b>	<b>0,21</b>	<b>0,03</b>

**Tableau VI.1 :** Nombre moyen de bactéries par image MEB et densité bactérienne mesurés sur divers échantillons après incubation à 37°C pendant 17 h en présence de 5.10<sup>7</sup> bactéries/mL. Pré-traitement : (a) et (b) SnO<sub>2</sub> immergé pendant 54 heures dans une solution NaCl 0,5M et 0,1% et 0,05% de SAB respectivement ; (c) et (d) SnO<sub>2</sub> polarisé à 1,5V pendant 2h dans une solution NaCl 0,5M et 0,1% et 0,05% de SAB respectivement.

#### VI.3.4.2. Eau de mer en présence d'albumine SAB

Le paragraphe précédent a mis en évidence qu'une surface d'oxyde d'étain ayant été polarisée anodiquement en présence de matière organique (SAB) et d'ions chlorure n'est que faiblement colonisée par les bactéries. Après avoir travaillé dans un milieu artificiel, nous avons reproduit le même type d'expériences dans l'eau de mer, en gardant les mêmes

concentrations en albumine, sachant que l'eau de mer est un milieu complexe. Le protocole expérimental utilisé a été le suivant : on a polarisé une électrode SnO<sub>2</sub> pendant 2 heures dans l'eau de mer naturelle contenant 0,1% (1 mg/ml) d'albumine SAB. Après les deux heures de polarisation, l'électrode a été rincée trois fois 10 minutes à l'eau bidistillée. La même démarche expérimentale que précédemment a été suivie pour la croissance bactérienne. Une première série d'expériences a été conduite dans l'eau de mer pour une concentration en volume de SAB de 1 mg/mL. La figure VI.9 montrent les images obtenues par microscopie à fluorescence pour deux concentrations en albumine, 0,5 et 1 mg/mL. Les deux images de cette figure correspondant à deux échantillons différents montrent bien que la surface est exempte presque totalement de bactéries.



*Figure VI.9: Images obtenues par microscopie à fluorescence après 2 heures de polarisation à +1,5 V/ECS dans l'eau de mer + 0,1(à gauche) et 0,05% (à droite) d'albumine SAB.*

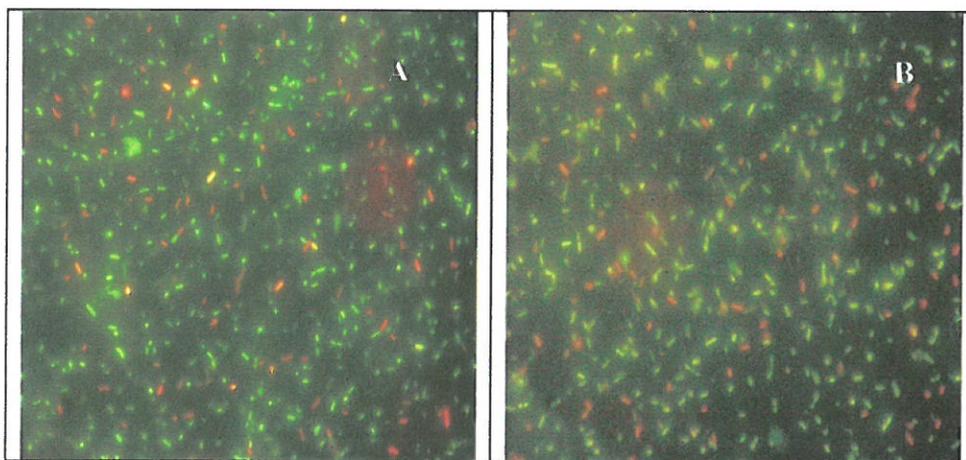
#### ***VI.3.4.3. Effet des ions bromure sur l'adhésion bactérienne en présence de SAB***

Il est connu que les substances bromées sont désinfectantes et peuvent être utilisées comme une alternative au chlore. Dans les piscines, le brome est utilisé contre la formation des algues, des bactéries et des odeurs. En France, il a été utilisé comme désinfectant de l'eau depuis les années 1930. Il y a donc un parallèle très fort entre l'action désinfectante du chlore et celle du brome.

Après avoir détecté la présence des ions bromures par les techniques XPS et EDX sur le film SnO<sub>2</sub> dans l'eau de mer sous polarisation anodique et vérifié qu'il y avait bien

adsorption de protéines SAB sur le film SnO<sub>2</sub> dans les mêmes conditions expérimentales (chapitre IV), on a voulu étudier l'effet du film organique formé sous polarisation anodique vis-à-vis de l'adhésion bactérienne.

Dans un premier temps, nous avons polarisé une surface de SnO<sub>2</sub> dans le milieu NaBr 0,5M en l'absence de SAB. Après deux heures de polarisation à  $E = + 1,23\text{V/ECS}$ , on a placé l'échantillon dans une suspension bactérienne à 10<sup>7</sup> bactéries/mL pendant 24 heures à 37 °C. La figure VI.10A montre clairement que la surface est totalement recouverte par les bactéries, ce qui veut dire que la surface ne possède aucun caractère antibactérien dans ces conditions. Dans un deuxième temps, on a immergé, en circuit ouvert, une surface SnO<sub>2</sub> dans une solution contenant NaBr 0,5M et 0,1% (1 mg/mL) de SAB pendant 3 jours. Les résultats présentés dans la figure VI.10B sont similaires à ceux illustrés par la figure VI.10A : les bactéries sont bien étalées sur la surface du matériau dans les deux cas.



**Figure VI.10:** Images de *E. coli* obtenues par microscopie à fluorescence pour des films SnO<sub>2</sub> immergés dans : (A) 0,5M NaBr sans SAB polarisé pendant 2 heures à +1,23 V/ECS, (B) NaBr 0,5M + 0,1 % SAB, en circuit ouvert, pendant 3 jours.

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence la formation d'un effet antibactérien pour une surface de SnO<sub>2</sub> polarisée anodiquement en présence d'ions chlorure et de protéines SAB en formant des chloramines. Nous avons voulu reprendre les mêmes expériences mais cette fois, dans une solution ne contenant que des ions bromure en lieu et place des ions chlorure. Le but est de vérifier s'il est possible de former un composé à caractère antibactérien, du type bromamine <sup>[13-14]</sup>. D'après la littérature, il est connu que l'acide hypobromeux HBrO formé par oxydation des ions bromure réagit préférentiellement

avec l'acide aminé Tyrosine <sup>[15]</sup>, alors que l'acide hypochloreux HClO réagit de préférence avec d'autres acides aminés tel que les Lysines <sup>[16]</sup>, Cystéine et Méthionine <sup>[17]</sup>.

Nous avons polarisé deux échantillons de SnO<sub>2</sub> dans une solution de NaBr 0,5M et 1 mg/mL de SAB pendant 2 heures. Après rinçage à l'eau bidistillée, ils ont été mis au contact d'une suspension bactérienne pendant 24 heures à 37 °C. Les observations par microscopie à fluorescence mettent en évidence la quasi-absence de bactéries pour ces surfaces traitées électrochimiquement, au contraire de surfaces de SnO<sub>2</sub> simplement immergées ou polarisées anodiquement mais en l'absence de SAB.

## VI.4. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ce chapitre démontrent que l'anodisation d'un film de SnO<sub>2</sub> dans un milieu chloruré (et/ou bromé) renfermant de l'albumine pouvait être un traitement efficace pour obtenir une protection antibactérienne. La première partie de ce chapitre nous a permis de caractériser la présence des groupements chloramine sur des films SnO<sub>2</sub> qui ont été polarisés à 1,5 V/ECS dans un milieu salin (NaCl 0,5M) et en présence de l'albumine (1 mg/mL) par rapport à de l'albumine pure et un film SnO<sub>2</sub> non traité en utilisant le réactif d'Ellman (TNB).

Après avoir identifié et tenté de quantifier les liaisons chloramine, la deuxième partie était consacrée à la croissance bactérienne. Les résultats obtenus prouvent clairement que la croissance d'*Escherichia coli* sur la surface de SnO<sub>2</sub> électrochimiquement modifiée en présence de la protéine et d'ions chlorure est très inférieure à celle obtenue sur les échantillons traités électrochimiquement en absence de l'albumine et sur ceux simplement immergés dans une solution contenant de l'albumine et des ions chlorures. Ces résultats précisent les propriétés antibactériennes acquises par ces surfaces de SnO<sub>2</sub> traitées électrochimiquement, ces propriétés étant dues à la présence de fonctions chloramine au sein du dépôt organique.

## Références du chapitre VI

- <sup>1</sup> M. Tachikawa, T. Aburada, M. Tezuka, R. Sawamura, J. Water Research **39** (2005) 371.
- <sup>2</sup> A.C. Carr, J.J.M. Van den Berg, C.C. Winterbourn, Biochim. Biophys. Acta **1392** (1998) 254.
- <sup>3</sup> A.V. Peskin, R.G. Midwinter, D.T. Harwood, C.C. Winterbourn, Free Radical Biology et Medecine **37** (2004) 1622.
- <sup>4</sup> Z. Takats, K.J. Koch, R.G. Cooks, J. Anal. Chem. **73** (2001) 4522.
- <sup>5</sup> E.L. Thomas, M.B. Grisham, M. M. Jefferson, J. Methods in Enzymology **132** (1986) 569.
- <sup>6</sup> L.J. yan, M.G. Traber, H. Kobuchi, S. Matsugo, H.J. Tritschler, L. Packer, J. Biochem. Biophys. **327**, N° 2, March 15, (1996). 330.
- <sup>7</sup> G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys, **398** (1995) 117.
- <sup>8</sup> M. D. Rees, D.I. Pattison, M.J. Davies, Biochem. J. **391** (2005) 125.
- <sup>9</sup> O. Nekrassova, N.S. Lawrence, R.G. Compton, Electroanalysis **15** (2003) 1655.
- <sup>10</sup> P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, Analytical **312** (2003) 224.
- <sup>11</sup> S. Haskouri, H. Cachet, J.L. Duval, C. Debiemme-Chouvy, Electrochem. Comm. **7** (2006) 1111.
- <sup>12</sup> A.L.P. Chapman, C.C. Winterbourn, S.O. Brennan, T.W. Jordan, A.J. Kettle, Biochem. J **375** (2003) 33.
- <sup>13</sup> M.C.M. Vissers, A.C. Carr, A.L.P. Chapman, Biochem. J. **330** (1998) 131.
- <sup>14</sup> R. Senthilmohan, A.J. Kettle, Archives of Biochemistry and Biophysics **445** (2006) 235.
- <sup>15</sup> D.I. Pattison, M.J. Davies, Biochemistry **43** (2004) 4799.
- <sup>16</sup> C.L. Hawkins, M.J. Davies, Biochem. J. **332** (1998) 617.
- <sup>17</sup> C. L. Hawkins, M.J. Davies, Free Radical Biology and Medicine **39** (2005) 900.

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail se situe dans le prolongement des travaux menés en partenariat avec IFREMER sur le développement d'un procédé permettant de protéger des biosalissures des fenêtres en verre immergées en milieu marin sur de longues périodes. Ce procédé repose sur l'oxydation électrochimique des ions chlorure effectuée sur une électrode transparente de dioxyde d'étain déposée en face avant de la fenêtre. Les campagnes de tests effectuées par IFREMER ont mis en évidence la persistance d'un effet protecteur après un temps d'utilisation sous polarisation anodique. Le but de notre étude était d'apporter des éléments de compréhension sur cet effet antisalissure acquis par le film  $\text{SnO}_2$  après fonctionnement en régime d'oxydation des ions chlorure.

La première partie de l'étude a consisté à tenter de détecter la formation d'un composé de type hydroxochlorure d'étain, connu comme ayant un caractère biocide. Dans nos conditions expérimentales, ce type de composé n'a pu être mis en évidence. Il y a simplement formation d'intermédiaires de corrosion résultant de l'interaction des liaisons superficielles avec des espèces radicalaires  $\text{OH}^\circ$  et  $\text{Cl}^\circ$  électrogénérées. Sous polarisation anodique, ces intermédiaires sont en partie porteurs d'une charge positive. La neutralisation progressive de ces intermédiaires chargés après coupure de la polarisation permet de rendre compte de l'évolution temporelle du potentiel d'abandon. La surface de  $\text{SnO}_2$  ainsi modifiée sous polarisation n'acquière aucun caractère antibactérien.

Le milieu marin est un milieu complexe. Il ne contient pas seulement des sels minéraux mais aussi de la matière organique. Dans la deuxième partie de ce travail, notre démarche a donc été d'étudier l'interaction de la matière organique avec la surface de  $\text{SnO}_2$  dans un milieu salin ( $\text{NaCl}$  0,5M et l'eau de mer). Les résultats obtenus par différentes techniques, analyses de surface (XPS et MEB), électrogravimétrie et analyses biochimiques, montrent qu'il existe une forte corrélation entre le dégagement de  $\text{HClO}$  et l'adsorption de la SAB à la surface de  $\text{SnO}_2$ . Nos résultats montrent explicitement qu'il n'y a pas d'effet direct du potentiel électrique. Les masses déposées en présence de  $\text{HClO}$  dépassent largement la monocouche.

Les résultats obtenus dans cette deuxième partie ont été complétés par des mesures de la capacité interfaciale. Ces mesures nous ont permis de montrer l'existence et de caractériser

des états de surface formés à l'interface SnO<sub>2</sub>/électrolyte, en l'absence de réactions faradiques (pas de dégagement de chlore, ni d'oxygène), en l'absence ou en présence de SAB. Ces états électroniques sont la signature de liaisons chimiques à la surface de l'oxyde d'étain. Elles ne représentent que quelques pourcents de la totalité des sites atomiques présents à la surface de l'oxyde. Pour un élément dopant donné, le nombre de sites concernés est maximum après adsorption de SAB sur la surface préalablement hydroxylée. Il est trois fois plus élevé dans le cas du dopage à l'antimoine que dans celui du dopage au fluor. Cette approche, basée sur les propriétés semiconductrices du dioxyde d'étain, prouve que la SAB se fixe à la surface de l'oxyde par des liaisons covalentes. Toutefois, elle ne permet pas une identification chimique directe de la nature de ces états, sites qui seraient vraisemblablement des sites Sn-OH et Sb-OH.

Après avoir établi avec succès la présence de la matière organique sur la surface de SnO<sub>2</sub>, nous avons montré que ce film organique est bien adhérent et que la modification induite par le chlore est stable avec le temps. La présence de chlore suggère la formation de groupements chloramine, qui pourraient conférer à la surface des propriétés antibactériennes. Dans la dernière partie de ce travail, nous avons mis en évidence, caractérisé et dosé de manière quantitative les groupements chloramine présents sur l'électrode SnO<sub>2</sub>. Le caractère antibactérien a été clairement démontré par deux techniques, la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique à balayage, sur des électrodes SnO<sub>2</sub> polarisées anodiquement en présence de l'albumine (SAB) et d'ions chlorure.

A l'issue de ce travail, les perspectives suivantes peuvent être proposées pour la poursuite des recherches dans ce domaine :

- Sur le plan expérimental, il faudra reprendre ces travaux dans l'eau de mer naturelle, ce qui impliquera des temps de polarisation allongés (deux semaines à un mois) afin de pouvoir former un film organique sur la surface. Dans les conditions de notre travail, nous avons pu diminuer les temps de polarisation (1 à 5 heures) en jouant sur la concentration en volume de la protéine.
- La protection antibactérienne concerne de nombreux types de matériaux et de multiples applications spécifiques. Dans le contexte du procédé antifouling CNRS-IFREMER, notre travail a été centré sur le dioxyde d'étain. Par la suite, d'autres matériaux conducteurs aptes à produire HClO à leur surface pourront être

envisagés, par exemple les matériaux carbonés, largement concernés par des applications biomédicales. Le choix d'autres sources de matière organique pourra également être envisagé, en considérant des molécules plus simples que la SAB.

- Une autre voie de recherche serait de comparer plus en profondeur l'effet de l'acide hypobromeux (HBrO) avec celui de l'acide hypochloreux (HClO) sur l'adsorption de protéines ainsi que sur le caractère antibactérien.
- Enfin, un point important vis-à-vis des applications potentielles sera de déterminer la durée de vie des propriétés antibactériennes dues aux groupements chloramine immobilisés à la surface du matériau.

# ANNEXES

## Annexe 1 :

Composition du tampon sample:

Tris 0.5M pH 6.8	1.25 ml
Glycerol	1 ml
SDS 20%	1 ml
Bleu bromo Phénol 0.05%	0.2 ml
H2O qsq 9.5 ml	6.05 ml

Pour le dosage de protéine est effectué selon le test « Bio-Rad DC protein » :

- Préparation de la solution A' : On ajoute 30  $\mu$ l de solution S pour 1.5 ml de solution. Pour chaque échantillon il faudra 127  $\mu$ l de solution A'.
- Préparation de la gamme étalon dans du tampon Laemmli (dilué au 1/5 dans du tampon Laemmli) avec une solution mère de BSA. (conservation de la solution mère pendant 60 jours à 4°C et 6 mois à -20°C).

Concentration protéique en mg/ml	0	0.2	0.5	0.75	1	1.3
Solution mère de BSA (1.42 mg/ml)	0 $\mu$ l	14 $\mu$ l	35.2 $\mu$ l	52.8 $\mu$ l	70.4 $\mu$ l	91.5 $\mu$ l
Tampon Laemmli	100 $\mu$ l	86 $\mu$ l	64.8	47.2	29.6	8.5

- Préparation des dilutions des échantillons dans un volume final de 25  $\mu$ l.
- Placer 25  $\mu$ l d'échantillon ou de « points de la gamme étalon » dans un tube Eppendorf de 1.5 ml.
- Ajouter 125  $\mu$ l « RC Reagent I » dans chaque tube, vortexer et laisser 1 min à TA

- Ajouter 125  $\mu$ l « RC Reagent II » dans chaque tube, vortexer et centrifuger les tubes pendant 3 à 5 min à 15000g.
- Enlever le surnageant et bien sécher les tubes en les renversant sur un papier absorbant.
- Ajouter 127  $\mu$ l de solution A' dans chaque tube et vortexer. Puis laisser incuber pendant 5 min à TA ou jusqu'à ce que le culot soit complètement dissous.
- Ajouter 1 ml de solution B à chacun des tubes, vortexer immédiatement après. Laisser à TA pendant 15 min.
- Lecture de la densité optique (D.O) à 750 nm après les 15 min d'incubation. L'absorbance est stable pendant une heure.

## **Annexe 2 :**

### ***1. préparation des gels***

- Mettre le peigne et marquer d'un trait 0.3 à 0.5 cm en dessous.
- Préparer le gel de migration (persulfate 20%). Dégazer le mélange pendant 15 minutes avant d'ajouter le persulfate et le TEMED.
- Pendant ce temps, vider l'eau qui se trouve à l'intérieur des plaques et sécher à l'aide d'un papier filtre.
- Déposer délicatement le gel de migration à l'aide d'une seringue, en évitant la formation de bulles. Placer le bout de la seringue au contact du bord des plaques.
- Rincer la seringue à l'eau
- Déposer à l'aide d'une seringue Hamilton 200 à 300 µl d'eau distillée, de façon à empêcher le gel d'être en contact avec l'air atmosphérique.
- Laisser polymériser environ 45 minutes (si persulfate 10%, la polymérisation dure 2H30).
- Préparer le stacking gel (pour deux gels, prendre les quantités indiquée pour un seul gel).
- Avant d'ajouter le TEMED, enlever l'eau et sécher le bord supérieur à l'aide d'un papier filtre.
- Poser le peigne et laisser couler le gel à l'aide d'une seringue en évitant la formation de bulles. Mettre le gel jusqu'en haut des plaques car en polymérisant, le gel se rétracte un peu.
- Laisser polymériser 30 à 40 minutes.
- Enlever les peignes et rincer les puits à l'eau distillée. Sécher sur un papier absorbant.
- Marquer d'un petit trait de feutre les puits qui ne pourront pas être utilisés (bulles).
- Monter les plaques dans la cuve à électrophorèse : fixer la partie supérieure marron, les molettes de fixation doivent être en position verticale. Enlever la partie inférieure. Si il n'y a qu'un seul gel, monter la plaque de plexiglas (marron) en vérifiant l'étanchéité du système.
- Préparer les échantillons : laisser dans l'eau bouillante les mélanges protéines + mercaptoéththanol pendant 5 minutes, puis vortexer.
- Déposer les échantillons : 20 µl des marqueurs de PM (dissoudre éventuellement le marqueur dans 100 µl d'eau distillée), puis 50 à 100 µl des échantillons (20 à 50

µg/puits) (seringue Hamilton). Pour les petits gels, 5 µg de protéines suffisent. Les dépôts doivent être dissymétriques.

- Verser du tampon de migration (tampon à électrophorèse) dans le bac principal jusqu'à quelques cm de hauteur.
- Placer le système portant les plaques dans la cuve et verser du tampon de migration dans la cuve supérieure de façon à recouvrir les deux demi bacs. Eviter que des bulles soient piégées dans le bas des plaques.

Gel de résolution à 7% et celle des puits à 4%

Gel %	DDI H <sub>2</sub> O (ml)	30% Acrylamide/Bis Dégazé	Tampon gel	10% SDS W/V
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1

Tampon de gel de résolution 1.5M Tris HCl. pH 8.8 + 50µl persulfate + 5µl TEMED

Stacking Gels buffer 0.5M Tris HCl pH 6.8 + 50 µl persulfate + 10 µl TEMED.

## ***2. Coloration au nitrate d'argent de gels électrophorétiques***

- Désaliniser les échantillons protéiques
- Réaliser un gel SDS-PAGE en prenant soin d'utiliser des solutions et des récipients débarrassés de toute trace de chlore (eau milliQ)
- Préparer toutes les 5 solutions nécessaires à la coloration, sauf celle de glutaraldéhyde, de nitrate d'argent et le révélateur.

## ***3. Solutions***

- 0.25% AgNO<sub>3</sub> : 100 mg AgNO<sub>3</sub> dans 40 ml d'H<sub>2</sub>O milliQ (pour 1 gel)
- Révélateur : 20 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 12.5% + 80 ml H<sub>2</sub>O + 40 µl formaldéhyde 37%
- Préchauffer le bain marie à 50°C
- Suivre le protocole suivant :

Etape	Solutions	Temps (min)	Température (°C)
1	50% ethanol, 10% Hac	2	50
2	10% ethanol, 5%Hac	2	50
3	10% ethanol, 5%Hac	4	50
4	8.3% glutaraldéhyde	10	50
5	10% ethanol, 5%Hac	3	50
6	10% ethanol, 5%Hac	5	50
7	Eau milliQ	2	50
8	Eau milliQ	2	50
9	0.25% nitrate d'argent	15	40
10	Eau milliQ	0.5	30
11	Eau milliQ	0.5	30
12	Révélateur	0.5	30
13	Révélateur	4	30
14	5% Hac	2	50
15	10%Hac, 5% glycérol	3	50

Avec Hac : acide acétique

## **Résumé**

L'oxydation électrochimique des ions chlorure produit l'acide hypochloreux qui est un oxydant puissant. Cette réaction est utilisée pour protéger, vis-à-vis des bio-salissures, des dispositifs optiques immergés en milieu marin, la réaction se déroulant sur une électrode transparente en dioxyde d'étain SnO<sub>2</sub>. Après une séquence sous polarisation, la fenêtre optique reste exempte de salissures pendant une à deux semaines. Une origine purement inorganique de cet effet via la formation d'hydroxochlorures d'étain a été d'abord examinée, puis rejetée. On a donc considéré une possible contribution de la matière organique ayant interagi avec l'acide hypochloreux produit sous polarisation. Ce dernier peut en effet réagir avec des molécules biologiques comme les protéines en les altérant. La Sérum Albumine Bovine (SAB) a été choisie comme protéine modèle. Son adsorption sur SnO<sub>2</sub> est étudiée *in situ* à l'aide d'une microbalance à quartz en fonction de la concentration volumique en SAB, de celle en ions Cl<sup>-</sup> et du potentiel appliqué. Sous polarisation à + 1,5 V/ECS, la SAB s'adsorbe notablement, avec un bon accord entre les mesures *in situ* par microbalance et *ex situ*, par des tests biologiques et des analyses XPS. Ces dernières révèlent la présence de chlore dans le film organique, suggérant la formation de groupements chloramine, qui pourraient constituer l'agent antisalissure. Le caractère antibactérien vis-à-vis de Escherichia Coli a été clairement démontré par deux techniques, la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique à balayage, sur des électrodes SnO<sub>2</sub> polarisées anodiquement en présence de HClO, de l'albumine SAB et d'ions chlorure.

### **Mots-clés :**

Dioxyde d'étain ; adsorption de protéines ; acides hypochloreux ; bio-salissures ; chloramines

## **Abstract**

Hypochlorous acid, a powerful oxidising agent, is readily obtained by electrochemical oxidation of chloride ions. This reaction is used to protect underwater optical instrumentation against biofouling, seawater electrolysis taking place at a conductive and transparent tin dioxide coating. After an anodic polarization sequence, the window was seen to remain free of biofouling for one or two weeks. A purely inorganic origin of this effect was firstly under consideration (as hydroxochloride formation) but it had to be ruled out. Another way is to consider the interaction of organic matter with hypochlorous species electrochemically produced. In this work, bovine serum albumin (BSA) was taken as a protein model. Quartz crystal microbalance (QCM) was used to study BSA adhesion on tin dioxide thin films as a function of BSA and chloride bulk concentrations, and of applied potential. At +1.5 V/SCE, the working conditions for active antifouling protection, BSA is found to be strongly adsorbed on SnO<sub>2</sub>. A good agreement is obtained between *in situ* QCM measurements and *ex situ* biological tests and XPS analyses. The latter show that chlorine is present in the organic layer at the SnO<sub>2</sub> surface, suggesting the formation of chloramine groups with likely antifouling properties. The character antibacterial with respect to Escherichia Coli was clearly shown by two techniques, fluorescence microscopy and scanning electronic microscopy, on anodically polarized SnO<sub>2</sub> electrodes in the presence of HClO, of albumin BSA and ions chloride.

### **Key words:**

Tin dioxide; protein adsorption; hypochlorous acid; antifouling; chloramines