



THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Yémima, BON SAINT CÔME

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie-Physique

Développement d'électrodes poreuses pour un bioréacteur pilote

Directeur de recherche :
Prof. Rolf Hempelmann
Prof. Alexander Kuhn

Soutenue le : 9 Décembre 2011

Devant la commission d'examen formée de :

M. GROS, Pierre	Laboratoire Génie Chimique Toulouse	Rapporteur
M. MAILLEY, Pascal	CEA (DSM/INAC/SPrAM/CREAB)	Rapporteur
M. Kohring Gert-Wieland	Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes	Examineur
Mme Delville Marie-Hélène	Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux	Président

Sommaire

Liste des abréviations.....	5
Introduction.....	9
1 Réacteur et bioréacteur électrochimique.....	15
<i>Références Bibliographiques</i>	<i>22</i>
2 Conception d'un bioréacteur électrochimique.....	29
2.1 Pour une production verte de composés chiraux et de sucres rares	29
2.1.1 Principe du bioréacteur électrochimique	29
2.1.2 Objectifs	30
2.2 Electrode de travail à structure poreuse : principes et applications	33
2.2.1 Electrode à porosité non-ordonnée	34
2.2.2 Electrode à porosité ordonnée	35
2.2.3 Applications des électrodes poreuses	38
2.3 Synthèse bio-électrocatalytique	39
2.3.1 Catalyse enzymatique.....	39
2.3.2 Transfert d'électron	44
2.3.3 Immobilisation	49
2.4 La contre électrode : une électrode à diffusion de gaz	56
2.5 Réacteur électrochimique avec régénération du cofacteur: état de l'art.....	58
<i>Références Bibliographiques</i>	<i>60</i>
3 Cristaux colloïdaux	69
3.1 Introduction aux cristaux colloïdaux.....	69
3.2 Cristaux colloïdaux élaborés à partir de microsphères de polystyrène ou de silice auto- assemblées.....	72
3.2.1 Microsphères : synthèse et propriétés	72
3.2.2 Sédimentation	79
3.2.3 Evaporation horizontale	79
3.2.4 Evaporation verticale	81
3.2.5 « Dip-drawing » méthode	84
3.2.6 Dépôt électrophorétique	85
3.2.7 Technique de Langmuir-Blodgett.....	86
3.3 Exploitation des cristaux colloïdaux.....	90

3.3.1 Infiltration	91
3.3.2 Applications.....	96
<i>Références Bibliographiques</i>	101
4 Elaboration de cristaux colloïdaux de grandes surfaces	109
4.1 Cristaux colloïdaux formés sous évaporation	110
4.1.1 Evaporation verticale.....	110
4.1.2 Evaporation verticale sous retrait : méthode du « dip-drawing »	124
4.2 Cristaux colloïdaux formés par déposition électrophorétique	128
4.2.1 Procédure expérimentale.....	128
4.2.2 Résultats.....	129
4.2.3 Réparation de fissures par dépôt électrophorétique	130
4.3 Cristaux colloïdaux élaborés par la technique de Langmuir-Blodgett	132
4.3.1 Description du dispositif	132
4.3.2 Procédure expérimentale.....	133
4.3.3 Résultats.....	135
4.3.4 Conclusion.....	142
<i>Références Bibliographiques</i>	143
5 Immobilisation de biomolécules à la surface d'électrodes macroporeuses : études préliminaires	147
5.1 Caractérisation des électrodes macroporeuses	147
5.2 Etude de l'encapsulation de l'hémoglobine dans des couches de silice ultra-minces	153
5.2.1 Détails expérimentaux.....	154
5.2.2 Résultats et discussion.....	154
5.2.3 Conclusion.....	168
<i>Références Bibliographiques</i>	169
6 Système bio-électrocatalytique encapsulé dans des couches minces de silice	173
6.1 Electrocatalyse du cofacteur NADH/NAD⁺	173
6.1.1 Réduction catalysée du NAD ⁺	174
6.1.2 Oxydation catalysée du NADH	180
6.2 Encapsulation d'un système bi-enzymatique dans une couche composite électrogénérée ..	182
6.2.1 Immobilisation par une couche mixte silice/polyélectrolyte.....	182
6.2.2 Détails expérimentaux.....	183
6.2.3 Résultats et discussion.....	184

6.3 Immobilisation du médiateur	194
6.3.1 Procédure expérimentale de modification de surface et processus électrochimique	195
6.3.2 Résultats et discussion	198
6.4 Optimisation de la couche mince d'encapsulation : incorporation de nano-particules d'or fonctionnalisées	200
6.4.1 Détails expérimentaux	201
6.4.2 Résultats et discussion	202
6.4.3 Conclusion	212
6.5 Immobilisation du cofacteur NAD⁺	213
6.5.1 Inclusion physique du cofacteur dans la couche mince de silice mésoporeuse	213
6.5.2 Immobilisation par pont moléculaire	215
6.5.3 Stabilisation par greffage covalent du cofacteur à la matrice de silice	217
6.5.4 Conclusion	220
<i>Références Bibliographiques</i>	<i>221</i>
7 Méthode alternative pour l'immobilisation d'enzymes : les peintures polymère électrophorétiques	225
7.1 Présentation du Résydrol®	225
7.2 Immobilisation de l'hémoglobine	226
7.2.1 Détails expérimentaux	226
7.2.2 Résultats et discussion	226
7.3 Immobilisation du système électrocatalytique final	230
7.3.1 Détails expérimentaux	230
7.3.2 Résultats et discussions	230
7.4 Conclusion	238
<i>Références Bibliographiques</i>	<i>240</i>
8 Test du bioréacteur électrochimique	243
8.1 Description du dispositif	243
8.2 Réduction du peroxyde d'hydrogène.....	245
8.3 Mise en marche des électrodes à structure optimisée dans le réacteur à flux	250
8.3.1 Procédure d'électrodéposition.....	250
8.3.2 Mesures ampérométriques de l'électrosynthèse	251
8.4 Conclusion	253
Conclusion et perspectives	255
Annexes.....	257

Résumé.....	263
Abstract.....	263

Liste des abréviations

ABTS	azinois(acide 3 -ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscope à force atomique “atomic force microscopy”
A_e	aire de l'électrode
ATP	adénosine triphosphate
Au NP	nanoparticules d'or
C	concentration en réactif
CD	créatinine déiminase
CE	contre électrode
CMC	concentration micellaire critique
cfc	cubique face centré
CTNFM	4-carboxy-(2,5,7-trinitro-9-fluorenylidene)-malonitrile
CV	cyclovoltammogramme
d	distance entre deux électrodes
DI	diaphorase
DLS	diffusion dynamique de la lumière “dynamic light scattering”
D_o	coefficient de diffusion
DSDH	D-sorbitol déshydrogénase
DTNB	5,5'-dithiobis(acide 2-nitrobenzoïque)
E	potentiel d'électrode
E°	potentiel standard d'un couple rédox
EDX	spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X “energy dispersive X-ray spectroscopy”
EQCM	microbalance à cristal de quartz électrochimique “electrochemical quartz cristal microbalance”
ET	électrode de travail
ER	électrode de référence
F	constante de Faraday (96 500 C.mol ⁻¹)
FAD	flavine adénine dinucléotide
Fc	ferrocène diméthanol
FDH	fructose déshydrogénase
FIB	sonde ionique focalisée “focused ion beam”
FMN	flavine mononucléotide

GDE	électrode à diffusion de gaz “ gaz diffusion electrode”
GDH	glucose déshydrogénase
GLDH	glutamate déshydrogénase
GOx	glucose oxydase
GPS	glycidoxypropyl-silane
GPTS	glycidoxypropyltriméthoxysilane
Hb	hémoglobine
hc	hexagonal compacte
I	intensité du courant électrique
ITO	oxyde d’indium-étain “ indium tin oxide”
κ	conductivité ionique spécifique
L	épaisseur de la couche de diffusion
LB	Langmuir Blodgett
LDH	lactate déshydrogénase
Med	médiateur
MEB	microscope à balayage électronique
n	nombre de charges mise en jeu par le réactif électroactif
n	nombre de mole
NAD ⁺ /NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP ⁺ /NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHE	électrode normale à hydrogène “normal hydrogen electrode”
ox	espèce oxydée d’un couple rédox
P	pression
Π	pression surfacique
PAA	polyacrylamide
PDDA	poly(diméthyldiallylammonium) chlorure
PDMS	poly(diméthylsiloxane)
PBG	bande photonique interdite “photonic band gap”
PED	peintures électrodéposées
PEG	poly(éthylène glycol)
PEI	poly(éthylèneimine)
PEMFC	“ polymer electrolyte membrane fuel cell”
PMMA	poly(methyl methacrylate)
POM	polyoxométhylène
PQQ	pyrroloquinoline quinone

PS	polystyrène
PTFE	poly(tetrafluoro éthylène)
PVA	poly(vinyl alcool)
Q	charge
R	constante des gaz parfaits ($8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
RA	rouge d'alizarine
<i>red</i>	espèce réduite d'un couple rédox
<i>R_{drop}</i>	résistance ohmique de l'électrolyte
SERS	spectroscopie Raman exaltée de surface "surface enhanced Raman spectroscopy"
T	température
Γ	taux de recouvrement
TDE	transfert direct d'électron
TEM	microscopie électronique en transmission "transmission electron microscopy"
TEOS	tetraéthoxysilane
TH	taux d'humidité
THF	tétrahydrofurane
TRIS	trishydroxyméthylaminométhane
ΔU	chute de potentiel entre deux électrodes
U	unité d'activité enzymatique (1 U correspond à la quantité d'enzyme consommant $1 \mu\text{mol.min}^{-1}$ de substrat)
V	volume

Introduction

Le recours à des procédés de chimie verte répond à une prise de conscience contemporaine suscitant une réelle volonté de limiter au maximum les impacts environnementaux induits par les activités de synthèse de produits chimiques. La proposition apportée par cette thèse pour répondre à ce besoin est de se servir d'un procédé de chimie vieux de plus de deux siècles, qu'est celui des réacteurs électrochimiques, et de l'optimiser grâce aux diverses avancées et expertises disponibles à ce jour, afin de garantir une production de molécules d'intérêt de façon propre et rentable. La construction du bioréacteur électrochimique constitue donc une alternative verte pour obtenir des produits chimiques à haute valeur ajoutée tels que les sucres rares et de composés chiraux en large excès énantiomérique.

La combinaison de différentes caractéristiques que présente le réacteur développé constitue une innovation dans le domaine des synthèses bio-électrochimiques. En effet, celui-ci fonctionne grâce à une alimentation en réactif assurée en continu par un flux réagissant à l'électrode de travail. Ensuite, la réaction électrochimique permettant de créer le produit est catalysée par un système biocatalytique qui nécessite une expertise d'immobilisation de chacun de ses éléments à la surface de l'électrode, afin d'assurer en partie la stabilité du dispositif. Enfin les contre-réactions sont produites dans une électrode à diffusion de gaz qui n'induit aucun produit secondaire. Or à ce jour, aucun dispositif ne conjugue ces différentes particularités.

L'électrode de travail est l'élément de la cellule qui se trouve au centre des travaux conduits dans cette thèse. Il s'agit d'une partie clef du réacteur car c'est à son interface que se déroulent les échanges électrochimiques responsables de la synthèse. Il apparaît donc primordial d'optimiser sa surface active afin de démultiplier l'intensité des phénomènes dont elle est le siège. Actuellement la création et le contrôle de la structuration d'interface font le sujet d'efforts de recherche considérables. Il existe à ce jour différentes techniques de pointes, permettant de créer des structures de matériaux parfaitement ordonnées destinées à des applications variées pouvant aller de l'optique à l'électronique organique sans oublier les applications électrochimiques comme les biocapteurs ou les biopiles à combustible. Dans ce contexte il apparaît intéressant de pouvoir maîtriser une méthode permettant d'obtenir de façon reproductible et parfaitement contrôlable de grandes surfaces de matériaux nanoporeux qui seront mis au service de l'élaboration des électrodes de travail pour les prototypes du réacteur pilote. Nous avons donc suivi une procédure de nano-structuration de l'or par électrodéposition du métal dans un template instauré par un cristal colloïdal qui est destiné par la suite à être éliminé afin de révéler la structure poreuse hautement ordonnée.

Le perfectionnement des dispositifs bio-électrochimiques actuels requiert la conception de matrices sophistiquées pour l'immobilisation des biomolécules à la surface des électrodes. Celles-ci doivent idéalement induire une intensification des réactions en jeu et l'amélioration de la stabilité des procédés. Nous avons dans cette thèse développé différentes matrices d'encapsulation des protéines redox, permettant non seulement la rétention de celles-ci à la surface de l'électrode de travail, mais aussi la préservation de leur activité. Par ailleurs, l'intérêt actuel porté à la connaissance et à la manipulation de nano-objets, concernant notamment leur synthèse et la maîtrise de leurs

propriétés, a permis d'optimiser les phénomènes prenant place dans les couches d'encapsulation dans lesquelles ils ont été incorporés. Ainsi les matrices ont été modifiées par l'insertion de nanoparticules conductrices, qui, suite à une fonctionnalisation de leur surface, ont pu contribuer de façon significative à la réaction de synthèse. Cette procédure originale de dopage de matériaux d'encapsulation avec des éléments capables d'interagir directement avec un système bio-catalytique complexe a permis d'assurer des performances satisfaisantes du réacteur.

Le manuscrit qui décrit ces résultats est divisé en huit chapitres.

Le premier chapitre permet d'établir un rappel sur les généralités concernant les réacteurs électrochimiques. Le second présente le bioréacteur et ses différents constituants en mettant l'accent sur le développement et l'étude de l'électrode de travail. Le troisième chapitre décrit les cristaux colloïdaux, leurs différentes techniques d'obtention ainsi que leurs diverses applications.

Dans le quatrième chapitre l'élaboration de l'électrode de travail est étudiée. Celle-ci doit présenter une structure nanoporeuse hautement organisée sur des surfaces de plusieurs dizaines de centimètre carré. L'étude de différents procédés d'élaboration du template, un cristal colloïdal de particules de polystyrène ou de silice, a été conduite sur de telles échelles. La méthode dite de Langmuir-Blodgett a révélé les meilleures performances pour produire un cristal de la taille requise, présentant une qualité satisfaisante de son organisation, ainsi qu'un contrôle parfait de son épaisseur.

Le cinquième chapitre est dédié aux expériences préliminaires concernant l'élaboration de la couche ultra-mince de silice encapsulant les biomolécules catalytiques à la surface de l'électrode. Tout d'abord, différentes caractéristiques du film, telles que son épaisseur, sa rugosité ainsi que sa perméabilité ont été optimisées afin d'assurer un dépôt homogène sur l'intégralité de la structure nanoporeuse de l'électrode. Ensuite l'encapsulation d'une sonde protéique rédox dans ces dépôts a permis de confirmer non seulement le maintien de l'activité de protéines rédox, malgré leur immobilisation, mais aussi l'intégration de ces films biocomposites dans l'ensemble de la structure des électrodes.

Le sixième chapitre concerne l'étude de l'encapsulation du système catalytique complet dans les films de silice ultra-minces. La création d'un environnement favorable pour les enzymes a été instaurée grâce à l'ajout d'additifs dans le film d'immobilisation. Nous avons également accordé une attention particulière à l'optimisation de la médiation entre électrode et biomolécules. Enfin le dopage des couches de silice réalisé par l'incorporation de nanoparticules d'or a permis d'exalter les phénomènes d'électrosynthèse.

Le septième chapitre est consacré à l'étude et à l'immobilisation du même système catalytique dans une matrice d'encapsulation faite à partir d'un polymère électrodéposé. Des démarches similaires d'optimisation de l'activité du système biocatalytique ont été poursuivies. De plus l'incorporation d'additifs et de particules a été à nouveau étudiée afin d'obtenir des performances catalytiques maximales.

Le dernier chapitre présente les résultats préliminaires obtenus suite à la mise en fonctionnement du réacteur. Les électrodes conçues grâce aux études précédentes sont donc testées dans les conditions

finales de l'application et ont montré des performances prometteuses, ouvrant ainsi des perspectives en vue du développement des bioréacteurs électrochimiques optimisés.

Chapitre 1

Réacteur et bioréacteur électrochimique

1 Réacteur et bioréacteur électrochimique

Un réacteur électrochimique est un dispositif qui permet la conversion d'énergie électrique en énergie chimique afin d'effectuer des transformations chimiques non-spontanées. Ce dispositif est constitué de deux électrodes : l'anode, pôle positif, où a lieu une réaction d'oxydation et la cathode, pôle négatif, où a lieu une réaction de réduction. Dans le schéma le plus classique, les électrodes sont planes et disposées parallèlement l'une à l'autre afin d'établir un champ électrique homogène. Le dispositif peut également être complété par la présence d'une électrode de référence si un potentiel précis aux électrodes doit être relevé. Dans le cas contraire la référence peut être prise à l'anode ou à la cathode, si on veut contrôler une réaction de réduction ou d'oxydation respectivement. Entre ces pôles se trouve le milieu réactionnel qui est à l'état statique ou dynamique. Le principe du réacteur électrochimique apparut très rapidement après la construction des premières batteries de Volta (1800). En effet les chimistes anglais Nicholson et Carlisle constatèrent que pour un tel dispositif, lorsque les extrémités des conducteurs électriques étaient immergées dans l'eau, il se produisait un dégagement gazeux provenant de la décomposition de celle-ci en dihydrogène et en dioxygène : la première électrolyse artificielle de l'eau a donc été effectuée au début du 19^{ème} siècle. Depuis, les procédés que les réacteurs électrochimiques sont capables de réaliser se sont largement diversifiés et suscitent un intérêt certain, notamment pour l'industrie, car ils permettent de produire [1,2], de séparer [3] ou d'éliminer une large gamme de produits chimiques [4,5].

Les procédés électrolytiques s'avèrent être des outils incontournables pour la production de métaux et de minéraux tels que l'aluminium [6] et le chlore [7]. Un réacteur électrochimique peut être également utilisé pour effectuer l'électrosynthèse des molécules organiques. BASF peut ainsi produire 3500 tonnes d'anisaldéhyde par un procédé d'oxydation anodique de 4-méthylanisol [8]. Actuellement la recherche met ce principe au service de synthèses plus spécifiques, telles que la production de dihydrogène pour l'alimentation des piles à combustibles [9-14] ou l'élaboration d'alliage à base de terres rares [15,16]. Il permet aussi la fabrication de nombreux produits chimiques à haute valeur ajoutée. Sans faire de liste exhaustive, on peut toutefois relever la diversité des réactions que ce type de dispositif peut effectuer : dégradation et électrolyse du glucose pour former des acides carboxyliques [17], réduction d'alcène [18], oxydation électrolytique d'alcools et d'aldéhydes [19,20], substitutions électrolytiques [21,22,23]. Le réacteur peut être le siège de réactions rédox plus complexes, qui permettent par exemple la formation de l'acide lactique à partir de l'acide acrylique par déshydratation, ainsi que de l'acide acétique et l'acétaldéhyde par décarboxylation du même réactif [24].

Les réactions qu'il est possible de réaliser dans un réacteur électrochimique peuvent également servir non pas à la production de substances chimiques mais à leur élimination. Les polluants qu'il est possible de cibler par ce type de procédé sont les nitrates [25,26] et le monoxyde d'azote [27,28], qui sont convertis en azote. Les métaux lourds peuvent aussi être éliminés par électrocoagulation [29,30]

ou par transformation en métal sulphides [31,32] qui précipitent et sont de fait facilement récupérables. Divers composés organiques [33,34,35,36], tels que des pesticides [35,37-40], des colorants [41,42] et des produits pharmaceutiques et cosmétiques [43,44] peuvent subir au sein de ses dispositifs électrochimiques des transformations chimiques nécessaires à les rendre inoffensifs ou plus aisément éliminables.

Les bioréacteurs électrochimiques font intervenir l'activité catalytique de molécules biologiques pour au moins une des réactions, anodique ou cathodique. Cette entité biologique est activée électrochimiquement, afin de pouvoir fournir l'énergie nécessaire à la réalisation de la réaction en jeu. Le plus généralement les enzymes assurent cette activité catalytique comme le lignine peroxydase envers la vaniline méthyl éther [45] ou la glucose oxydase envers l'acide L-ascorbique [46]. On trouve également des bio-réacteurs qui présentent une catalyse établie par l'hémoglobine envers les chlorpyrifos [47] ou des bactéries envers les nitrates [48,49]. Le principe de fonctionnement des bioréacteurs électrochimiques sera plus amplement décrit dans la partie 2.

Un réacteur électrochimique se présente le plus souvent sous la forme d'une cellule dans laquelle sont disposées les électrodes entre lesquelles se trouve le milieu réactionnel. Toutefois sa réalisation doit être minutieusement pensée car chaque élément de sa conception est susceptible d'influer sur son rendement. Par conséquent, le design de plusieurs constituants du dispositif doit répondre à une problématique d'amélioration de son efficacité, engendrant de cette manière un perfectionnement constant du procédé. Ainsi de nombreux travaux mettent en œuvre de nouvelles conceptions qui se concentrent sur les électrodes du réacteur. Plusieurs paramètres sont étudiés et optimisés, allant du choix des matériaux [50,51], à leur mise en forme, sans omettre leur disposition dans le réacteur et l'espace entre celles-ci [52-54]. La sélection du matériau est fondamentale : en effet, selon le type de réaction à effectuer, celui-ci doit présenter certaines caractéristiques. Par exemple, pour les procédés de dépollution, afin de s'affranchir d'éventuels phénomènes de combustion de l'électrode, une haute surtension de formation du dihydrogène est requis à la cathode ainsi qu'un haut surtension d'oxydation de l'eau à l'anode. Pour répondre à ces critères, les cathodes sont en majorité faites de carbone/PTFE, cuivre, fer ou acier. A l'anode, dans le cas des « procédés électrochimiques indirects » le platine, le fer sacrificiel et l'oxyde d'étain sont couramment utilisés. Pour ce qui est des procédés dits « directs », c'est-à-dire permettant la conversion directe en une étape du réactif en produit à la surface de l'électrode, le choix est plus complexe car le mécanisme réactionnel en jeu dépend directement des propriétés de l'électrode [5,55-57].

Pour les réacteurs utilisés en électrosynthèse, on retrouve généralement les mêmes matériaux tels que le platine, le dioxyde d'étain, le carbone vitreux, le graphite, le nickel, l'ITO à l'anode. La cathode peut être faite de platine, de plomb, d'acier inoxydable ou de carbone vitreux, afin d'également maximiser la surtension du dihydrogène pour permettre la plus grande fenêtre de potentiel possible [58]. A cet effet Comninellis *et al* ont élaboré une électrode dite DSA® par chauffage à induction et ont ainsi obtenu une fine couche conductrice et électrocatalytique stable d'oxyde d'iridium déposé sur une surface de titane. Celle-ci rend possible l'électro-oxydation d'une large gamme de composés

organiques, grâce à la grande réactivité générée par les états élevés d'oxydation de l'Ir(V) et l'Ir(VI) présents dans cette couche d'oxyde [59]. La même équipe a également élaboré des électrodes de diamant dopé au bore, afin de pouvoir éliminer l'acide acétique par électro-oxydation sans être perturbé par les réactions d'électrolyse de l'eau [60].

La distance inter-électrode est aussi un paramètre important à déterminer puisqu'il définit le volume relatif d'électrolyte par unité de surface de l'électrode. De plus, ce paramètre influence directement la chute ohmique dans l'électrolyte car celle-ci augmente avec la distance entre électrodes [61]. Les électrodes peuvent être insérées dans le réacteur sous forme de plaques disposées parallèlement l'une à l'autre [29]; toutefois, cette mise en forme connaît de nombreuses variantes. On rencontre très souvent des groupes de cellules électrochimiques connectées en série [62] et parfois en parallèle, plutôt qu'une cellule unique [61]. Ensuite on trouve des réacteurs qui présentent l'association de plusieurs électrodes pour un même dispositif : elles peuvent s'organiser par une alternance des pôles positifs et négatifs à l'horizontale [63] ou à la verticale [64].

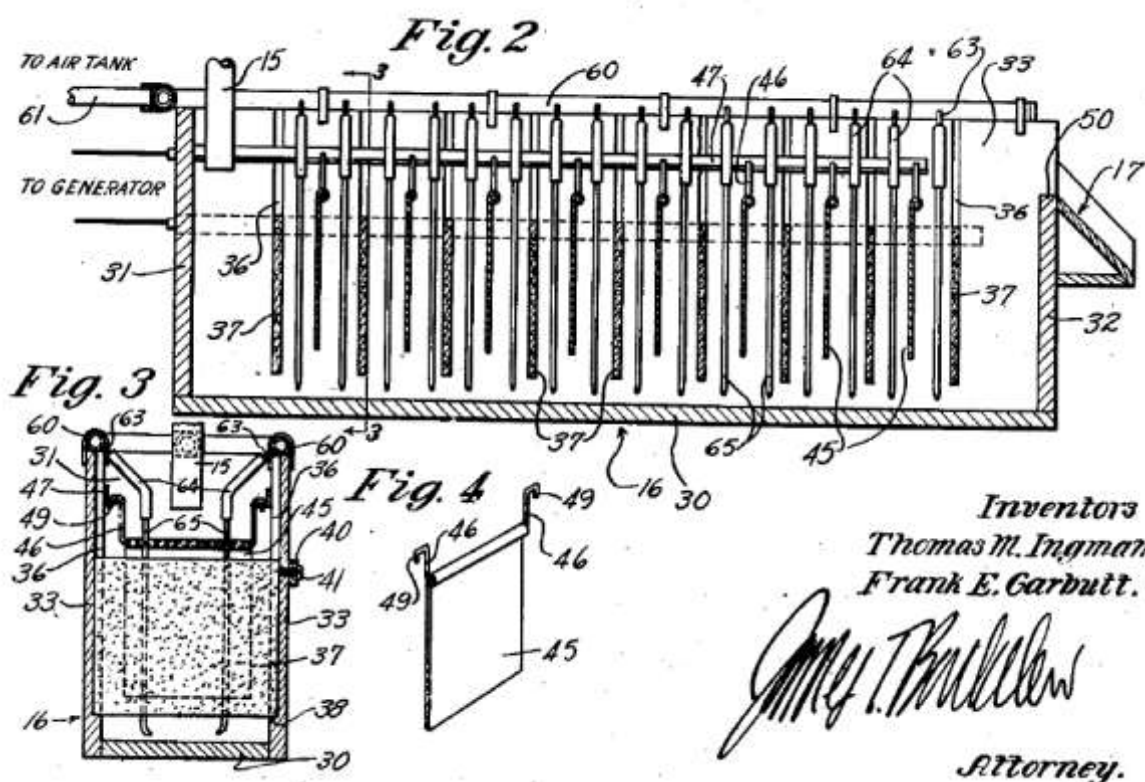


Figure 1 Dessin d'un réacteur électrochimique représentant la disposition en alternance des cathodes (numéro 65) et des anodes (numéro 37) dans la cellule électrochimique [65].

Ensuite, des conceptions différentes proposent par exemple des réacteurs avec des anodes et cathodes sous forme de grille [66] ou de cylindres, insérées l'une dans l'autre comme pour le réacteur proposé par Basha *et al* où l'anode est un tissu expansé recouvert d'une couche de Ti/TiO₂ et de IrO₂ mis sous forme cylindrique entouré d'un tube d'acier constituant la cathode [31].

Les électrodes peuvent être façonnées sous forme de disques comme cet empilement d'électrodes de titane proposé par Yuksel *et al* qui sert d'anode entourée d'une paroi cylindrique du même métal qui tient lieu de cathode pour une application d'élimination de l'acide lactique (Fig. 2) [24]. Hayashi *et al* ont élaboré un pré-réacteur électrochimique qui présente une mise en forme originale des électrodes: des micro-bâtonnets d'un matériau photorésistant recouverts d'un film d'or puis modifiés par un film polymère contenant à la fois le médiateur à base d'osmium et l'enzyme qui catalyse dans ce cas l'oxydation de l'acide ascorbique [46]. Cette mise en forme permet une augmentation du taux d'oxydation et réduit également la distance de diffusion.

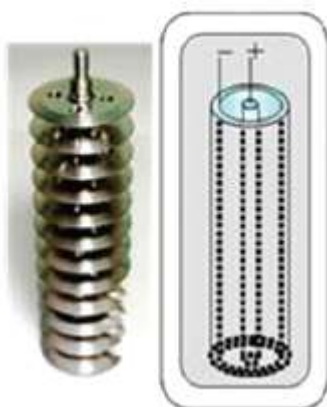


Figure 2 Cliché photographique de l'anode constituée d'électrodes empilées de titane (gauche), schéma des électrodes du réacteur de Yuksel *et al* (droite) [24]

La conception des réacteurs électrochimiques peut faire appel à des membranes séparatrices. Elles permettent la séparation mécanique des électrodes de différentes polarités, évitant ainsi tout contact entre elles et donc les risques de court-circuit [61]. Elles servent aussi à empêcher le mélange des produits formés à chaque électrode ou le mélange de l'anolyte et du catholyte. Ainsi leur utilisation est justifiée dans le cas de systèmes réactionnels où le taux de conversion et le rendement sont limités par l'occurrence d'une réaction de dégradation secondaire ou par la réversibilité de la réaction. Dans ce cas le recours à une membrane séparatrice combiné à l'élimination sélective et simultanée d'un ou plusieurs produits lors de la réaction, peut contrecarrer cette limitation et rétablir ainsi des taux et des rendements significatifs[67]. Enfin, cela peut également préserver les matériaux d'électrodes [61]. Pour répondre à ces fonctions, les membranes ne doivent pas présenter de résistance au flux ionique dans l'électrolyte et ne doivent pas interférer avec les transports de substances impliquées dans une des réactions aux électrodes [61]. Toutefois, lorsque cela est nécessaire, elles peuvent permettre la migration sélective d'un élément chimique d'un compartiment à l'autre afin d'établir une réaction souhaitée [68]. Dans le cas des bioréacteurs éliminant les nitrates des eaux usées à l'aide de bactéries, l'installation de membrane à l'intérieur du dispositif peut également servir à limiter la fuite des microorganismes vers l'extérieur du réacteur [48]. Dans le cas particulier des piles à combustible, la présence d'une membrane dite « échangeuse d'ion » permet

de contenir les gaz réagissant aux électrodes, à savoir le dihydrogène qui s'oxyde à l'anode et le dioxygène qui se réduit à la cathode, dans leur compartiment respectif afin de ne pas engendrer de disfonctionnement [69]. Une des membranes très couramment utilisées pour cette application est le Nafion®, un fluoropolymère-copolymère qui permet la circulation de protons et de cations uniquement, tout en étant imperméable aux gaz [70].

Le milieu réactionnel peut être de différentes natures : il peut s'agir d'un milieu aqueux contenant un électrolyte support [67], d'un solvant organique [71], d'un gaz [72], d'un liquide ionique [73,74], d'un fluide supercritique [73,75] ou du mélange de deux d'entre eux [76]. La mise en œuvre du milieu réactionnel est un paramètre déterminant du procédé : il peut être soit à l'état statique et sera alors régulièrement prélevé puis remplacé ; soit à l'état dynamique grâce à une agitation [4], une électrode en mouvement [52] ou un flux circulant en continu dans le réacteur [77]. Travailler sous flux signifie une régénération du milieu réactionnel en permanence par l'évacuation continue des produits et des impuretés. De ce fait, le contenu de la couche de diffusion de chaque électrode est aussi constamment renouvelé. De plus, un milieu réactionnel en mouvement permet une meilleure distribution du transport de masse, des échanges rapides de chaleur, un meilleur contrôle de la température et une uniformité de la densité de courant [78]. Le design du réacteur peut éventuellement être modifié afin d'intensifier les effets du flux sur l'efficacité du dispositif. En effet, si on fait circuler le flux dans un réacteur cylindrique, entre une électrode tubulaire et une électrode cylindrique incérée dans la première, le mouvement tangentiel du flux augmentera la « vitesse » de surface sans avoir recours à des flux de masse trop importants [79].

Actuellement, la recherche relative à la conception des réacteurs électrochimiques répond à une demande de miniaturisation afin d'améliorer par ces changements d'échelle leurs performances. Les critères que doit respecter cette nouvelle génération de réacteurs microstructurés sont similaires à ceux précédemment recherchés : atteindre le plus important taux de conversion, donc un meilleur rendement, une meilleure sélectivité et des temps de séjour dans la cellule électrochimique, plus courts. Ceci apparaît possible dans le cadre de ces microcellules car on obtient plus facilement une distribution uniforme du transport de masse, des échanges de chaleur rapides, un contrôle plus efficace de la température, une distribution des densités de courant uniforme et un contrôle du courant très efficace [78]. De plus on constate qu'avec des réacteurs de telle dimension il est possible de diminuer la concentration des sels électrolytiques. En effet si l'on considère la loi d'Ohm [58]:

$$\Delta U = I(R_{drop} + \frac{d}{\kappa A})$$

où ΔU est la chute de potentiel entre les électrodes, I le courant, R_{drop} , la résistance ohmique de l'électrolyte, A l'aire de l'électrode (m^2), d la distance entre électrodes (m), κ la conductivité ionique spécifique ($S.m^{-1}$) et i la densité de courant ($A.m^{-2}$), il apparaît de façon évidente que si la distance entre électrodes est réduite, par exemple d'un facteur 400, la conductivité de l'électrolyte peut être réduite de façon similaire par un même facteur 400 pour des distributions de courant similaires. C'est

pourquoi les micro-réacteurs présentent des espaces inter-électrode de l'ordre du micromètre [46], contrairement aux réacteurs qui présentaient des dimensions de l'ordre du centimètre [31].

Les dimensions de tels dispositifs ouvrent la voie à de nouvelles recherches, notamment dans l'élaboration de réacteurs qui opèrent avec des liquides ioniques. On sait que l'utilisation de l'eau en tant que milieu réactionnel est relativement limitée, pour les électrosynthèses organiques notamment. En effet, peu de produits organiques sont solubles dans l'eau et la fenêtre de potentiel dans laquelle il est possible de travailler sans effectuer la décomposition anodique ou cathodique de l'eau est relativement restreinte, ce qui cause souvent des réactions de solvolysse ou de décomposition des substances organiques [80]. C'est pourquoi le recours à des liquides ioniques offre de nouvelles opportunités dans ce domaine d'application [81]. Toutefois la faible conductivité de tels solvants requiert la diminution de l'espace entre les électrodes, ce qui justifie dans ce cas la conception de microréacteurs.

Un travail pionnier concernant le développement d'un réacteur électrochimique à microflux fut effectué par Beck et Guthke [82] dans les années soixante avec la construction d'une cellule capillaire constituée d'un empilement de disques d'électrode de carbone vitreux pour la production d'anisaldéhyde (Figure 3). La distance entre les électrodes pouvait aller de 1 mm à 200 μm . Ce type de cellule est également utilisée pour d'autres réactions d'électrosynthèse présentant des choix variés de réactions qui s'opèrent simultanément à l'anode et la cathode [83].

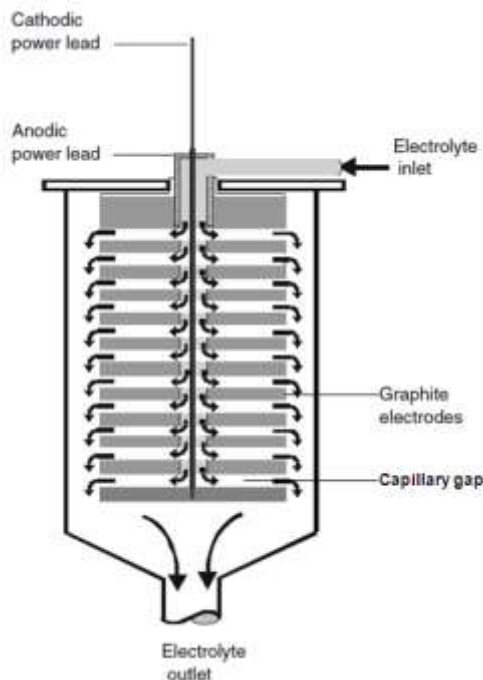


Figure 3 Vue schématique d'une cellule électrochimique

Aujourd'hui, les nombreuses avancées effectuées dans le domaine de la micro-fluidique permettent non seulement l'élaboration des différents constituants miniaturisés, mais également la maîtrise des différents paramètres caractéristiques des réacteurs même à cette échelle [84, 85]. L'intérêt des micro-

réacteurs électrochimiques réside dans les avantages supplémentaires qu'induit leur dimension. En effet, les faibles valeurs de temps de résidence et des hautes valeurs de flux minimisent le temps de séjour des réactifs, ce qui diminue l'occurrence des réactions secondaires et donc améliore le rendement. La coalescence et la croissance de bulles de gaz aux électrodes pour des réacteurs ayant une distance inter-électrodes inférieure à 50 μm sont complètement inhibées. Dans ce cas l'électrolyte ne devient pas hétérogène (liquide/gaz) et ceci n'engendre pas de diminution de la conductivité aux électrodes, donc pas de plus grande résistance ni de tension supérieure à appliquer à la cellule. Par conséquent les pertes par effet Joule sont minimisées [58]. Cependant les micro-réacteurs présentent certains inconvénients : d'abord si les zones de diffusion sont couplées et non séparées cela va engendrer la formation de produits secondaires. Ensuite les exemples de micro-réacteurs qui opèrent avec des concentrations équivalentes à celles trouvées en industrie sont relativement rares. Par conséquent, la plupart des recherches effectuées dans ce domaine ont été produites dans des conditions non-pertinentes pour l'industrie. C'est pourquoi le réacteur réalisé dans ce projet, visant à produire certaines molécules suivant des rendements industriels, ne fait pas partie de cette catégorie de réacteur. Le dispositif mis au point et étudié lors de la thèse a directement été réalisé à l'échelle d'un pilote industriel, c'est-à-dire ses dimensions sont de l'ordre du centimètre. La description du dispositif est détaillée dans le chapitre suivant.

Références Bibliographiques

- (1) Montiel, V.; Sáez, A.; Expósito, E.; García-García, V.; Aldaz, A. *Electrochemistry Communications*, **2010**, 12, 118.
- (2) Attour, A.; Dirrenberger, P.; Rode, S.; Ziogas, A.; Matlosz, M.; Lopicque, F. *Chemical Engineering Science*, **2011**, 66, 480.
- (3) Khan, J.; Tripathi, B. P.; Saxena, A.; Shahi, V. K. *Electrochimica Acta* **2007**, 52, 6719.
- (4) Szpyrkowicz, L.; H. Kelsall, G.; N. Kaul, S.; De Faveri, M. *Chemical Engineering Science* **2001**, 56, 1579.
- (5) De Francesco, M.; Costamagna, P. *Journal of Cleaner Production* **2004**, 12, 159.
- (6) Pusey, P.N.; van Megen, W.; *Nature* **1896**, 53, 380.
- (7) S, M. *Nature* **1903**, 68, 285.
- (8) Ohno, H. *Wiley* **2005**, New York, 978.
- (9) Xu, J.; Miao, R.; Zhao, T.; Wu, J.; Wang, X. *Electrochemistry Communications*, **2011**, 13, 437.
- (10) Chae, S. Y.; Yadav, J. B.; Kim, K. J.; Joo, O. S. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**, 3347.
- (11) King, R. L.; Botte, G. G. *Journal of Power Sources*, **2011**, 196, 2773.
- (12) Balashov, V. N.; Schatz, R. S.; Chalkova, E.; Akinfiev, N. N.; Fedkin, M. V.; Lvov, S. N. *Journal of the Electrochemical Society*, **2011**, 158, B266.
- (13) Iwahara, H.; Esaka, T.; Uchida, H.; Maeda, N. *Solid State Ionics* **1981**, 3-4, 359.
- (14) Rozendal, R. A.; Hamelers, H. V. M.; Euverink, G. J. W.; Metz, S. J.; Buisman, C. J. N. *International Journal of Hydrogen Energy* **2006**, 31, 1632.
- (15) Tang, D.; Zhao, M. *Yu Se Chin Shu/Nonferrous Metals* **1986**, 38, 57.
- (16) Guo, R.; Zhai, X. J.; Zhang, T. A. In *Materials Science Forum*; **2011**, 675 677, 1125.
- (17) Sasaki, M.; Oshikawa, T.; Watanabe, H.; Wahyudiono; Goto, M. *Research on Chemical Intermediates*, **2011**, 37, 457.
- (18) Horii, D.; Atobe, M.; Fuchigami, T.; Marken, F. *Journal of the Electrochemical Society* **2006**, 153, D143.
- (19) Liang, C.; Franklin, T. C. *Electrochimica Acta* **1964**, 9, 517.
- (20) Amemiya, F.; Horii, D.; Fuchigami, T.; Atobe, M. *Journal of the Electrochemical Society* **2008**, 155, E162.
- (21) Eberson, L.; Nyberg, K. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, 88, 1686.
- (22) Eberson, L.; Nyberg, K. *Tetrahedron Letters* **1966**, 7, 2389.
- (23) Eberson, L. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89, 4669.
- (24) Yuksel, A.; Sasaki, M.; Goto, M. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **2011**, 50, 728.

- (25) Li, H. L.; Chambers, J. Q.; Hobbs, D. T. *Journal of Applied Electrochemistry* **1988**, *18*, 454.
- (26) Paidar, M.; Rousar, I.; Bouzek, K. *Journal of Applied Electrochemistry* **1999**, *29*, 611.
- (27) Thagard, S. M.; Kinoshita, Y.; Ikeda, H.; Takashima, K.; Katsura, S.; Mizuno, A. *IEEE Transactions on Industry Applications* **2010**, *46*, 2165.
- (28) Bredikhin, S.; Hamamoto, K.; Fujishiro, Y.; Awano, M. *Ionics* **2009**, *15*, 285.
- (29) Mollah, M. Y. A.; Schennach, R.; Parga, J. R.; Cocke, D. L. *Journal of Hazardous Materials* **2001**, *84*, 29.
- (30) Escobar, C.; Soto-Salazar, C.; Inés Toral, M. *Journal of Environmental Management* **2006**, *81*, 384.
- (31) Ahmed Basha, C.; Bhadrinarayana, N. S.; Anantharaman, N.; Meera Sheriffa Begum, K. M. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *152*, 71.
- (32) Ottewill, G. A.; Reade, G. W.; Campbell, S. A.; Ponce De Leon, C.; Walsh, F. C. *Journal of Environmental Monitoring* **2005**, *7*, 943.
- (33) Comninellis, C. *Electrochimica Acta* **1994**, *39*, 1857.
- (34) Comninellis, C.; Pulgarin, C. *Journal of Applied Electrochemistry* **1991**, *21*, 703.
- (35) Brillas, E.; Mur, E.; Sauleda, R.; Sánchez, L.; Peral, J.; Domènech, X.; Casado, J. *Applied Catalysis B: Environmental* **1998**, *16*, 31.
- (36) Laine, D. F.; Cheng, I. F. *Microchemical Journal* **2007**, *85*, 183.
- (37) Özcan, A.; Sahin, Y.; Koparal, A. S.; Oturan, M. A. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *153*, 718.
- (38) Oturan, N.; Trajkovska, S.; Oturan, M. A.; Couderchet, M.; Aaron, J. J. *Chemosphere* **2008**, *73*, 1550.
- (39) Pratap, K.; Lemley, A. T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, *42*, 209.
- (40) Brillas, E.; Boye, B.; Àngel Baños, M.; Calpe, J. C.; Garrido, J. A. *Chemosphere* **2003**, *51*, 227.
- (41) Harrington, T.; Pletcher, D. *Journal of the Electrochemical Society* **1999**, *146*, 2983.
- (42) Shen, Z.; Yang, J.; Hu, X.; Lei, Y.; Ji, X.; Jia, J.; Wang, W. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39*, 1819.
- (43) Skoumal, M.; Arias, C.; Cabot, P. L.; Centellas, F.; Garrido, J. A.; Rodríguez, R. M.; Brillas, E. *Chemosphere* **2008**, *71*, 1718.
- (44) Sirés, I.; Centellas, F.; Garrido, J. A.; Rodríguez, R. M.; Arias, C.; Cabot, P. L.; Brillas, E. *Applied Catalysis B: Environmental* **2007**, *72*, 373.
- (45) Lee, K.; Pi, K.; Lee, K. M. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2009**, *25*, 1691.
- (46) Hayashi, K.; Kurita, R.; Horiuchi, T.; Niwa, O. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 333.
- (47) Tang, T.; Dong, J.; Ai, S.; Qiu, Y.; Han, R. *Journal of Hazardous Materials*, **2011**, *188*, 92.
- (48) Ghafari, S.; Hasan, M.; Aroua, M. K. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 3965.
- (49) Watanabe, T.; Motoyama, H.; Kuroda, M. *Water Research* **2001**, *35*, 4102.

- (50) Matsunaga, T.; Okochi, M.; Takahashi, M.; Nakayama, T.; Wake, H.; Nakamura, N. *Water Research* **2000**, *34*, 3117.
- (51) Ghernaout, D.; Naceur, M. W.; Aouabed, A. *Desalination*, **2011**, *270*, 9.
- (52) Rodríguez R, M. G.; Mendoza, V.; Puebla, H.; Martínez D, S. A. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *163*, 1221.
- (53) Szpyrkowicz, L.; Juzzolino, C.; Daniele, S.; Faveri, M. D. D. *Catalysis Today* **2001**, *66*, 519.
- (54) Sun, Y. P.; Qiu, O.; Xu, W. L.; Scott, K. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *503*, 36.
- (55) Oduoza, C. F.; Scott, K. In *Institution of Chemical Engineers Symposium Series*; 127 ed.; Publ by Inst of Chemical Engineers: Loughborough, Engl, 1992, p 37.
- (56) Scialdone, O. *Electrochimica Acta* **2009**, *54*, 6140.
- (57) Couper, A. M.; Pletcher, D.; Walsh, F. C. *Chemical Reviews* **1990**, *90*, 837.
- (58) Ziogas, A.; Kolb, G.; O'Connell, M.; Attour, A.; Lapicque, F.; Matlosz, M.; Rode, S. *Journal of Applied Electrochemistry* **2009**, *39*, 2297.
- (59) Mousty, C.; Fòti, G.; Comninellis, C.; Reid, V. *Electrochimica Acta* **1999**, *45*, 451.
- (60) Kapalka, A.; Lanova, B.; Baltruschat, H.; Fòti, G.; Comninellis, C. *Electrochemistry Communications* **2008**, *10*, 1215.
- (61) Bagotsky, V. S. *Fundamentals of Electrochemistry*; Wiley Interscience, 2006.
- (62) Walsh, F. C.; Trinidad, P.; Gilroy, D. *International Journal of Engineering Education* **2005**, *21*, 981.
- (63) El-Shazly, A. H. *Desalination and Water Treatment*, **2011**, *25*, 31.
- (64) Garbutt, F.E.; Ingman, T.M.; US Patent. **1932**, US1866701
- (65) Garbutt, F. E.; Ingman, T. M.; Compagny, E. K., Ed. United States, 1932; Vol. US1866701.
- (66) Tran, L. H.; Drogui, P.; Mercier, G.; Blais, J. F. *Journal of Environmental Engineering* **2009**, *135*, 1051.
- (67) Scott, K. *Journal of Membrane Science* **1994**, *90*, 161.
- (68) Miyoshi, K.; Alfara, C. G.; Matsumura, M. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *568*, 293.
- (69) Smitha, B.; Sridhar, S.; Khan, A. A. *Journal of Membrane Science* **2005**, *259*, 10.
- (70) Délécouls-Servat, K.; Basséguy, R.; Bergel, A. *Chemical Engineering Science* **2002**, *57*, 4633.
- (71) Wagner, M.; Kvarnström, C.; Ivaska, A. *Electrochimica Acta*, **2010**, *55*, 2527.
- (72) Tezcan Ü, Ü.; Koparal, A. S.; Bakir Ögütveren, Ü. *Journal of Environmental Engineering* **2007**, *133*, 13.
- (73) Yoshida, J. I. *Electrochemical Society Interface* **2009**, *18*, 40.
- (74) Österholm, A.; Kvarnström, C.; Ivaska, A. *Electrochimica Acta*, **2011**, *56*, 1490.
- (75) Giovanelli, D.; Lawrence, N. S.; Compton, R. G. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 789.

- (76) Ngamsom, B.; Hickey, A. M.; Greenway, G. M.; Littlechild, J. A.; McCreedy, T.; Watts, P.; Wiles, C. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2010**, 8, 2419.
- (77) Moraes, P. B.; Bertazzoli, R. *Chemosphere* **2005**, 58, 41.
- (78) Houghton, R. W.; Kuhn, A. T. *Journal of Applied Electrochemistry* **1973**, 4, 173.
- (79) Reason, A. United States Patent, 1893; 496063.
- (80) Hammann, C.; Hamnett, A.; Vielstich, W. *Electrochemistry* **1998**, Wiley-VCH, Weinheim.
- (81) Ohno, H. *Electrochemical aspect of ionics liquids*. Wiley, new York **2005**, ISBN:978-0-471-64851-2.
- (82) Beck, F.; Guthke, H. *Entwicklung Neuer Zellen Fuer Elektro-Organische Synthesen* **1969**, 41, 943.
- (83) Pütter, H. *Industrial electroorganic chemistry* **2001**, 4th edn. Marcel Dekker, New York.
- (84) He, P.; Watts, P.; Marken, F.; Haswell, S. J. *Angewandte Chemie - International Edition* **2006**, 45, 4146.
- (85) Küpper, M.; Hessel, V.; Löwe, H.; Stark, W.; Kinkel, J.; Michel, M.; Schmidt-Traub, H. *Electrochimica Acta* **2003**, 48, 2889.

Chapitre 2

Conception d'un bioréacteur électrochimique

2 Conception d'un bioréacteur électrochimique

2.1 Pour une production verte de composés chiraux et de sucres rares

L'objectif principal du projet dans lequel s'inscrit ce travail de thèse est de développer un réacteur électrochimique pour la production de substances chimiques à haute valeur ajoutée grâce à l'utilisation de biocatalyseurs que sont les enzymes. Le but est de concevoir et de rendre industriellement viable ce type de procédé bioélectrochimique, qui propose une voie de production alternative « verte » puisqu'entre autres, il ne génère pratiquement aucun déchet et n'opère pas dans un milieu organique polluant mais en milieu aqueux. Une complète conversion du substrat sans produit intermédiaire à purifier est également un des avantages que propose ce dispositif.

Le réacteur, développé dans le cadre du projet européen ERUDES, est constitué d'une contre-électrode et d'une électrode de travail (Fig.4). La réalisation et l'optimisation de cette dernière sont les enjeux principaux de cette étude. Le dispositif électrochimique dont il est ici question est constamment alimenté par un flux contenant le réactif de départ, qui, en réagissant à l'électrode de travail produira la substance désirée qui sera par la suite collectée dans le flux sortant. La mise en marche sous flux du réacteur permet également l'élimination en continu des éventuels produits secondaires qui peuvent être des inhibiteurs de la réaction.

2.1.1 Principe du bioréacteur électrochimique

L'électrode de travail effectue les transformations chimiques nécessaires à la synthèse du substrat par des réactions d'oxydoréduction. Ce type de réaction est le moteur d'une grande partie de la biochimie et se trouve très souvent catalysé par des déshydrogénases et des oxydo-réductases [1,2]. Ces réactions bioélectrochimiques opèrent dans des conditions physiologiques (milieu tampon, 37°C, pH=7,32⇒7,42) afin de concevoir par exemple des biocapteurs, qui permettent d'établir la transduction d'un message biochimique en un signal électrique [3,4], ou des biopiles à combustibles qui convertissent cette énergie biochimique en une énergie électrique [5]. Pour les réacteurs électrochimiques il s'agit d'exploiter la charge fournie par l'électrode pour la convertir en réaction électrochimique afin de réaliser la transformation chimique recherchée[6]. Dans le cas étudié ici, cette transformation s'établit par l'intermédiaire d'un médiateur, d'un cofacteur et d'une enzyme qui constituent la chaîne électrocatalytique immobilisée à la surface de l'électrode de travail.

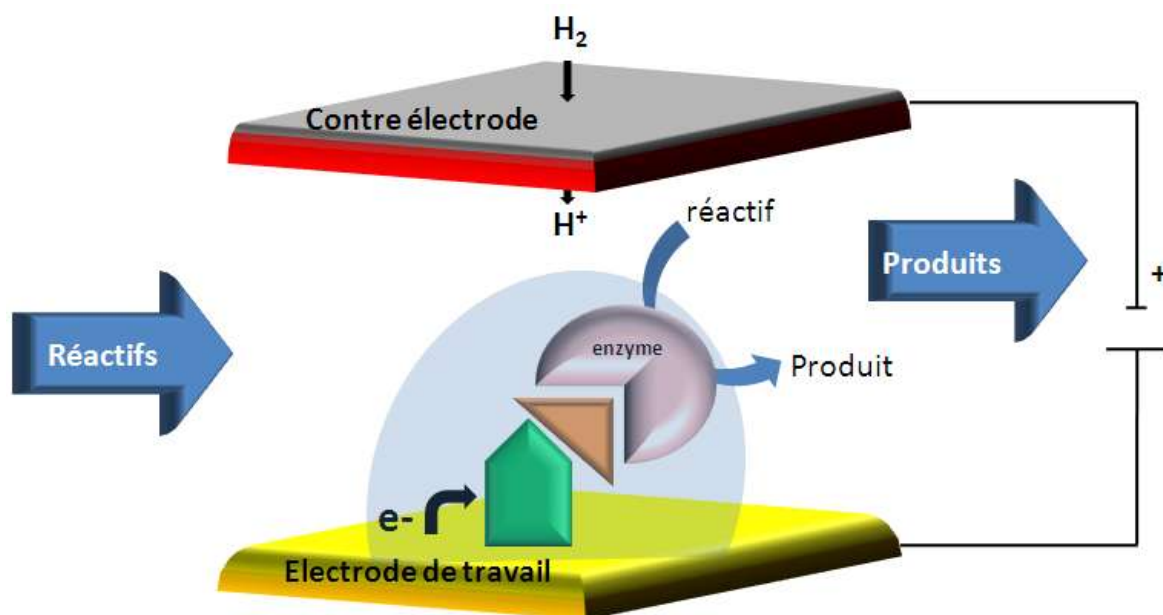


Figure 4 Schéma du bioréacteur électrochimique constitué d'une contre électrode délivrant un flux de protons, et d'une électrode de travail où tous les composés actifs sont immobilisés afin de réaliser la synthèse de composés énantiopurs ou de sucres rares

2.1.2 Objectifs

L'objectif que le projet vise à atteindre est de produire, avec un rendement cohérent pour une application industrielle, soit des substances chirales en large excès énantiomérique, par la réduction de cétones prochirales en alcools, soit des sucres rares, par l'oxydation régiosélective d'alcools en cétones. Ces deux catégories de produits représentent un intérêt certain pour l'industrie.

Les molécules chirales sont des composés chimiques non-superposables à leur image dans un miroir. Les deux formes de la molécule chirale sont appelées énantiomères. Leur découverte par Louis Pasteur en 1848 a ouvert la voie à ce qui est appelé aujourd'hui la stéréochimie [7]. La chiralité est devenue l'un des thèmes les plus importants en Sciences et joue un rôle fondamental dans beaucoup de domaines interdisciplinaires de la recherche actuelle comprenant la chimie médicinale, supramoléculaire et environnementale. De nombreuses substances pharmaceutiques et agro-alimentaires, des parfums, des nutriments sont chiraux et leurs énantiomères présentent en général des activités biologiques et pharmaceutiques différentes, voir antagonistes (Fig. 5). Cela s'explique par le fait que les systèmes biologiques sont eux-mêmes énantiopurs et interagissent différemment avec les énantiomères possédant un centre chiral externe. Il est donc crucial dans l'industrie chimique, agro-alimentaire, cosmétique et plus particulièrement dans l'industrie pharmaceutique de pouvoir efficacement séparer les deux composés afin d'avoir accès à des produits purs. Le scandale de la thalidomide, qui a secoué l'industrie pharmaceutique dans les années 60, illustre l'importance de contrôler les deux espèces énantiomériques d'un composé chiral. En effet ce composé possède

deux énantiomères dont l'un possède des propriétés sédatrice et anti-nauséuse et l'autre présente des effets tératogènes, c'est-à-dire pouvant provoquer un développement anormal de l'embryon. Toutefois dans cet exemple, une mauvaise séparation des deux énantiomères n'est pas la cause des « effets secondaires », car lorsqu'ils se trouvent « in vivo », ils peuvent se convertir l'un en l'autre. D'autres molécules telles que l'ethambutol dont l'énantiomère S-S est un médicament anti-tuberculeux alors que la forme R-R rend aveugle, prouvent de la même façon le danger de ne pas pouvoir disposer de substances chirales optiquement pures. On note que près de 2/3 des molécules biologiquement actives chirales issues de synthèse classique, c'est-à-dire non-énantiosélective, proviennent de la séparation des énantiomères, qui représente l'une des principales voies d'accès aux composés énantiomériquement purs. En 2000, les ventes mondiales de composés énantiopurs ont atteint environ 85 millions d'euros. Par ailleurs la purification de substances chirales engendre un coût de fabrication supplémentaire non négligeable [8]. Par exemple chez « Crawford scientific », purifier par HPLC les deux espèces énantiomériques d'un composé chiral coûte environs 5700 euros pour l'obtention de 10 à 100 mg de produit. On comprend alors aisément l'enjeu de mettre en place des procédés alternatifs donnant accès à l'univers chiral, jusqu'à très récemment propriété de la nature uniquement. Par conséquent la voie électroenzymatique permettant une synthèse stéréospécifique, comme proposé par le dispositif ici étudié, se justifie.

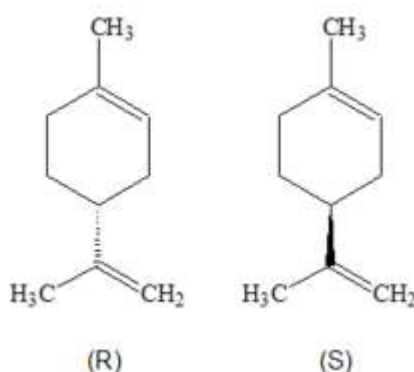


Figure 5 Exemple de molécule chirale, le limonène: l'énantiomère R dégage une odeur d'agrumes, alors que l'énantiomère S sent la térébenthine.

Les sucres rares sont définis comme étant les monosaccharides et leurs dérivés rarement présents à l'état naturel. Il en existe plus de 50 types différents recensés à ce jour. Ceux-ci présentent des propriétés d'un intérêt certain puisque ces substances appartiennent à la famille des monomères des glucides. Etant donné que les monosaccharides sont à la base du glycome, c'est-à-dire l'effectif total en sucres d'une cellule ou d'un organisme nécessaire à son fonctionnement, on comprend alors aisément l'utilité que présentent la synthèse de ces sucres et la recherche autour de leur impact potentiel. Diverses études ont d'ores et déjà révélé certaines fonctionnalités intéressantes des sucres rares comme par exemple l'effet dynamogène qu'opère le D-allose sur l'agent antitumoral 5-fluorouracile agissant sur les hépatocytes cancéreux [9], ou la L-tallose qui sert d'inhibiteur pour la croissance des cellules leucémiques L1210 in vivo [10]. Les potentielles applications de ces composés

chimiques s'étendent aussi à l'industrie agro-alimentaire avec notamment le D-tagatose qui peut servir d'édulcorant à faible valeur calorique [11,12] et à l'industrie des insecticides avec la D-sorbose [13]. Il existe différentes voies de synthèses organiques pour obtenir certains de ces produits tels que les L-cymarose, L-sarmentose, L-diginose et L-oleandrose [14-18]. La méthode la plus connue est la méthode Izumoring dont la stratégie visée est de produire tous les sucres rares à partir du produit de départ peu onéreux qu'est le D-glucose [19]. Les sucres rares peuvent également être obtenus par voie purement enzymatique [20-23]. Toutefois la faible capacité de production de cette catégorie de sucres engendre des coûts élevés à l'achat, ce qui rend difficile l'accès à ces produits pour que la recherche avance de façon rapide et globale et puisse alors explorer l'étendue de leurs propriétés. Les sucres rares produits par la méthode d'Izumoring ont permis d'amorcer les voies d'exploration des fonctions physiologiques qu'elles peuvent révéler. La voie électro-enzymatique appliquée à un réacteur répondant à des critères industriels de productivité propose une alternative verte qui gagne donc à être explorée, d'autant plus si elle permet aussi de produire une substance à haute valeur ajoutée à partir de réactifs de départ bon marché.

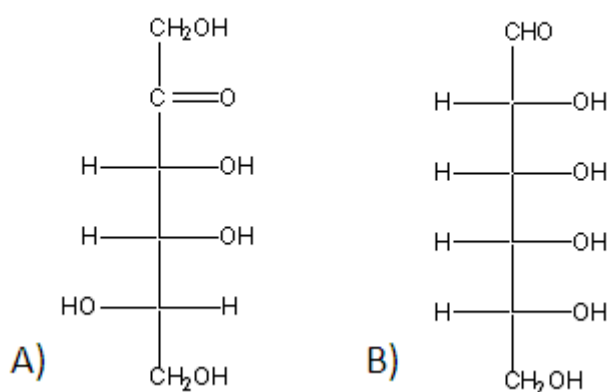


Figure 6 Formule des sucres rares A) L-tagatose, B) D-allose

Le projet de réalisation du réacteur s'accorde avec les principes contemporains et nécessaires de développement durable. C'est pourquoi la production des substances ci-dessus mentionnées doit s'effectuer suivant un procédé qui occasionne le minimum d'impacts environnementaux. Le cahier des charges du projet a défini au préalable un certain nombre de pré-requis qui assurent le respect de plusieurs paramètres à intégrer afin d'inscrire cette réalisation dans le dynamisme du développement de la chimie verte, c'est-à-dire ne faisant pas usage ou évitant la génération de substances néfastes pour l'environnement. Ainsi le choix d'élaborer un réacteur qui fonctionne suivant un procédé stéréosélectif ne générant pratiquement aucun déchet permet d'éviter des étapes de purification, coûteuses en produits supplémentaires, en dispositifs et en énergie, ainsi que d'avoir à répondre à une problématique de recyclage ou de destruction écologique des produits secondaires. L'absence de solvants organiques qui nécessiteraient un recyclage, un schéma de

synthèse simplifié en une étape unique sont autant de jalons à respecter pour élaborer un réacteur qui satisfait aux exigences d'une chimie responsable.

2.2 Electrode de travail à structure poreuse : principes et applications

La réaction qui aboutit à la création du composé pour le réacteur a lieu sur l'électrode dite de travail. La conception de celle-ci a pour but d'améliorer le procédé électrochimique dont elle est le siège. Il faut donc optimiser sa structure, définir les différents composés électrochimiques avec lesquels elle va interagir et enfin assurer et préserver une activité maximale des enzymes qui seront immobilisées et activées à sa surface. Ces travaux visent à établir un dispositif électro-catalytique modèle, fonctionnant de façon optimisée grâce à l'étude approfondie des divers mécanismes qui le régissent, afin d'améliorer son activité autant au niveau de chacun de ses principes de fonctionnement que dans son ensemble.

Un des premiers enjeux du projet est de concevoir le plus judicieusement possible l'interface entre électrode et milieu réactionnel. L'intérêt de maîtriser le design de tels systèmes est au cœur de nombreuses études depuis ces dix dernières années [24-26]. La maîtrise et le contrôle de l'organisation d'une interface de l'échelle moléculaire à l'échelle micrométrique doivent être habilement orchestrés afin d'une part de comprendre comment les différents aspects et caractéristiques du dispositif gouvernent ses performances et d'autre part en optimiser les paramètres pour un fonctionnement optimal. Les travaux sur la nanostructuration des électrodes [27-29], sur les phénomènes d'auto-assemblage moléculaire [30], de création de liaisons faibles intermoléculaires [30], de synthèse et de manipulation de nano composants [31] sont des exemples de connaissance et de savoir-faire qui peuvent autant être mis au service de l'élaboration d'un réacteur électrochimique performant que pour d'autres applications actuelles, allant de la conservation de l'énergie [32,33] au développement de dispositifs biomédicaux [34,35]. La stratégie explorée dans ce travail est d'incorporer des éléments structuraux nanométriques dans des édifices microscopiques complexes, afin d'exalter les échanges entre biomolécules, milieux réactionnel et électrodes.

Tout d'abord, on doit concevoir l'interface mise à disposition par l'électrode de travail afin de disposer du maximum de superficie disponible dans le but d'en obtenir la plus grande aire de surface active, définie comme étant l'aire en contact direct avec le milieu réactionnel. Le taux de conversion électrochimique est déterminé, dans un premier temps, par cette aire qui constitue donc un élément clef de la compétitivité du système. Elle doit par conséquent être maximisée et ceci peut s'obtenir par l'introduction d'une rugosité ou d'une porosité dans sa structure. Il est crucial de maîtriser de façon précise l'augmentation de cette surface afin de pouvoir judicieusement l'adapter au système bioélectrochimique responsable de la synthèse qui sera immobilisé à la surface de l'électrode de travail du réacteur.

La nano- et la méso-structuration des surfaces d'électrode ont d'ores et déjà prouvé être des méthodes fructueuses pour augmenter les performances des dispositifs électrochimiques. Outre l'augmentation de l'aire de la surface active par rapport à l'aire de la surface géométrique, elles améliorent l'accessibilité moléculaire et le transport de masse qui se produit par diffusion, et enfin elles fournissent des espaces de confinement pour accueillir des réactifs.

Avant de décrire les différents procédés et méthodes qui existent pour obtenir des électrodes poreuses, il est nécessaire de faire une distinction entre les différents termes permettant la classification des porosités sur une échelle de longueur. Selon l'IUPAC, les matériaux poreux sont classés suivant trois catégories basées sur la taille moyenne de leur pore : les matériaux microporeux présentent des pores dont le diamètre est inférieur à 2 nm, les mésoporeux ont des diamètres de pores entre 2 et 50 nm et enfin les macroporeux disposent de pores de diamètres supérieurs à 50 nm. Trouver la taille de pore appropriée à l'application pour laquelle est destinée l'électrode est une étape non-négligeable dans la conception des dispositifs électrochimiques. En effet, bien que diminuer la taille des pores conduise à l'augmentation de l'aire de la surface active pour une épaisseur donnée, de trop petits pores amènent au recouvrement des couches de diffusion ce qui peut diminuer le transport de masse [36]. Il faut donc trouver un compromis entre augmentation significative de la surface active et préservation des phénomènes électrochimiques.

2.2.1 Electrode à porosité non-ordonnée

Une des méthodes employées pour la nanostructuration des surfaces d'électrode est la dissolution sélective d'alliage binaire, « dealloying » en anglais. Il s'agit d'élaborer un alliage de deux métaux puis d'éliminer l'un des deux par dissolution soit dans un solvant inoffensif pour l'autre, soit électrochimiquement à un potentiel oxydant pour seulement l'un des deux. L'or poreux nanostructuré peut être donc obtenu par dissolution de l'argent constituant un alliage Au-Ag dans H_2SO_4 [37]. Des films d'or présentant une nano-porosité hiérarchisée avec une importante surface active ont été obtenus par voltammétrie cyclique. Le substrat d'or est placé dans un bain contenant du ZnCl_2 et/ou du SnCl_2 solubilisés dans l'alcool benzylique. Sur un cycle de potentiel, il se produit une étape d'oxydation du substrat suivie d'une étape de réduction de l'or précédemment oxydé concomitante de l'électrodéposition de ceux présents en solution, à savoir Zn^{2+} et Sn^{2+} . La structure poreuse qui en résulte est donc due à la formation d'un alliage Au-Zn et Au-Sn et dissolution de la partie Zn et/ou Sn de celui-ci [27]. Le même principe peut être appliqué avec des alliages Au-Li ou Pd-Co. Les électrodes obtenues par cette méthode montrent d'excellentes propriétés électrochimiques [38,39]. Il existe d'autres méthodes pour induire électrochimiquement une porosité sur un substrat d'or comme par exemple la voltammétrie à vague carrée, qui permet dans un premier temps de former une épaisse couche d'oxyde d'or à la surface du substrat puis dans un deuxième temps de la réduire en un matériau poreux [40]. On peut produire par anodisations successives des films d'oxyde d'étain poreux transparents qui peuvent servir à des applications photoélectrochimiques. Le procédé

est effectué à partir de couches d'étain déposées sur un substrat d'oxyde d'étain dopé au fluor. La structure résultante présente des canaux de pores interconnectés du même métal dans les couches supérieures de l'électrode résultante, (Fig.7) [41].

Il est possible d'obtenir des électrodes carbonées avec une porosité hiérarchisée par un procédé original réalisé à partir d'un exo-template. Il s'agit d'un réseau de silice macroporeux appelé Si(HIPE) pour « high internal phase emulsion » dont l'intérieur a été recouvert d'une résine formophénolique dissoute dans le THF. Après pyrolyse, le matériau monolithe formé présente des espaces vides de l'ordre de 4-5 μ m interconnectés et une excellente conductivité [28].

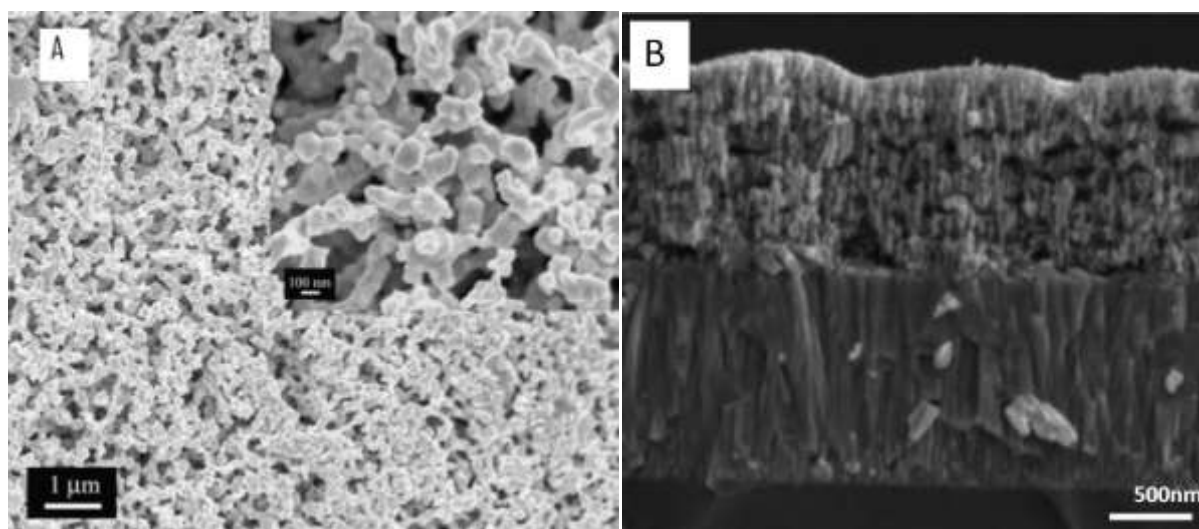


Figure 7: A) Image de microscopie électronique à balayage (MEB) d'un substrat d'or nanoporeux obtenue par dissolution sélective d'alliage binaire fabriqué à partir d'une solution de SnCl_2 dans l'alcool benzylique [27], B) image MEB d'un film d'oxyde d'étain nanoporeux anodisé sur une couche d'oxyde d'étain dopé au fluor déposée sur un substrat de verre [41]

2.2.2 Electrode à porosité ordonnée

Des électrodes macroporeuses de carbone parfaitement organisées peuvent être obtenues par lithographie interférométrique [42] (Fig. 8). Pour obtenir des structures pareillement ordonnées, il existe des procédés moins coûteux que sont les structurations par utilisation de template. On appelle template un objet ou une structure qui sert de modèle dont la forme peut se répliquer à l'inverse. Le template sert donc de moule autour duquel, sur lequel ou à l'intérieur duquel un matériau peut être déposé de façon à épouser l'ensemble de sa forme, répliquant ainsi ce modèle suivant une structure inversée. On distingue trois grandes catégories de template : ceux établis par une matière rigide et poreuse, ceux constitués par un assemblage ordonné de nanoobjets et enfin ceux faits à partir de matière molle.

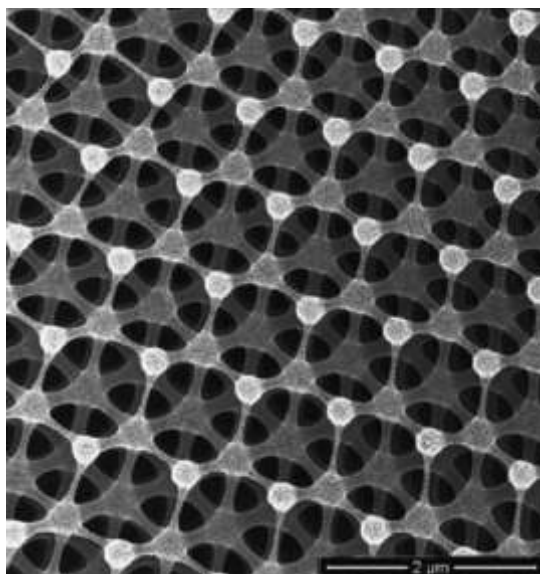


Figure 8 Image MEB d'une électrode de carbone nanoporeux obtenue par lithographie interférométrique sur laquelle un électrodépôt de palladium a été effectué [42].

Les membranes nanoporeuses fournissent d'excellents outils pour la synthèse de nanomatériaux. Historiquement il s'agit de la première voie de synthèse de nanostructures via un template rigide initiée par le groupe de Martin [43]. Généralement les membranes sont disponibles dans le commerce et sont préparées soit par gravure chimique, soit par accroissement électrochimique d'une fine couche poreuse d'oxyde d'aluminium [44]. Les membranes obtenues par gravure chimique disposent de pores présents sous la forme de canaux aléatoirement distribués dans le matériau et dont la densité peut être ajustée entre un et un million de pores par cm^{-2} et dont la taille peut varier entre 10 et 2000 nm. Les membranes d'alumine possèdent en revanche une structure beaucoup plus régulière. La porosité est distribuée de façon anisotrope et le diamètre des pores est compris entre 10 et 200 nm, leur longueur entre 1 et 50 μm et leur densité surfacique entre 10^9 et 10^{11} cm^{-2} . Leur dissolution dans l'acide fluorhydrique est l'étape qui révèle les nanofibres ou les nanotubes fabriqués. Les pores peuvent être remplis complètement ou partiellement avec des métaux, des semi-conducteurs organiques, ou des polymères conducteurs [29,45,46]. Les métaux peuvent être formés à l'intérieur des pores de la membrane et prennent alors la forme de nanofibres ou de nanotubes par électrodéposition ou par réduction chimique dite « electroless » déclenchée par un catalyseur appliqué au préalable sur les parois des pores. L'électrodéposition présente l'avantage de pouvoir contrôler la hauteur des nano-objets formés. Les semi-conducteurs tels que le ZnO et le CdS peuvent également être électrodéposés. Les polymères conducteurs ont la possibilité d'être synthétisés par polymérisation oxydante de leur monomère correspondant à l'intérieur des pores membranaires. Encore une fois ceci peut être obtenu électrochimiquement ou chimiquement [47].

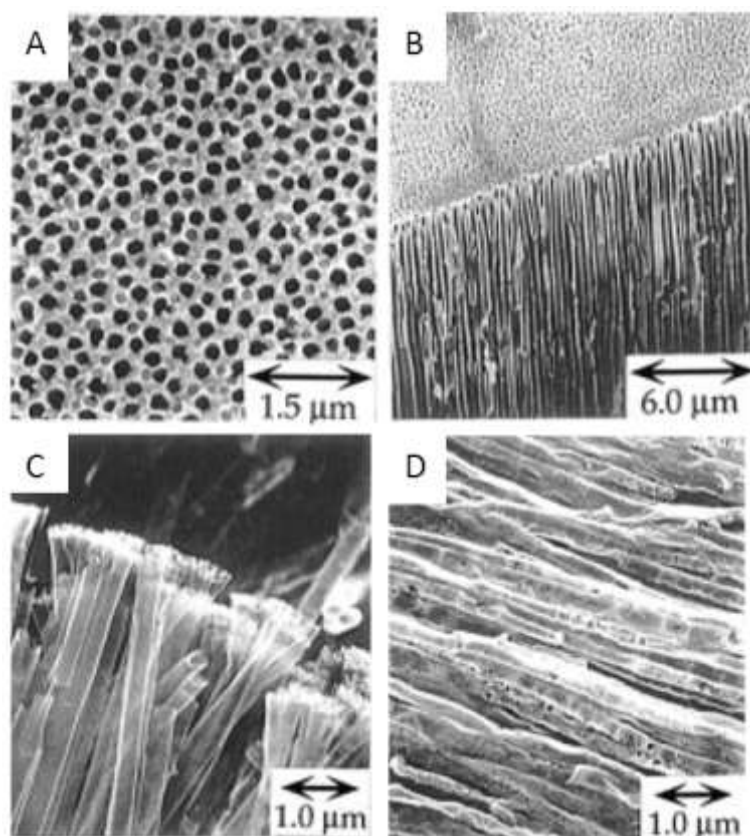


Figure 9 Images MEB d'une membrane poreuse faite d'un film d'oxyde d'aluminium anodisé servant de template, A) vue de dessus B) coupe transverse. Images des fibres de carbone obtenues par carbonisation du propylène imprégnant la structure de la membrane avant dissolution dans l'acide fluorhydrique C) et D).

Une façon idéale de procéder est d'établir une porosité via un cristal colloïdal de billes de silice ou de polystyrène au travers duquel est électrodéposé le matériau d'électrode, qui peut être un métal tel que l'or, le platine, le nickel ou le zinc ou un polymère conducteur tel que le polypyrrole. Après élimination du template par dissolution, la structure poreuse apparaît et est alors rendue disponible pour être utilisée en tant qu'électrode. Le chapitre 3 est dédié à la présentation des propriétés et caractéristiques de ces templates particuliers, à la description de leurs diverses méthodes d'élaboration ainsi qu'à leur étude appliquée au réacteur.

Il est également possible de produire des électrodes poreuses grâce à des templates non solides. En effet, des couches métalliques présentant une surface très importante ont été obtenues par réduction chimique ou électrochimique d'ions métalliques dissous dans la phase aqueuse d'un cristal liquide lyotrope. Cette partie sera plus extensivement étudiée dans le chapitre 5.

2.2.3 Applications des électrodes poreuses

On retrouve l'utilisation des électrodes nanoporeuses dans quasiment toutes les catégories de dispositifs électrochimiques. Par exemple, on trouve des batteries Lithium-ion ayant une électrode dont la morphologie et la texture ont été modelées pour pouvoir obtenir un matériau poreux et de grande surface. Ainsi le matériau de cathode V_2O_5 est mis en forme de façon à créer un aérogel, c'est-à-dire un matériau mésoporeux non-ordonné présentant un volume de pore important. Dans ce cas il présente des propriétés électroactives meilleures que celles dont dispose une cathode faite à partir de poudres polycristallines non-poreuses de V_2O_5 . Ceci s'explique par l'importante surface active offerte par les aérogels qui, mise en contact avec l'électrolyte peut supporter des taux de conversion électrochimique élevés [48]. On retrouve également les mêmes enjeux d'optimisation de surface active pour la conception des biocapteurs. Les électrodes carbonées formées grâce à l'exo-template de Silice (HIPE) sont utilisées pour l'électrocatalyse enzymatique du glucose dans des biopiles à combustibles et des biocapteurs [28]. Par exemple, le biocapteur électrochimique à ADN de Hu *et al* a recours à une électrode nanoporeuse d'or obtenue via un alliage d'or et d'argent, ce qui permet la réalisation d'un capteur présentant une excellente sélectivité et sensibilité sachant que le dispositif peut détecter l'ADN dans des gammes de concentration allant de 8.10^{-17} à $1,6.10^{-12}$ M avec un seuil de détection de 28 aM [49]. Des électrodes faites à partir de silice poreuse recouvertes de nanotubes de carbone servent également à la réalisation de biopile à combustible car leur porosité fournit un réseau de capillaires favorable à un transport de masse efficace, un support excellent pour les catalyseurs de croissance des nanotubes de carbone et favorable à une déposition électroless de l'or [50]. Reculosa *et al* ont également montré que des électrodes cylindriques d'or nanoporeux présentent un fort potentiel d'application pour les piles ou des biopiles à combustible, étant donné qu'une porosité croissante de ces électrodes engendre une diminution du potentiel de l'électroréduction de l'oxygène [51]. Des capteurs pour le peroxyde d'hydrogène faits à partir de platine mésoporeux s'avèrent être d'une excellente efficacité [52]. Il existe également des électrodes modifiées par un film macroporeux d'antimoine capable de détecter efficacement des métaux lourds présents seulement à l'état des traces par stripping voltammétrie [53]. Des biocapteurs à glucose ont également été élaborés à partir d'électrodes d'or nanoporeux organisé, et prouvent l'impact de la porosité, dont l'épaisseur est contrôlée, sur les performances du dispositif [54]. La grande sensibilité des électrodes poreuses ouvre la voie à des mesures bioélectrochimiques de cellules dites électrogéniques, telles que les cellules cardiaques ou neuronales, dont l'intensité est particulièrement faible. Ainsi en neurosciences, des microélectrodes d'or et de platine nanoporeuses ont permis la mesure des variations de potentiel de l'ordre du microvolt pour plusieurs neurones simultanément grâce à l'amélioration, introduite par la porosité, de la détection du signal par rapport au bruit thermique inhérent au système de microélectrodes [55,56].

2.3 Synthèse bio-électrocatalytique

2.3.1 Catalyse enzymatique

- **Principe**

La production de composés chiraux en un excès énantiomérique et de sucres rares peut être obtenue par l'action de catalyseurs biologiques que sont les enzymes. Comme tout catalyseur, elles vont permettre la transformation d'une entité chimique en abaissant l'énergie d'activation de la réaction, augmentant par conséquent sa vitesse de réaction. Comparée à une réaction non catalysée, une enzyme peut multiplier par un facteur allant de 10^8 à 10^{20} la vitesse d'une réaction. Par conséquent ces catalyseurs vont augmenter le rendement de réactions sans qui elles seraient minoritaires ou trop lentes pour être exploitées. Le principe de fonctionnement d'une électrode exécutant une catalyse enzymatique est décrit dans les schémas ci-dessous. L'électrode est alimentée par une source d'énergie électrique. Celle-ci est transmise de l'électrode au médiateur, espèce moléculaire qui établit alors une communication électrochimique entre électrode et biomolécules par un phénomène de navette d'électrons qu'il est capable de réaliser. Les enzymes, grâce à cette stimulation électrochimique, vont pouvoir réaliser la transformation chimique voulue.

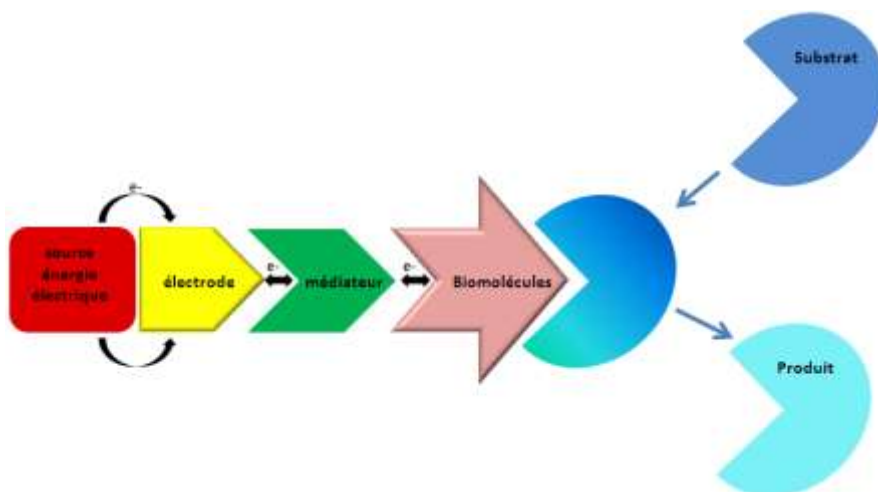


Figure 10 Schéma du principe de fonctionnement d'une catalyse électroenzymatique

Dans les synthèses biologiques, presque toutes les réactions sont réalisées par des enzymes qui constituent la classe de protéine à la fois la plus vaste et aussi la plus spécialisée. Elles représentent l'instrument primaire direct de l'expression de l'action du gène, puisqu'elles peuvent catalyser des milliers de réactions chimiques qui constituent le métabolisme intermédiaire des cellules. Comme ce sont des protéines, elles sont formées par une chaîne d'acides aminés qui constitue la structure primaire. C'est la conformation spatiale, en d'autres termes la structure tridimensionnelle également

appelée structure secondaire et tertiaire, qui détermine l'activité de l'enzyme. Dans cette structure se situe le site actif où le substrat peut se fixer par des interactions chimiques faibles, donnant la possibilité d'une proximité spatiale entre enzyme et substrat pour que la réaction chimique puisse avoir lieu. Ce site actif est constitué de deux parties : le site de liaison/ fixation/reconnaissance et le site catalytique qui permet la réaction.

L'activité biologique des enzymes ne peut se faire sans la présence de leur cofacteur, ou coenzyme. Il s'agit d'une substance chimique non-protéique qui se lie par des liaisons hydrogènes ou ioniques à la protéine afin qu'elle soit dans son état activé. Si cette molécule se lie de façon covalente à l'enzyme alors on parle de groupement prosthétique.

Il existe plusieurs familles d'enzymes qui ont été répertoriées par l'IUB, International Union of Biochemistry, qui a défini six grandes classes distinctes :

1. Les **oxydo-réductases** qui sont impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction accompagnées par le transfert de proton H^+ ou d'hydroxyde OH^- qu'elles effectuent de l'électrode au substrat. On trouve notamment les oxydases (catalysant le transfert d'électron pour déclencher une réaction d'oxydation), les oxygénases (catalysant le transfert d'ion hydroxyde) et les déshydrogénases (catalysant le transfert d'électron pour provoquer une réaction de réduction)
2. Les **transférases** qui catalysent le transfert de groupements fonctionnels, telles que la phosphorylase
3. Les **hydrolases**, capables d'hydrolyser de nombreux composés
4. Les **lyases** qui catalysent l'élimination ou l'addition de molécules d'eau, d'ammoniaque et de dioxyde de carbone. On trouve par exemple les aldolases, les décarboxylases...
5. Les **isomérases** qui sont impliquées dans des réactions d'isomérisation, comme par exemple la phosphotriose isomérase
6. Les **ligases** qui catalysent des réactions de synthèse où deux molécules se lient de façon covalente et au cours desquelles une molécule d'ATP sera hydrolysée.

On note que seule la famille des oxydo-réductases représente un intérêt pour les procédés électrochimiques. Les réactions d'oxydo-réduction les plus courantes qu'elles sont capables de produire font intervenir les coenzymes de deux types : pyridiniques (NAD^+ , $NADP^+$) et flaviniques (FMN, FAD). Ces molécules rédox non protéiques doivent se présenter sous leur forme oxydée et se réduire pour que l'enzyme puisse réaliser l'oxydation de son substrat, et inversement, elles doivent se présenter sous sa forme réduite et s'oxyder si l'enzyme doit réduire son substrat. Pour que

l'enzyme puisse disposer en continu de la forme active de son cofacteur, celui-ci doit soit être présent dans le milieu réactionnel en très grande concentration, éventuellement supérieure à celle du substrat, soit être régénéré. Il existe plusieurs voies de régénération du cofacteur : la voie biologique, enzymatique, électrochimique, et électroenzymatique. Dans cette étude nous aborderons les voies électrochimiques et électroenzymatiques.

L'activité d'une enzyme s'exprime en « UNIT » qui équivaut à la quantité de substrat que l'enzyme peut transformer par unité de temps et à une température et un pH donné. Par exemple une UNIT de glucose oxydase est la quantité d'enzyme qu'il faut utiliser pour oxyder 1.0 μmole de $\beta\text{-D-glucose}$ en D-gluconolactone et H_2O_2 par minute à pH 5.1 et à 35 °C. Pour pouvoir fonctionner de façon optimale et assurer une stabilité la plus longue possible dans le temps, l'enzyme a besoin d'un environnement biologique spécifique. Une solution tampon avec un pH ajusté constitue généralement le milieu biocompatible dans lequel l'enzyme pourra établir la réaction catalytique. Le choix du tampon dépend du domaine de pH à tamponner dans lequel l'activité de l'enzyme est optimale et de l'absence d'interactions entre celui-ci et la biomolécule. Le bon fonctionnement d'une enzyme peut être altéré par une présence trop abondante de son substrat qui peut jouer le rôle d'inhibiteur enzymatique. Dans les cas d'un réacteur à flux, l'élimination efficace du substrat par le flux peut permettre de remédier à ce problème. La stabilité des enzymes n'est en général conservée que sur quelques heures voire quelques jours. D'un dispositif à l'autre, cela peut dépendre de la protéine catalytique utilisée, mais surtout du système employé pour immobiliser les biomolécules à l'électrode.

Dans le domaine d'application des biocapteurs les catalyseurs enzymatiques se caractérisent par leur sélectivité. En effet chaque enzyme est spécifique à un type substrat. Ce phénomène est illustré par le principe de « clef-serrure ». Par exemple la glucose oxydase ne peut qu'oxyder le glucose ou des molécules de structure très similaire. En revanche pour une application comme la bioélectro synthèse, des enzymes possédant un large spectre de substrats sont recherchées. Le travail décrit ici a été effectué avec une seule famille d'enzymes : les déshydrogénases, activées par la présence du cofacteur NAD^+/NADH (nicotinamide adénine dinucléotide). Cette famille d'enzymes est caractérisée d'une part par une énantiosélectivité des alcools qu'elles forment par réduction de cétones et d'autre part par la capacité d'oxyder des fonctions alcools localisées de façon très spécifique sur les substrats pour former le sucre rare désiré. A cela s'ajoute la gamme étendue de substrats sur lesquels ces enzymes peuvent agir, ce qui favorise la production de produits variés, simplifiant ainsi la conception du réacteur. De plus si on compare ces biocatalyseurs à ceux utilisés en synthèse organique (complexes métalliques...), ce type de catalyseur ne génère aucune toxicité, est complètement biodégradable et ne représente donc aucun impact environnemental. Il existe encore d'autres avantages notables à se servir de ces biocatalyseurs. Par exemple les réactions s'opèrent sur les réactifs sans qu'ils aient besoin de groupement protecteur et les conditions de réactions sont douces. De plus les produits obtenus par voie enzymatique répondent aux directives imposées pour la formulation de produits médicaux car il n'y a pas de libération d'endotoxines et les substances mises en jeu pour la conversion du substrat ne sont pas actives d'un point de vue pharmaceutique.

- **Méthodes de conception du matériel enzymatique**

Par ailleurs pour assurer un rendement satisfaisant, les enzymes qui réalisent les transformations chimiques du réacteur ont été optimisées afin d'améliorer leur performance catalytique dans un environnement tel que celui imposé par le dispositif. Ceci a été obtenu grâce aux techniques d'ingénierie des protéines, à savoir les outils d'évolution moléculaire, de modélisation, de prédiction de structure par cristallographie de rayons X et de diffusion des rayons X aux petits angles (small angle X-ray scattering, SAXS) et spectroscopie à dichroïsme circulaire qui, bien qu'ils ne soient pas au cœur du travail de thèse, ont servi à produire sur mesure des enzymes performantes utilisées tout au long des expériences ici présentées. Il existe plusieurs exemples d'enzymes qui ont été conçues avec ces méthodes pour améliorer leur performances, et qui ont par la suite été commercialisées ou utilisées dans des procédés industriels : la formate déshydrogénase vendue par InneTech MSU, les phospholipases commercialisées par Novozymes, et la N-carboamyl-D-aminoacid aminohydrolase développée par Kaneka corporation [57,58]. La conception d'enzyme dite rationnelle est basée sur l'étude de la structure tri-dimensionnelle de la biomolécule rendue disponible par diffraction des rayons X. Cette technique requiert la cristallisation de la protéine afin que celle-ci puisse être étudiée en diffraction. De ces mesures sont déduites les densités électroniques que présente la molécule qui permettent d'accéder dans un second temps à la modélisation en 3D de l'enzyme. La détermination de cette structure 3D est cruciale pour comprendre la façon dont les protéines fonctionnent. Ceci est récemment illustré par des prix Nobel obtenus dans ce domaine ces dix dernières décennies. Les avancées en termes de connaissance des structures enzymatiques ont un impact non négligeable sur l'industrie, car ces dernières sont devenues des outils incontournables pour non seulement la conception de biomolécules enzymatiques, mais aussi de certains médicaments. Ces progrès servent également de « boîte à outils » qui permet de fournir des procédés de mutation pour essayer de répondre à de nombreuses combinaisons de propriétés que devraient idéalement présenter ces enzymes suivant l'application pour laquelle elles sont destinées, par exemple le pH optimal auquel elles doivent travailler, leur condition de stabilité thermique, la spécificité relative au substrat, et bien sûr leurs propriétés catalytiques.

Pour compléter l'approche obtenue par la conception rationnelle des enzymes, le recours à la conception évolutive (l'évolution moléculaire dirigée) des enzymes a aussi été exploité. Dans ce cas le gène qui code la protéine d'intérêt est muté et/ou recombiné aléatoirement pour créer un large panel de gènes mutants. Ce panel est ensuite testé et est exprimé pour vérifier la présence de la protéine mutante présentant la propriété recherchée. Ensuite la protéine sélectionnée est répliquée afin de permettre aux chercheurs de séquencer leur ADN pour comprendre quelle est la mutation à l'origine de ces changements de propriétés. La mutagenèse aléatoire et les méthodes basées sur l'évolution sont explorées, et lorsque leurs résultats sont combinés avec ceux de la conception rationnelle, on obtient alors généralement de meilleures performances. L'association de ces techniques va donc concourir au contrôle de la sélectivité de l'enzyme afin qu'elle puisse produire la substance chirale ou le sucre rare recherché et à l'amélioration de leur stabilité dans le temps et en température suivant les conditions imposées par le réacteur.

- **Principe de mesure électrochimique de l'activité enzymatique**

La voltammétrie cyclique et l'ampérométrie sont deux méthodes électrochimiques couramment utilisées pour suivre l'évolution des transformations bioélectrochimiques, oxydation ou réduction, catalysées par les enzymes. Les courants d'oxydation ou de réduction peuvent circuler dans la cellule grâce à la présence de la contre-électrode. L'évolution du courant du dispositif est suivie par un potentiostat. De cette façon on peut corrélérer la quantité de substrat produit au signal fourni par l'électrode mesurée.

La majorité des tests préliminaires qui ont permis la mise en fonctionnement du réacteur se sont d'abord déroulés dans des conditions statiques, c'est-à-dire sans flux. Si le milieu réactionnel du réacteur n'est pas en mouvement, et si par ailleurs la vitesse de réaction est suffisamment élevée, alors le transport de masse à l'électrode peut se trouver limité par le phénomène de diffusion. Pour un potentiel fixe suffisamment élevé, on pourra dans ce cas exprimer le courant de diffusion I_d proportionnellement à la concentration de départ en réactif C_o par la relation suivante, donnée par la loi de Fick :

—

Où L est l'épaisseur de la couche de diffusion (cm), D_o est le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), A_e l'aire de l'électrode (cm^2), et n le nombre de charges échangées par le réactif.

Dans le réacteur, les mesures seront effectuées alors que le milieu réactionnel est mis en mouvement sous l'action d'un flux. L'intérêt de procéder de la sorte est qu'au fur et à mesure de l'expérience, la concentration de l'espèce électroactive au voisinage de l'électrode ne diminuera pas comme cela se produit dans le cas de mesures statiques, ainsi que présenté dans le graphe ci-dessous. Celui-ci montre l'évolution de la distribution de la concentration relative (C/C_o) au voisinage de l'électrode en fonction du temps pour un milieu réactionnel à l'état statique. Au fur et à mesure que le temps s'écoule, la concentration à proximité de l'électrode diminue, (Fig. 11). En revanche, si le système est approvisionné par un flux constant de l'espèce électroactive, le profil de concentration n'évoluera pas en fonction du temps, ce qui permet de maintenir le rendement au fil du temps.

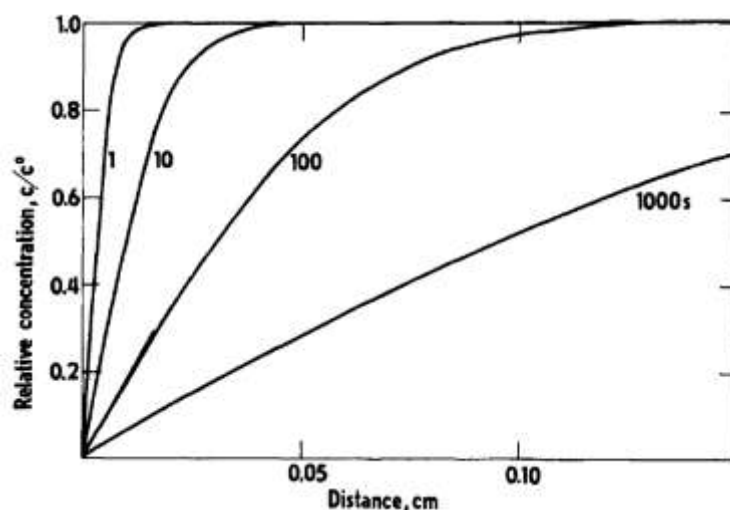


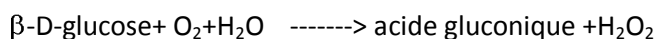
Figure 11 Distribution de la concentration dans le cas d'une diffusion linéaire, le temps en seconde est indiqué sur chaque courbe.

2.3.2 Transfert d'électron

Afin que le bioréacteur puisse réaliser les réactions d'oxydoréductions visées, les enzymes doivent recevoir une stimulation électrochimique qui se matérialise par l'apport ou la substitution d'électrons provenant de l'électrode de travail. Il existe différents mécanismes qui permettent cet échange. Ceux-ci définissent également les principes de fonctionnement élémentaires de biopiles et de biocapteurs enzymatiques, et caractérisent ces derniers en les classant en trois grandes familles suivant le processus de transfert d'électron en jeu.

- **Première génération de biocapteurs**

Pour la première génération de biocapteurs, une des molécules générées par l'enzyme est directement oxydée ou réduite au niveau de l'électrode (Fig. 12). Par exemple, lorsque le biorécepteur est la glucose oxydase (GOx), la réaction en jeu est l'oxydation du glucose donnée par l'équation suivante :



D'après cette réaction on voit que l'échange d'électrons au niveau de l'électrode peut se faire via l'oxydation du produit H_2O_2 , voir Figure 12 :

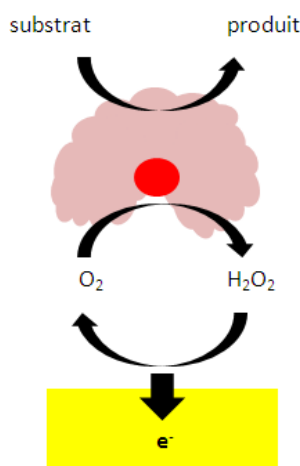


Figure 12 Schéma du transfert d'électrons entre enzyme et électrode basé sur la réaction du produit H_2O_2 à l'électrode. Jaune : électrode, rose : enzyme, rouge : cofacteur.

De tels systèmes sont encore exploités malgré certains inconvénients qu'ils présentent. En effet la réponse du dispositif vis-à-vis du glucose est tributaire de la pression partielle en oxygène et de ses fluctuations. De plus, la réaction d'oxydation de peroxyde d'hydrogène nécessite l'application d'un haut potentiel à l'électrode ($E^\circ(H_2O_2/O_2)=0,69\text{ V vs NHE}$), qui peut engendrer la formation de produits secondaires et par conséquent diminuer la sensibilité et la sélectivité du dispositif. De nombreuses recherches sont menées pour pallier ces désavantages et explorent la voie d'immobilisation de l'enzyme pour diminuer l'apparition de produits secondaires. Ainsi la GOx peut être immobilisée dans un film polymère électrosynthétisé sur l'électrode ce qui permet d'augmenter la durée d'utilisation du dispositif mais aussi de limiter le flux d'interférents par exclusion stérique [59]. On peut également utiliser une membrane négativement chargée, à savoir le Nafion®, qui induira une exclusion par répulsion électrostatique envers les interférents souvent d'origine anionique [60].

- **Deuxième génération de biocapteurs**

Une deuxième génération de biocapteurs a été développée pour réduire les phénomènes d'interférences en abaissant le potentiel de réactions des espèces électroactives. Pour ce faire, le transfert d'électrons s'établit via des médiateurs rédox artificiels, c'est-à-dire des molécules qui font office de collecteurs d'électrons entre enzyme et électrode. Suivant que l'enzyme doit effectuer une oxydation ou une réduction du substrat, le médiateur doit soit collecter les électrons au niveau du coenzyme, puis les délivrer à l'électrode, soit le contraire, délivrer des électrons au coenzyme et en collecter à l'électrode, en d'autres termes effectuer la « navette » d'électrons entre cofacteur ou enzyme et électrode. Suivant que le médiateur doit accepter ou donner des électrons, il doit se trouver dans sa forme réduite ou oxydée respectivement. La régénération du médiateur à l'électrode est essentielle afin que le médiateur soit à nouveau disponible pour réagir avec le coenzyme. Selon l'espèce chimique utilisée comme médiateur, ce dernier peut effectuer la « navette/shuttle » d'un ou

de deux électrons entre électrode et enzyme ou cofacteur, comme ce sera le cas avec le système étudié dans ces travaux.

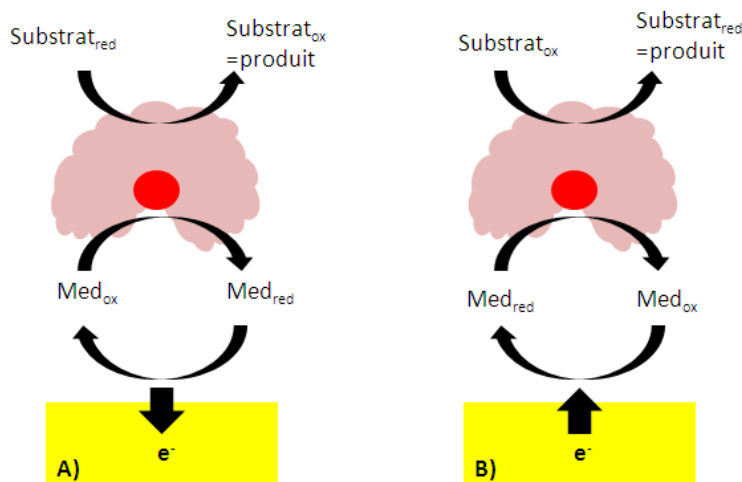


Figure 13 Schéma du transfert d'électrons entre enzyme et électrode via l'utilisation d'un médiateur redox, dans le cas d'une réaction d'oxydation du substrat A), et le cas d'une réduction de celui-ci B). Med_{ox} et Med_{red} sont les abréviations de « médiateur sous forme oxydée » et « médiateur sous forme réduite ».

La schématisation du transfert d'électrons via un médiateur est présentée dans la Figure 13 pour le cas d'une oxydation et d'une réduction d'un substrat. Les électrons doivent transiter par trois espèces redox différentes avant d'être collectés à l'électrode pour le cas de l'oxydation ou délivrés au coenzyme dans le cas de la réduction. Pour assurer ce transfert, les lois de la thermodynamique imposent une différence de potentiel redox entre chaque couple mis en jeu, positif dans le cas de l'oxydation du substrat et négatif dans le cas inverse. Une technique simplifiée mais pratique pour évaluer la possibilité du transfert électronique entre différentes espèces redox est de comparer les différents potentiels standards apparents (E'') des différents couples redox et de vérifier qu'ils respectent l'ordre suivant, pour une réaction d'oxydation du substrat :

$$E''_{\text{sub}_{\text{OX}}/\text{sub}_{\text{RED}}} \leq E''_{\text{coenz}_{\text{OX}}/\text{coenz}_{\text{RED}}} \leq E''_{\text{med}_{\text{OX}}/\text{med}_{\text{RED}}} (\leq E''_{\text{électrode}})$$

Ou celui-ci pour une réaction de réduction du substrat :

$$E''_{\text{sub}_{\text{OX}}/\text{sub}_{\text{RED}}} \geq E''_{\text{coenz}_{\text{OX}}/\text{coenz}_{\text{RED}}} \geq E''_{\text{med}_{\text{OX}}/\text{med}_{\text{RED}}} (\geq E''_{\text{électrode}})$$

Toutefois ceci ne permet pas de prédire à coup sûr l'échange d'électrons entre ces espèces biomoléculaires, plus complexes que des espèces redox moléculaires simples.

Afin de transmettre efficacement les électrons du substrat jusqu'à l'électrode, ou dans le sens contraire, et obtenir ainsi un dispositif électrochimique performant, l'étape de la médiation est très importante. Celle-ci dépend de toute évidence de la nature du médiateur en jeu. Ainsi pour établir une médiation électrochimique optimale, le médiateur doit répondre à différents critères ^[61-63]:

- il doit être soluble dans le milieu réactionnel
- le potentiel redox des médiateurs doit se situer dans le domaine de celui des biomolécules
- ses états oxydés et réduits doivent présenter une bonne stabilité chimique
- il ne doit pas être toxique, en particulier s'il est destiné à des applications *in vivo* ou pour produire des substances destinées pour la pharmacutique ou la consommation alimentaire
- il ne doit pas effectuer de réaction secondaire avec d'autres espèces présentes dans le milieu réactionnel
- il doit mettre en jeu un mécanisme d'échange d'électron rapide

Il est important de noter que la régénération du cofacteur peut s'effectuer lorsque la déshydrogénase est couplée avec une deuxième enzyme telle que la diaphorase [64], la NADH oxydase [65,66], la formate déshydrogénase [67] ou encore la phosphite déshydrogénase [68]. Celles-ci sont capables d'intensifier le transfert d'électrons entre médiateur et cofacteur et instaurent par conséquent une régénération électroenzymatique du cofacteur. Toutefois leur emploi complexifie la mise en œuvre d'un système électroenzymatique où deux entités enzymatiques distinctes doivent être considérées. En général il est préférable d'intégrer la régénération purement électrochimique du cofacteur, afin en premier lieu de simplifier le système électrocatalytique et ensuite de réduire les coûts de fabrication.

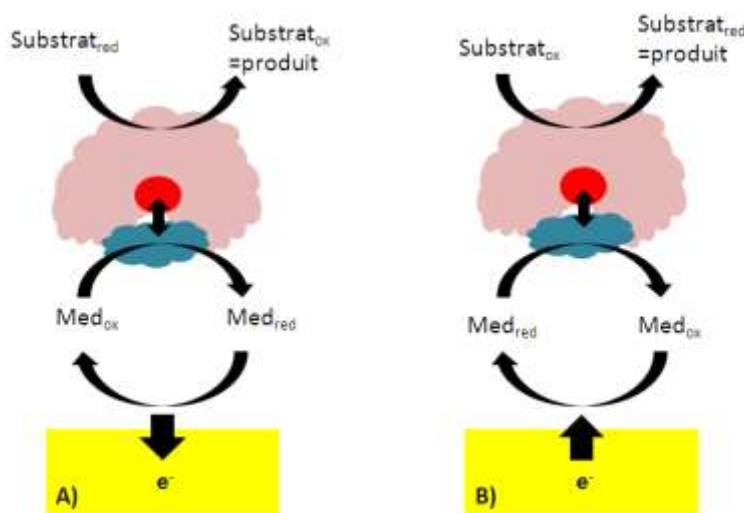


Figure 14 Schéma du transfert d'électron entre enzyme et électrode via l'utilisation d'un médiateur redox et d'une seconde enzyme (en bleu), dans le cas d'une réaction d'oxydation du substrat A), et le cas d'une réduction de celui-ci B). Med_{ox} et Med_{red} sont les abréviations de « médiateur sous forme oxydée » et « médiateur sous forme réduite ».

Le médiateur, capable d'établir un transfert d'électrons efficace entre électrode et coenzyme $NAD^+/NADH$, est le plus souvent une molécule organique ou un complexe organométallique. L'utilisation de cet intermédiaire est en général nécessaire, car la réduction ou l'oxydation du cofacteur directement à la surface d'une électrode ne régénère que très peu du coenzyme mais

forme majoritairement des produits secondaires tel que des dimères ^[69] (Fig.14). Des médiateurs couramment employés sont certaines quinones ^[70], le diméthylferrocène ^[71], le méthyl viologène ^[72] ou encore le complexe de pentaméthyl-cyclo-pentadienyl rhodium bipyridine ^[73]. La nature des différents types d'électrodes combinées à l'utilisation de médiateurs a été étudiée afin de déterminer son impact sur la régénération électrochimique du cofacteur, par exemple l'efficacité des électrodes en carbone a été testée pour l'élaboration de réacteurs batch dont la médiation était assurée par un médiateur viologène ^[74].

- **Troisième génération de biocapteurs**

Le transfert d'électron peut aussi se faire directement entre électrode et cofacteur sans l'intermédiaire d'un médiateur naturel (O₂) ou artificiel (Fig. 15). Ce type de transfert direct caractérise notamment les biocapteurs dit de troisième génération. Cette construction enzymatique peut permettre dans certain cas de s'affranchir de problèmes d'interférence rencontrés lors de dosage en milieux complexes ^[75,76]. Dans ce cas, le courant mesuré est très étroitement lié à la distance entre le cofacteur et l'électrode, ainsi qu'à la structure et la conformation de l'enzyme.

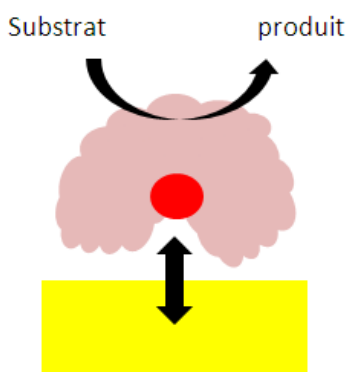


Figure 15 Schéma du mécanisme de transfert direct d'électron de biomolécule à l'électrode

Bien que ce transfert direct d'électron (TDE) se trouve être de tous les mécanismes de transfert le plus efficace, sa réalisation n'est pas possible pour toutes les enzymes actuellement exploitées dans les dispositifs électrocatalytiques. On ne recense qu'une cinquantaine d'enzymes sur les 1000 enzymes rédox couramment utilisées, qui puissent établir un TDE. Pour la plupart, il s'agit d'enzymes présentant plusieurs cofacteurs. Par exemple on trouve la horseradish-peroxydase ^[77], la cytochrome C peroxydase ^[78], la lacto-peroxydase ^[79], la GOx ^[80], les protéines hèmes et la cellobiose peroxydase ^[81].

Souvent l'électron est d'abord transféré de l'électrode à un premier cofacteur, puis transmis au deuxième avant d'être retransmis à l'enzyme proprement dite. L'orientation de la molécule par rapport à l'électrode est un paramètre déterminant pour l'efficacité du TDE. Ainsi si l'enzyme ne permet pas de mettre en contact son centre actif et l'électrode, le courant ne pourra atteindre une amplitude suffisante pour que le rendement espace/temps du dispositif soit satisfaisant. Ce

problème peut être résolu dans certain cas par l'utilisation d'une couche auto-assemblée comme couche d'accroche des biomolécules [81].

Des trois systèmes de transfert d'électrons présentés ci-dessus, on retiendra seulement celui issu de la deuxième génération de biocapteurs pour l'élaboration de notre réacteur.

2.3.3 Immobilisation

Toutes les espèces électroactives participant à la synthèse rédox sont amenées à être immobilisées à la surface de l'électrode. De cette façon, le réacteur pourra convertir le flux entrant contenant le réactif de départ en un flux sortant délivrant directement le produit final et ce, en limitant les phénomènes de contamination par le matériel électroenzymatique. Ainsi tous les composants constituant la chaîne électrocatalytique, à savoir le médiateur, le cofacteur et l'enzyme, doivent être maintenus directement ou via un élément intermédiaire sur la structure de l'électrode de travail.

2.3.3.1 Immobilisation de l'enzyme

L'immobilisation de l'enzyme à la surface de l'électrode optimise les échanges électrochimiques entre électrode et biomolécules grâce à la proximité qu'elle instaure. Il existe différentes méthodes d'immobilisation de l'entité biospécifique, qui proposent un piégeage chimique ou physique, mais chaque procédé doit respecter certains critères. Tout d'abord la stabilité du dispositif doit pouvoir être conservée le temps de la synthèse pendant lequel l'activité de l'enzyme ne doit pas s'altérer. Ainsi une encapsulation qui ne dénature pas la protéine et la conserve dans sa conformation active est systématiquement recherchée. Il faut également que les sites biocatalytiques ou de reconnaissance soient facilement accessibles. La molécule qui est susceptible d'être transformée doit pouvoir atteindre l'enzyme de façon optimale afin que le maximum d'enzyme encapsulée puisse contribuer à la synthèse du produit. De plus, le dépôt doit conduire à une haute densité des biomolécules à la surface de l'électrode de travail afin d'obtenir un « turnover » élevé et donc un meilleur rendement électrochimique.

L'immobilisation des enzymes peut être réalisée par les méthodes suivantes, voir Figure 16 :

- **L'adsorption physique** des enzymes à la surface de l'électrode : il s'agit d'un phénomène dû à des interactions de type électrostatique, ionique, hydrophobe, Van-der-Waals ou encore des liaisons hydrogènes entre enzyme et surface d'électrode par l'intermédiaire de matériaux ou de substances actives. On trouve donc des résines échangeuses d'ions anioniques ou cationiques, du charbon de bois actif, des gels de silice, de l'argile, de l'oxyde d'aluminium et du verre poreux [82]. Cette technique permet une immobilisation simple mais présente les désavantages de souvent modifier la conformation de l'enzyme, et d'éventuellement dénaturer la biomolécule. De plus, malgré sa simplicité de mise en oeuvre,

elle est peu utilisée pour les bioréacteurs électrochimiques car les enzymes immobilisées peuvent facilement se désorber sous l'action du flux hydrodynamique, de variations de pH, de température, de concentration en substrat ou de force ionique [⁸³], (Fig. 16 A).

- **La rétention** grâce à l'application d'une membrane poreuse, telle que le Nafion®, qui permet de confiner les enzymes à la surface de l'électrode tout en laissant le substrat diffuser jusqu'à l'électrode [⁸⁴]. Des membranes faites d'acétate de cellulose [⁸⁵] et de polylysine peuvent être également employées à cet effet [⁸⁶], (Fig. 16 B)
- **La réticulation ou l'électropolymérisation** : la réticulation des biomolécules à la surface d'une électrode par l'emploi d'un agent de réticulation augmente la stabilité du dispositif biocatalytique. Un agent couramment utilisé est le glutaraldéhyde, qui peut se présenter sous forme liquide ou vapeur. Cette méthode de couplage est basée sur la réaction des groupements fonctionnels de l'agent réticulant avec les groupements amines des enzymes pour former des pontages covalents « enzyme-enzyme ». Malgré la stabilité de cette voie d'immobilisation, les biomolécules sont toutefois susceptibles de rapidement perdre leur activité à cause de la rigidification de la structure tridimensionnelle [⁸⁷]. (Fig. 16 C)
- **Le greffage covalent** : cette méthode d'immobilisation est basée sur la création de liaisons fortes entre la biomolécule et la surface de l'électrode. Elle nécessite la présence de groupements fonctionnels sur la surface de l'électrode tels que des groupements carboxyliques (-COOH), amines (-NH₂), hydroxyles (-OH), ou thiols (-SH), qui permettent l'accrochage de la biomolécule sans intervenir dans le processus de reconnaissance moléculaire. Cette technique conduit à des liaisons stables et des contraintes diffusionnelles limitées [⁸⁸]. (Fig. 16 D)
- **La technique de Langmuir-Blodgett** : cette technique consiste à emprisonner des molécules d'enzymes entre deux monocouches de composés amphiphiles (tensio-actifs) grâce à la force électrostatique. Ces films ordonnés créent une matrice inerte dans laquelle l'enzyme peut être immobilisée [⁸⁹]. (Fig. 16 E)
- **L'inclusion physique** : cette technique consiste à incorporer la biomolécule dans des matrices de type polymères organiques, sol-gels, pâtes de carbone, matériaux inorganiques (argile). La biomolécule se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymères ou inorganiques. Le maillage de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de la biomolécule grâce à une porosité suffisante du gel. La taille des pores doit être contrôlée car cette technique peut poser des problèmes si les pores sont trop larges à cause d'un relargage des biomolécules de faible poids moléculaire [⁹⁰]. (Fig. 16 F)

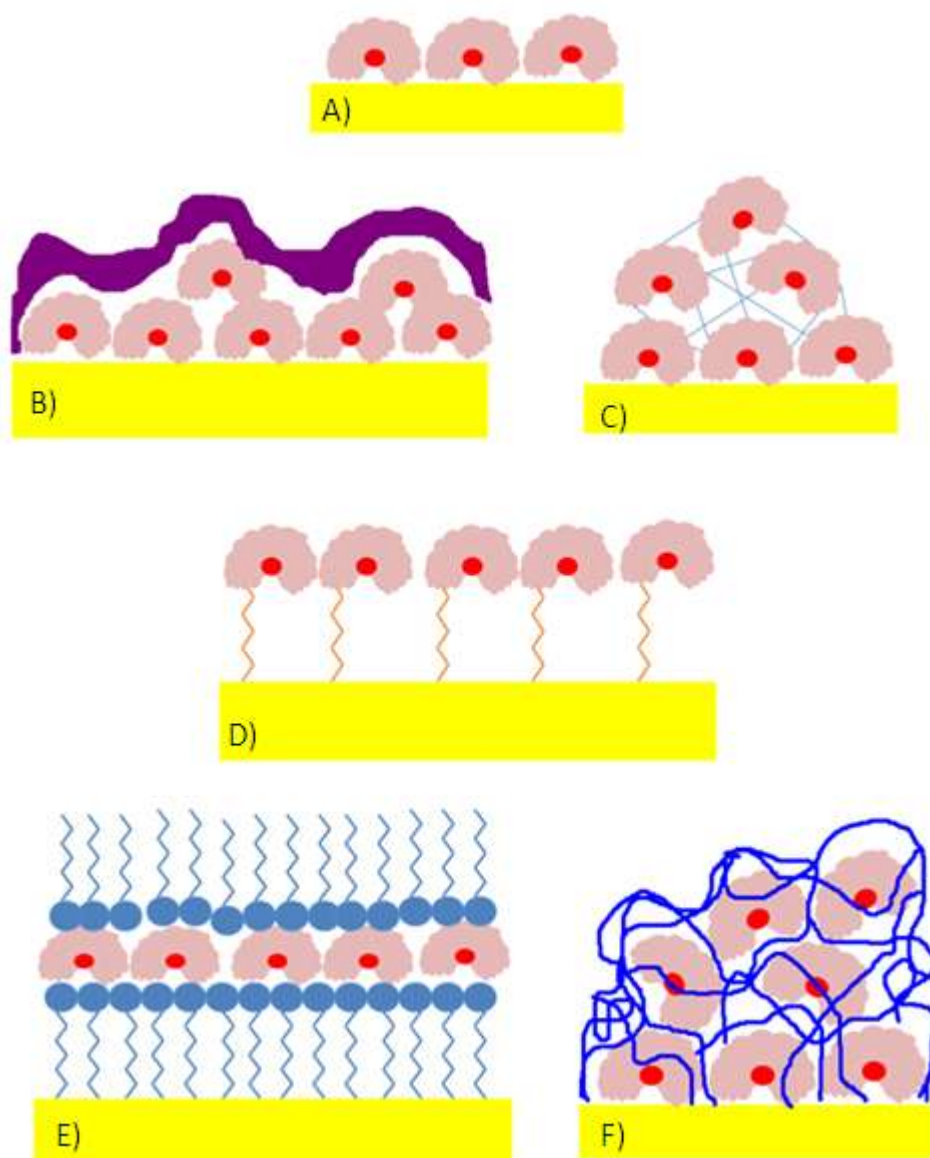


Figure 16 Schéma des différentes voies d'immobilisation d'enzymes à la surface d'une électrode, A) adsorption physique des enzymes, B) rétention des enzymes par l'emploi d'une membrane, C) réticulation ou polymérisation, D) greffage covalent, E) Langmuir-Blodgett, F) inclusion physique

Dans ce travail nous explorerons seulement la voie d'immobilisation de l'enzyme par inclusion physique. Nous étudierons deux méthodes différentes qui permettent de générer des matrices d'encapsulation de natures différentes : une couche de silice ultra fine produite par électrogénération et une couche de polymère électroprécipité.

2.3.3.2 Immobilisation du cofacteur

L'approche enzymatique représente une voie d'intérêt avérée pour l'industrie lorsque les procédés dont il est question requièrent une haute sélectivité et un bon rendement [91]. Or la majorité des enzymes utilisées dans les dispositifs industriels fonctionnent seulement en présence de leur cofacteur. Le bioréacteur électrochimique dont il est question ici n'y fait pas exception. Etant donné que ces molécules représentent un coût non-négligeable, il est donc crucial d'une part, d'établir un processus de régénération du cofacteur, afin qu'il se reconvertisse systématiquement sous la forme permettant l'activité de l'enzyme et d'autre part de l'immobiliser pour ne pas l'éliminer sous l'action du flux sortant. Diverses méthodes de rétention du cofacteur pour le développement de biocatalyses régénératives et durables ont été explorées afin de maîtriser ce point critique de la viabilité d'un réacteur biochimique [91], aussi nous n'aborderons ici que celles consacrées à des applications électrochimiques.

Il existe trois méthodes distinctes pour assurer la rétention du cofacteur à la surface d'une électrode : le piégeage par membrane, par adsorption physique et par immobilisation via une fonctionnalisation. Comme le cofacteur doit rester à proximité de l'enzyme et du médiateur, on constate qu'il arrive fréquemment que la méthode d'immobilisation de deux voire des trois biomolécules soit combinée.

- **Immobilisation dans une membrane**

Comme décrit précédemment pour l'immobilisation des enzymes, il est possible de confiner le cofacteur à proximité de l'électrode par l'application de membranes. Ainsi des membranes faites d'acétate de cellulose ou de polylysine ont permis le confinement non seulement de l'enzyme, la lactate déshydrogénase (LDH) et la glucose déshydrogénase (GDH) respectivement, mais aussi de leur cofacteur NAD^+ [85,86].

- **Immobilisation par adsorption physique**

La limitation que présente un système dont le cofacteur est immobilisé par une membrane réside dans l'équilibre délicat entre une rétention efficace des biomolécules et un apport suffisant en substrat. C'est pourquoi l'immobilisation par adsorption du cofacteur est une alternative qui peut être adoptée. Par simple évaporation, il est possible d'adsorber de la glutamate déshydrogénase (GLDH) et du NADH sur une électrode de carbone modifiée au bleu de Meldola pour l'élaboration d'un capteur à ions ammonium. Lorsque le dispositif est conservé au réfrigérateur à 4°C, il est possible de garder ce dispositif bioélectrochimique pendant plus de 29 jours [92]. De la même façon, le NAD^+ et l'enzyme correspondante ont été immobilisés à la surface d'un biocapteur à lactate [93]. Cependant, on remarquera que, comme expliqué précédemment pour les enzymes, ce système de rétention ne propose pas la stabilité requise pour un fonctionnement sous flux.

- **Immobilisation via une fonctionnalisation du cofacteur**

Pour des applications de biosynthèse, il est courant de greffer le cofacteur NAD^+ à des polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG) [94], la polylysine [95], l'acide polyacrylique [96] ou le dextran [97]. Ce greffage permet généralement la rétention du cofacteur fonctionnalisé par des membranes présentant des tailles de pores plus importantes [94]. La combinaison de ces différentes méthodes de piégeage, fonctionnalisation suivi de l'emploi d'une membrane, sont généralement associées dans le but de renforcer leur efficacité et leur stabilité respective. Ces fonctionnalisations peuvent également servir à la conception de systèmes électrocatalytiques. Ainsi un biocapteur à formate peut être réalisé en combinant l'emploi du cofacteur fonctionnalisé PEG- NAD^+ avec la constitution d'une matrice photopolymérisée de poly(vinylalcool) (PVA) retenue entre une membrane de dialyse et une membrane de PE [98]. Dans un autre article, il a été reporté que du Dextran- NAD^+ avait été immobilisé avec de la NADH oxydase et de la LDH dans du PVA fonctionnalisé par des groupements styrylpyridium sur une électrode de platine recouverte d'une membrane de dialyse. Il a été montré que ce capteur a pu fonctionner sur plusieurs mois [99].

Il est également possible d'immobiliser le cofacteur directement à la surface de l'électrode grâce à une fonctionnalisation. Une attention toute particulière sera apportée à la conception de ces espaceurs, afin que le cofacteur puisse conserver une mobilité suffisante pour pouvoir évoluer entre le médiateur et le site actif de l'enzyme.

Il est possible de greffer le cofacteur sur un support de silice participant à la composition d'une électrode via l'introduction d'une fonction époxy sur celle-ci. Le précurseur glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTS) peut à la fois participer à la composition ou à la fonctionnalisation d'un matériau de silice et être lié au cofacteur de par sa fonction époxy initiale (voir schéma 17 A) [100]. Le biocapteur à lactate de Khayyami *et al* fait à partir d'une molécule qui est un analogue du NAD^+ , c'est-à-dire du N^6 -(2-aminoéthyle)carbamoyleméthyle)- NAD^+ synthétisé à partir du NAD^+ , coimmobilisée avec la LDH sur une surface de carbone vitreux grâce à la création d'une liaison covalente par une carbodiimine [101]. Dans une autre étude, du N^6 -(2-aminoéthyle)- NAD^+ est attaché de façon covalente à une électrode fonctionnalisée par une monocouche de la pyrroloquinoline quinone (PQQ) grâce à l'emploi d'une carbodiimine. Les enzymes LDH et alcool déshydrogénase (ADH) s'associent ensuite à la monocouche adressant le NAD^+ grâce aux interactions d'affinité entre enzyme et cofacteur, voir schéma 17 B) [102]. Une technique élégante est de se servir de l'apoenzyme de la GOx (c'est-à-dire l'enzyme dépourvue de son cofacteur FAD), qui vient se fixer à son cofacteur préalablement greffé sur l'électrode via le médiateur PQQ. Le médiateur est relié par liaison covalente à l'électrode grâce à la création d'une couche auto-assemblée présentant une fonction amine qui va permettre le couplage avec le médiateur grâce au carbodiimine. Ainsi le cofacteur est immobilisé entre le médiateur et l'enzyme. Ce principe est représenté dans le schéma 17 C) [103].

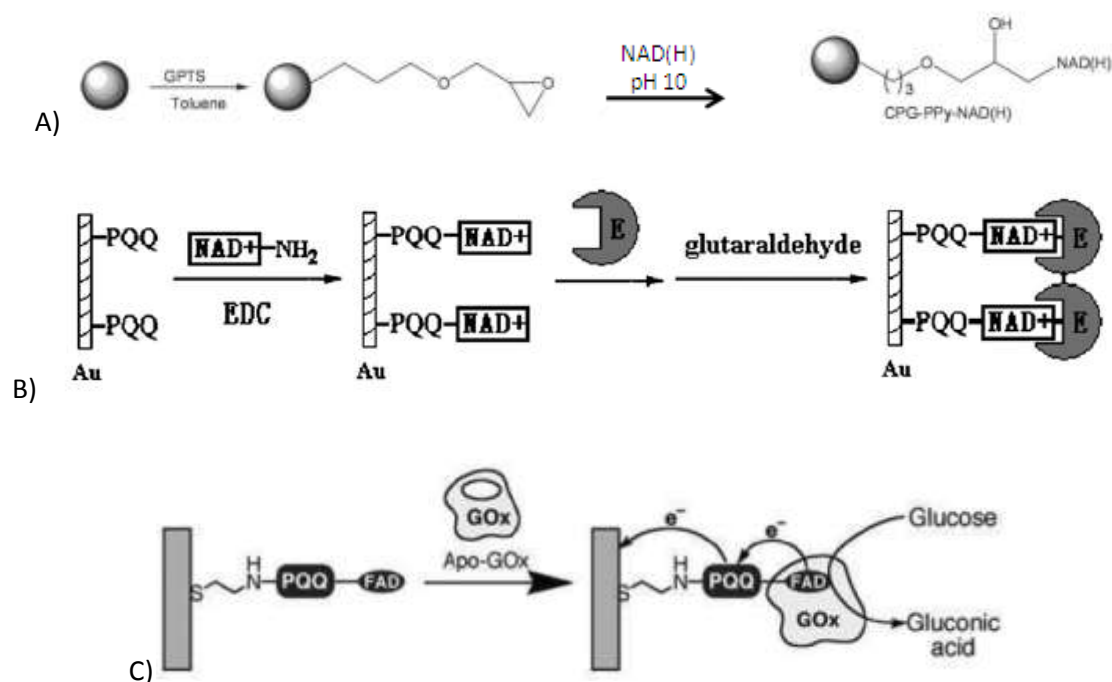


Figure 17 A) Fonctionnalisation de particules de silice par du GPTS, suivie de la réaction de la fonction époxy avec le cofacteur NAD(H) pour greffer celui-ci sur le matériau d'électrode constitué de silice (controlled pore glass CPG) et de polypyrrole (PPY) [100], B) Procédures de liaison du cofacteur et de l'enzyme sur une électrode modifiée par du PQQ (EDC étant la carbodiimide 1-ethyl-3-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide) [102], C) Reconstitution de la GOx sur une électrode d'or modifiée. Sur une monocouche de cysteamine-PQQ-FAD, l'apo-GOx vient se fixer sur son cofacteur FAD manquant [103].

2.3.3.3. Immobilisation du médiateur

Les premiers systèmes électroenzymatiques proposés par les capteurs de deuxième génération ont fait intervenir un médiateur libre en solution. Toutefois la problématique d'immobilisation du dernier élément de la chaîne électrocatalytique s'est rapidement posée afin d'éviter les contaminations et la durée de vie des dispositifs électrochimiques qui y ont recours. Comme l'espèce moléculaire assurant la médiation doit évoluer au niveau de l'interface entre électrode et électrolyte, il est courant soit de l'adsorber sur l'électrode soit de la greffer à la matrice de piégeage de l'enzyme.

- **Immobilisation par adsorption physique**

L'adsorption physique étant l'alternative d'immobilisation la plus simple, elle se retrouve très couramment employée pour immobiliser un ou deux éléments simultanément du matériel électrocatalytique. Les électrodes de carbone peuvent être modifiées par un médiateur adsorbé tel que les phénazines [104], les phénoxazines [105], les complexes métalliques [106] ou encore les quinones [107], qui peuvent également s'auto-assembler sur l'or et le platine [108,109]. Il est aussi possible de développer des biocapteurs dont la médiation est assurée par des complexes de fer (II), ruthénium (II) et d'osmium (II) co-adsorbés sur des électrodes de graphite avec de la GOx [110].

Afin d'obtenir des couches d'assemblages plus stables, des médiateurs présentant des fonctions thiol ou amines, sont capables de s'adsorber chimiquement à la surface de l'électrode : ainsi le pont disulfure de la molécule de 5,5'-dithiobis(acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) ou le pont diazote du 2,2'-azinobis(acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) sont capables de se rompre afin d'établir une liaison soufre-métal ou amine-métal avec leur support [111,112]. Mano *et al* ont également synthétisé un médiateur présentant deux groupements nitriles capables de s'adsorber sur l'or [113].

La création de liaisons covalentes entre électrode et médiateur instaure une immobilisation beaucoup plus stable. Les formes réduites des quinones peuvent être attachées par carbodiimine sur des électrodes de carbone fonctionnalisées par des fonctions acides carboxyliques [114]. Comme présenté dans le chapitre précédent, le médiateur PQQ peut aussi se greffer sur le platine et l'or. Des électrodes modifiées au PQQ révèlent une bonne efficacité envers l'oxydation électrocatalytique du NAD(P)H [115].

- **Immobilisation par inclusion physique**

Il est possible de rencontrer des systèmes où la matrice de rétention de l'enzyme permette également de maintenir le médiateur, comme proposé par ce capteur au fructose qui emploie une membrane de polypyrrole pour confiner fructose déshydrogénase (FDH) et ferrocène ou hexacyanoferrate (II) [116]. Le médiateur peut aussi être immobilisé par inclusion dans le matériaux d'électrode à l'aide d'une pâte de carbone [117,118].

- **Immobilisation par greffage covalent sur des polymères encapsulants**

Pour immobiliser efficacement l'enzyme et le médiateur à la surface de l'électrode, l'utilisation de polymères hydrophiles sur lesquels des médiateurs rédox ont été préalablement greffés a donné lieu à de nombreuses études depuis une vingtaine d'années [119]. Les médiateurs ainsi fixés peuvent, par échanges d'électrons de proche en proche d'un centre rédox à l'autre, « connecter électriquement » l'enzyme à l'électrode. Ce type de méthode est réputé pour l'obtention de fortes densités de courant [61]. On dénote ainsi plusieurs autres techniques d'immobilisation par l'électropolymérisation de monomères, typiquement du pyrrole dont une fraction soit liée à un médiateur rédox [120,121], soit mélangée à un polymère rédox déjà constitué [124]. Des adsorptions successives de monocouches de GOx et de polymère rédox à base d'osmium ou de ferrocène sur des électrodes d'or fonctionnalisées ont aussi présenté d'intéressants résultats [30 122]. Enfin un mélange d'enzymes et de polymère rédox peut être déposé sur la surface de l'électrode et chimiquement liés par un agent réticulant [123,124].

On note que pour obtenir une complète immobilisation du système, plusieurs méthodes d'immobilisation sont croisées afin de retenir l'intégralité des biomolécules. Jönsson *et al* propose donc un biocapteur au glucose qui présente une enzyme greffée de façon covalente à une électrode de carbone sur laquelle est ensuite adsorbé un médiateur, le N-méthyle-phénazinium et le cofacteur [104].

Des voies cherchant à se servir du matériau d'électrode, pour assurer directement la régénération du cofacteur sont également explorées avec les oxydes d'étain [¹²⁵] et de ruthénium [¹²⁶].

Afin de conclure sur les différentes techniques d'immobilisation, il est important de prendre en compte l'équilibre à respecter entre une rétention efficace et la conservation de la mobilité des molécules électrocatalytiques. En effet, un système où toutes les biomolécules sont immobilisées doit offrir la possibilité à ces entités de rapprocher leur centre rédox actif les uns des autres pour permettre leur communication électrochimique. Il s'agit donc de trouver un compromis qui permette la réalisation d'un dispositif présentant un taux de conversion électrochimique satisfaisant, pour un système électrocatalytique non libre en solution, mais immobilisé à l'électrode.

2.4 La contre électrode : une électrode à diffusion de gaz

La contre-électrode du réacteur est une électrode à diffusion de gaz. Ces électrodes, selon la terminologie anglaise « gaz diffusion electrode » (GDE), sont utilisées dans les cellules électrochimiques où les gaz sont les produits, comme dans le cas de cellules électrolytiques [¹²⁷] ou bien les réactifs, comme pour les biopiles à combustibles [¹²⁸] et certains biocapteurs [¹²⁹]. Elles permettent en outre une meilleure diffusion de ces réactifs que s'ils avaient été dissous en milieux aqueux. Cette catégorie de dispositif nécessite alors une séparation entre la phase aqueuse et la phase gazeuse. Ces électrodes sont constituées en partie d'une membrane, appelée membrane à électrolyte polymère. Celle-ci doit conduire les protons mais pas les électrons car cela engendrerait des courts-circuits dans le réacteur. Elle ne doit permettre à aucun gaz de passer dans la partie où opère l'électrode de travail. Ce problème est connu sous le nom de « croisement de gaz ». Enfin cette membrane doit être résistante à la fois au milieu oxydant de l'anode, comme à celui réducteur de la cathode. Le type de membrane le plus couramment utilisé est le Nafion® qui est un polymère perfluoré fait à partir de tétrafluoroéthylène. Il s'agit de la première catégorie de polymère à propriété conductrice ionique, aussi appelé ionomère, établi par la présence des groupements éther perfluorovinyl comprenant des fonctions sulfonates.

La structure de cette électrode pour les applications de biopiles à combustibles à électrolyte polymère est passée d'un dispositif à double couche [¹³⁰] à un système trois couches [¹³¹]. Les électrodes à double couches sont constituées d'une couche support hydrophobe faite de fibres de carbone, qui peuvent être éventuellement tissées, et d'une couche électrocatalytique poreuse faite à partir de catalyseur et de carbone mélangé à du polytétrafluoroéthylène (PTFE) pour le caractère hydrophobe et de l'acide polyperfluorosulphonique (Nafion) pour assurer le contact ionique [¹³¹]. Les électrodes à trois couches sont faites à partir du même type de support (Fig. 18): un substrat hydrophobe fait à partir de fibres de carbone, une couche de diffusion microporeuse qui est également constituée de poudre de carbone et de PTFE et d'une couche de catalyseur formée par l'électrocatalyseur supporté par du carbone et du Nafion [¹³²]. L'électrode à diffusion de gaz assure le

transport de réactifs gazeux et des produits gazeux aussi bien que le transport d'électrons. Le caractère hydrophobe de ce type d'électrode empêche la pénétration de produits aqueux dans la structure poreuse de la GDE qui sert au transport de gaz.

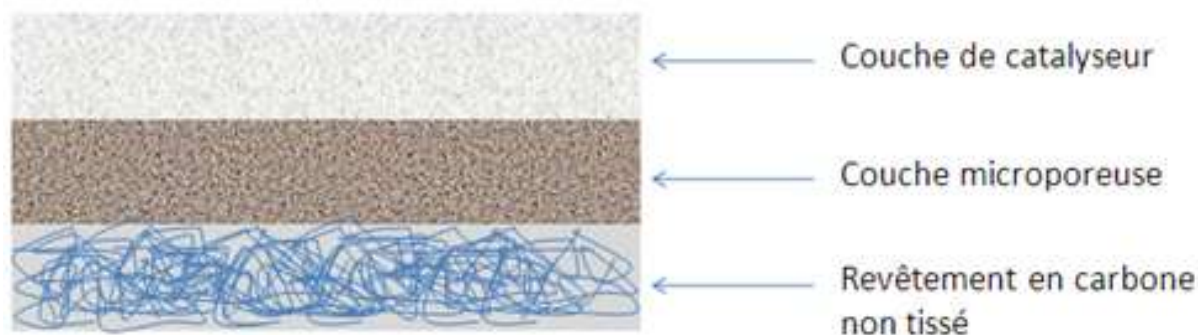


Figure 18 Schéma d'une coupe transverse d'une électrode à diffusion de gaz à trois couches

La structure et la composition de la couche de diffusion microporeuse impacte les performances des GDE et par conséquent le procédé électrocatalytique qui se produit à la surface de l'électrode. Les paramètres à contrôler sont l'épaisseur, l'hydrophobicité et la porosité de la microcouche [133-135]. Le catalyseur utilisé pour la conception de la GDE peut être du platine, du ruthénium, de l'iridium ou du rhodium [136-139]. Le catalyseur employé pour la conception du réacteur dont il est ici question est du platine. Löffler *et al* présentent un travail de préparation électrochimique *in situ* et de caractérisation de catalyseurs faits à partir de platine pour la construction de piles à combustible à membrane électrolyte polymère (polymer electrolyte membrane fuel cell PEMFC) [140-143]. La GDE du bioréacteur sera un revêtement de la couche de diffusion par le mélange contenant le catalyseur [144].

Si la réaction qui se produit sur l'électrode de travail du réacteur est une oxydation, alors la contre-réaction est la réduction de l'oxygène délivré à la contre-électrode. Dans le cas opposé d'une réaction de réduction à l'électrode de travail, la contre-électrode est alimentée par du dihydrogène qui subit une oxydation et délivre alors un flux de protons purs dans le catholyte. D'autre part on note que les produits de ces contre-réactions, respectivement H_2O et H^+ , n'engendrent pas de réactions secondaires contribuant ainsi à améliorer le rendement faradique et la durée de vie du dispositif.

2.5 Réacteur électrochimique avec régénération du cofacteur: état de l'art

L'élaboration de bioréacteurs faisant intervenir la régénération électrochimique du cofacteur, ainsi qu'une chaîne électrocatalytique entièrement immobilisée, fonctionnant sous flux et ayant pour contre-électrode une GDE n'a jusqu'à présent jamais été reportée dans la littérature scientifique internationale. La récente publication en 2010 de Ngamson *et al* a toutefois proposé un système dont le principe de fonctionnement est relativement similaire à celui abordé ici. Par immobilisation du cofacteur et de l'enzyme sur un matériau d'électrode en verre à porosité contrôlée recouvert de polypyrrole, l'équipe anglaise arrive à effectuer la synthèse de composés chiraux sous flux continu en assurant la régénération du cofacteur [100]. Toutefois la plupart des publications relatives à la conception d'un réacteur électrochimique présentent une ou la combinaison de seulement deux des caractéristiques ci-dessus mentionnées. Par exemple en 1996, un réacteur propose la réduction stéréosélective du α -kétooglutarate en L-glutamate avec une régénération électrochimique du cofacteur par l'emploi d'une enzyme, la diaphorase, et un médiateur le p-iodonitrotetrazolium violet formazan [145], mais le réacteur n'opère pas sous flux et aucune des biomolécules n'est immobilisée. La construction du micro-réacteur à flux laminaire de Yoon *et al* propose une régénération du NADH par le flavine adénine dinucléotide (FAD) qui tient lieu de médiateur, avec l'emploi de la formate déshydrogénase comme enzyme couplée, sans que les composants électrochimiques ne soient immobilisés [146]. Les travaux du même auteur montrent que ce type de microréacteur à flux est capable d'opérer une régénération du cofacteur efficace avec un taux de conversion pouvant aller jusqu'à 30% [147]. Cependant comme le système catalytique du dispositif est libre en solution, le problème de purification du flux pour isoler le substrat se pose pour ce genre de procédé. Le stockage du cofacteur dans une membrane par rétention électrostatique a été étudié par Obon *et al* : le polymère cationique poly(éthylèneimine) (PEI) peut en effet maintenir le cofacteur dans une membrane, et ce, même sous un flux continu de substrat [148]. Les réacteurs électrochimiques à membranes peuvent aussi offrir la possibilité de confiner l'enzyme à proximité de l'électrode sans qu'elle ait besoin d'être immobilisée mais ceci n'empêche pas la pollution du milieu par des biomolécules constituant la chaîne catalytique [149].

Le réacteur électroenzymatique à membrane de Chen *et al* montre des rendements relativement satisfaisants atteignant jusqu'à 70% pour la synthèse du lactate à partir du pyruvate. Le système permettant d'obtenir ces résultats est composé d'une cathode de graphite poreux sur laquelle sont immobilisés la diaphorase et le méthyl viologène, le cofacteur et la lactate déshydrogénase étant libres en solution [150].

Comme la conception des bioréacteurs intégrant la régénération électrochimique du cofacteur présente un enjeu d'intérêt pour l'industrie, on trouve également plusieurs brevets exposant le design de tels dispositifs. Ainsi le brevet déposé par Bourdillon *et al* décrit une opération cyclique qui assure la régénération du cofacteur dans un réacteur électrochimique [151].

En outre, le caractère innovant que présente la conception du réacteur dont il est ici question réside également dans la combinaison d'une électrode de travail, siège de réactions bioélectrochimiques pour réaliser une électrosynthèse, et d'une contre-électrode GDE. En effet, il est rare de retrouver ce type d'électrode dans des dispositifs de bioélectrosynthèse. Les GDE peuvent être utilisées pour l'électrosynthèse de dichlore via l'électrolyse de HCl, comme en témoignent le brevet de Czerwiec [152]. Il existe également un brevet américain proposant une application en électrosynthèse de la GDE avec la description d'une cellule capable d'effectuer l'oxydation électrocatalytique de l'éthylène et du méthane [153]. On retrouve également ce type d'électrode dans des dispositifs électrocatalytiques visant à produire du peroxyde d'hydrogène [154] ou des molécules plus complexes comme l'acide aminé N-acétyl-L-cystéine par électroréduction du N,N-diacétyl-L-cystine [155]. Les seules applications actuelles qui proposent la combinaison d'une électrode de travail où a lieu une réaction électroenzymatique et d'une contre-électrode GDE sont les biopiles à combustible, les biocapteurs et les dispositifs de dépollution [129,156,157].

Références Bibliographiques

- (1) Bard, A. J.; Stratman, M. *Encyclopedia of Electrochemistry* **2002**, Vol.9, Bioelectrochemistry, Wiley-VCH.
- (2) Wang, J. *Analytical Electrochemistry Second Edition* **2000**, Wiley-VCH.
- (3) Quinn, C. A. P.; Connor, R. E.; Heller, A. *Biomaterials* **1997**, *18*, 1665.
- (4) Besteman, K.; Lee, J.-O.; Wiertz, F. G. M.; Heering, H. A.; Dekker, C. *Nano Letters* **2003**, *3*, 727.
- (5) Minteer, S. D.; Liaw, B. Y.; Cooney, M. J. *Current Opinion in Biotechnology* **2007**, *18*, 228.
- (6) Bagotski, V. S. *Fundamentals of electrochemistry* **2006**, JOHN WILEY & SONS, INC.
- (7) http://fr.wikipedia.org/wiki/Chiralit%C3%A9_%28chimie%29.
- (8) Francotte, E. R. *Journal of Chromatography A* **2001**, *906*, 379.
- (9) Yamaguchi, F.; Kamitori, K.; Sanada, K.; Horii, M.; Dong, Y.; Sui, L.; Tokuda, M. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2008**, *106*, 248.
- (10) Lerner, L. M.; Mennitt, G. *Carbohydrate Research* **1994**, *259*, 191.
- (11) Poonperm, W.; Takata, G.; Ando, Y.; Sahachaisaree, V.; Lumyong, P.; Lumyong, S.; Izumori, K. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2007**, *103*, 282.
- (12) Menavuvu, B. T.; Poonperm, W.; Leang, K.; Noguchi, N.; Okada, H.; Morimoto, K.; Granström, T. B.; Takada, G.; Izumori, K. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2006**, *101*, 340.
- (13) Huwig, A.; Emmel, S.; Giffhorn, F. *Carbohydrate Research* **1996**, *281*, 183.
- (14) Brasholz, M.; Reissig, H. U. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 3595.
- (15) Fujiwara, T.; Hayashi, M. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 9161.
- (16) Vogel, P. *Current Organic Chemistry* **2000**, *4*, 455.
- (17) Müller, T.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 5473.
- (18) Antonakis, K.; Arvor-Egron, M. J.; Leclercq, F. *Carbohydrate Research* **1972**, *25*, 518.
- (19) Granström, T. B.; Takata, G.; Tokuda, M.; Izumori, K. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2004**, *97*, 89.
- (20) Li, Z.; Cai, L.; Qi, Q.; Styslinger, T. J.; Zhao, G.; Wang, P. G. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* *in press*.
- (21) Dambe, T. R.; Kuhn, A. M.; Brossette, T.; Giffhorn, F.; Scheidig, A. J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 10030.
- (22) Jose, J.; Von Schwichow, S. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 491.
- (23) Giffhorn, F.; Köpper, S.; Huwig, A.; Freimund, S. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *27*, 734.
- (24) López-Montesinos, P. O.; Yossakda, N.; Schmidt, A.; Brushett, F. R.; Pelton, W. E.; Kenis, P. J. A. *Journal of Power Sources* **2011**, *196*, 4638.
- (25) Quinton, D.; Girard, A.; Thi Kim, L. T.; Raimbault, V.; Griscom, L.; Razan, F.; Griveau, S.; Bedioui, F. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, **2011**, *11*, 1342.

- (26) Chen, Q.; Wang, Q.; Zhang, J.; Yuan, J. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, **2011**, 54, 1994.
- (27) Jia, F.; Yu, C.; Zhang, L. *Electrochemistry Communications* **2009**, 11, 1944.
- (28) Flexer, V.; Brun, N.; Backov, R.; Mano, N. *Energy and Environmental Science*, **2010**, 3, 1302.
- (29) Rajesh; Ahuja, T.; Kumar, D. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, 136, 275.
- (30) Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, K.; Bartlett, P. N. *Langmuir* **1997**, 13, 2708.
- (31) Xiao, Y.; Ju, H.-X.; Chen, H.-Y. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 391, 73.
- (32) Lojou, E. *Electrochimica Acta*, **2011**, 56, Iss. 28, 10385.
- (33) Haruyama, T. *Electrochemistry*, **2010**, 78, 888.
- (34) Khor, S. M.; Liu, G.; Fairman, C.; Iyengar, S. G.; Gooding, J. J. *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, 26, 2038.
- (35) Wang, J.; Katz, E. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 398, 1591.
- (36) De Leo, M.; Kuhn, A.; Ugo, P. *Electroanalysis* **2007**, 19, 227.
- (37) Lu, X.; Balk, T. J.; Spolenak, R.; Arzt, E. *Thin Solid Films* **2007**, 515, 7122.
- (38) Hakamada, M.; Mabuchi, M. *J. Alloys Compd* **2009**, 479, 326.
- (39) Siyu, H.; Xinyu, L.; Qingyu, L.; Mianwu, M.; Tengfa, L.; Hongqiang, W.; Zhiliang, J. *Materials Letters*, **2010**, 64, 2296.
- (40) Zhong, G.; Liu, A.; Chen, X.; Wang, K.; Lian, Z.; Liu, Q.; Chen, Y.; Du, M.; Lin, X. *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, 26, 3812.
- (41) Yamaguchi, A.; Iimura, T.; Hotta, K.; Teramae, N. *Thin Solid Films*, **2011**, 519, 2415.
- (42) Xiao, X.; Roberts, M. E.; Wheeler, D. R.; Washburn, C. M.; Edwards, T. L.; Brozik, S. M.; Montano, G. A.; Bunker, B. C.; Burckel, D. B.; Polsky, R. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2010**, 2, 3179.
- (43) Martin, C. R.; Mitchell, D. T. *Electroanalytical Chemistry* **1999**, 21, 1-74.
- (44) Kyotani, T.; Tsai, L.-f.; Tomita, A. *Chemistry of Materials* **1996**, 8, 2109.
- (45) Lai, M.; Riley, D. J. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 323, 203.
- (46) Martin, C. R. *Chemistry of Materials* **1996**, 8, 1739.
- (47) Zhao, Y.; Chen, M.; Xu, T.; Liu, W. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, 257-258, 363.
- (48) B. Le, D.; Passerini, S.; Guo, J.; Ressler, J.; Owens, B. B.; Smyrl, W. H. *Journal of The Electrochemical Society* **1996**, 143, 2099.
- (49) Hu, K.; Lan, D.; Li, X.; Zhang, S. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 9124.
- (50) Wang, S. C.; Yang, F.; Silva, M.; Zarow, A.; Wang, Y.; Iqbal, Z. *Electrochemistry Communications* **2009**, 11, 34.
- (51) Reculosa, S.; Heim, M.; Gao, F.; Mano, N.; Ravaine, S.; Kuhn, A. *Adv. Funct. Mat.* **2011**, 21, 691.
- (52) Evans, S. A. G.; Elliott, J. M.; Andrews, L. M.; Bartlett, P. N.; Doyle, P. J.; Denuault, G. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 1322.

- (53) Urbanová, V.; Vytras, K.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications*, **2010**, 12, 114.
- (54) Szamocki, R.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Bartlett, P.N.; Kuhn, A.; Hempelmann, R.; *Angewandte Chemistry. International Edition*. **2006**, 45, 1317-1321.
- (55) Urbanová, V.; Li, Y.; Vytras, K.; Yvert, B.; Kuhn, A. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2011**, 656, 91.
- (56) Park, S.; Song, Y. J.; Boo, H.; Chung, T. D. *The Journal of Physical Chemistry C*, **2010**, 114, 8721.
- (57) De Maria, L.; Vind, J.; Oxenbøll, K.; Svendsen, A.; Patkar, S. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, 74, 290.
- (58) Nanba, H.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Takahashi, S. *Organic Process Research & Development* **2007**, 11, 503.
- (59) Cosnier, S. *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, 14, 443.
- (60) Pailley, P.; Cosnier, S.; Coche-Guérente, L. *Analytical Letters* **2000**, 33, 1733.
- (61) Wang, J. *Chemical Reviews* **2007**, 108, 814.
- (62) Yoo, E.-H.; Lee, S.-Y. *sensor* **2010**, 10, 4558-4576.
- (63) Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, 17, 441.
- (64) Takagi, K.; Kano, K.; Ikeda, T. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, 445, 211.
- (65) Serban, S.; El Murr, N. *Electrochimica Acta* **2006**, 51, 5143.
- (66) Creanga, C.; El Murr, N. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2011**, 656, 179.
- (67) Tzedakis, T.; Cheikhou, K.; Jérôme, R.; Karine, G. S.; Olivier, R. *Electrochimica Acta*, **2010**, 55, 2286.
- (68) Johannes, T. W.; Woodyer, R. D.; Zhao, H. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, 96, 18.
- (69) Damian, A.; Maloo, K.; Omanovic, S. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **2007**, 21, 21.
- (70) Curulli, A.; Carelli, I.; Trischitta, O.; Palleschi, G. *Biosensors and Bioelectronics* **1997**, 12, 1043.
- (71) Pandey, P. C.; Upadhyay, S.; Upadhyay, B. C.; Pathak, H. C. *Analytical Biochemistry* **1998**, 260, 195.
- (72) Délécouls-Servat, K.; Basséguy, R.; Bergel, A. *Bioelectrochemistry* **2002**, 55, 93.
- (73) Hollmann, F.; Witholt, B.; Schmid, A. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, 19-20, 167.
- (74) Günther, H.; Paxinos, A. S.; Schulz, M.; van Dijk, C.; Simon, H. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1990**, 29, 1053.
- (75) Schuhmann, W.; Kranz, C.; Huber, J.; Wohlschläger, H. *Synthetic Metals* **1993**, 61, 31.
- (76) Lötzbeyer, T.; Schuhmann, W.; Schmidt, H.-L. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1996**, 33, 50.
- (77) Ferapontova, E.; Schmengler, K.; Borchers, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, 17, 953.

- (78) Paddock, R. M.; Bowden, E. F. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1989**, 260, 487.
- (79) Csöregi, E.; Jönsson-Pettersson, G.; Gorton, L. *Journal of Biotechnology* **1993**, 30, 315.
- (80) Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Xu, Z.; Dong, S. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 21, 984.
- (81) Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F. D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 400, 91.
- (82) Scheller, F.; Schubert, F. *Biosensors: Techniques and instrumentation in analytical chemistry* **1992**, Vol. 11., Elsevier.51.
- (83) Car, P. V.; L.D., B. *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*. **1980**, Willey, NewYork.
- (84) Ben-Ali, S.; Cook, D. A.; Bartlett, P. N.; Kuhn, A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, 579, 181.
- (85) Sprules, S. D.; Hart, J. P.; Wring, S. A.; Pittson, R. *Analytica Chimica Acta* **1995**, 304, 17.
- (86) Mano, N.; Kuhn, A. *Talanta* **2005**, 66, 21.
- (87) Netchiporouk, L. I.; Shram, N. F.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Cespuglio, R. *Analalytical Chemistry Communication* **1996**, 68, 4358.
- (88) Wu, H. M.; Olier, R.; Jaffrezic-Renault, N.; Clechet, P.; Nyamsi, A.; Martelet, C. *Electrochimica Acta* **1994**, 39, 327.
- (89) Singhal, R.; Gambhir, A.; Pandey, M. K.; Annapoorni, S.; Malhotra, B. D. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, 17, 697.
- (90) Wang, Z.; Mathieu, E.; Kohring, G.-W.; Bon-Saint-Côme, Y.; Kuhn, A.; Walcarius, A. *Electrochim. Acta* **2011**, 56, 3032.
- (91) Liu, W.; Wang, P. *Biotechnology Advances*, **2007**, 25, 369.
- (92) Hart, J. P.; Abass, A. K.; Cowell, D. C.; Chappell, A. *Electroanalysis* **1999**, 11, 406.
- (93) Sprules, S. D.; Hart, J. P.; Pittson, R.; Wring, S. A. *Electroanalysis* **1996**, 8, 539.
- (94) Furukawa, S.; Katayama, N.; Iizuka, T.; Urabe, I.; Okada, H. *FEBS Letters* **1980**, 121, 239.
- (95) Wykes, J. R.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. *Biotechnology and Bioengineering* **1975**, 17, 51.
- (96) Zappelli, P.; Pappa, R.; Rossodivita, A.; Re, L. *European Journal of Biochemistry* **1977**, 72, 309.
- (97) Larsson, P.-O.; Mosbach, K. *FEBS Letters* **1974**, 46, 119.
- (98) Scheper, T.; Likidis, Z.; Makryaleas, K.; Nowotny, C.; Schügerl, K. *Enzyme and Microbial Technology* **1987**, 9, 625.
- (99) Montagné, M.; Marty, J.-L. *Analytica Chimica Acta* **1995**, 315, 297.
- (100) Ngamsom, B.; Hickey, A. M.; Greenway, G. M.; Littlechild, J. A.; McCreedy, T.; Watts, P.; Wiles, C. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2010**, 8, 2419.
- (101) Khayyami, M.; Garcia, N. P.; Larsson, P.-O.; Danielsson, B.; Johansson, G. *Electroanalysis* **1997**, 9, 523.

- (102) Bardea, A.; Katz, E.; Bückmann, A. F.; Willner, I. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 9114.
- (103) Willner, I.; Heleg-Shabtai, V.; Blonder, R.; Katz, E.; Tao, G.; Bückmann, A. F.; Heller, A. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 10321.
- (104) Jönsson, G.; Gorton, L. *Biosensors* **1985**, *1*, 355.
- (105) Gorton, L.; Torstensson, A.; Jaegfeldt, H.; Johansson, G. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1984**, *161*, 103.
- (106) Smolander, M.; Livio, H. L.; Räsänen, L. *Biosensors and Bioelectronics* **1992**, *7*, 637.
- (107) Huck, H.; Schmidt, H.-L. *Angewandte Chemie* **1981**, *93*, 421.
- (108) Lorenzo, E.; Sánchez, L.; Pariente, F.; Tirado, J.; Abruña, H. D. *Analytica Chimica Acta* **1995**, *309*, 79.
- (109) Kunitake, M.; Akiyoshi, K.; Kawatana, K.; Nakashima, N.; Manabe, O. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1990**, *292*, 277.
- (110) Zakeeruddin, S. M.; Fraser, D. M.; Nazeeruddin, M. K.; Grätzel, M. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1992**, *337*, 253.
- (111) Santhiago, M.; Lima, P. R.; Santos, W. d. J. R.; Kubota, L. T. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2010**, *146*, 213.
- (112) Mousty, C. *Applied Clay Science* **2004**, *27*, 159.
- (113) Mano, N.; Thienpont, A.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **2001**, *3*, 585.
- (114) Tse, D. C.-S.; Kuwana, T. *Analytical Chemistry* **1978**, *50*, 1315.
- (115) Katz, E.; Lötzbeyer, T.; Schlereth, D. D.; Schuhmann, W.; Schmidt, H.-L. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, *373*, 189.
- (116) Khan, G. F.; Kobatake, E.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. *Analytica Chimica Acta* **1993**, *281*, 527.
- (117) Ikeda, T.; Shibata, T.; Todoriki, S.; Senda, M.; Kinoshita, H. *Analytica Chimica Acta* **1990**, *230*, 75.
- (118) Ivanova, E. V.; Sergeeva, V. S.; Oni, J.; Kurzawa, C.; Ryabov, A. D.; Schuhmann, W. *Bioelectrochemistry* **2003**, *60*, 65.
- (119) Heller, A. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 664.
- (120) Vilkanaukyte, A.; Erichsen, T.; Marcinkeviciene, L.; Laurinavicius, V.; Schuhmann, W. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, *17*, 1025.
- (121) Habermüller, K.; Ramanavicius, A.; Laurinavicius, V.; Schuhmann, W. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1383.
- (122) Flexer, V.; Ielmini, M. V.; Calvo, E. J.; Bartlett, P. N. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74*, 201.
- (123) Gregg, B. A.; Heller, A. *Analytical Chemistry* **1990**, *62*, 258.
- (124) Gregg, B. A.; Heller, A. *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 5976.
- (125) Kim, Y. H.; Yoo, Y. J. *Enzyme and Microbial Technology* **2009**, *44*, 129.
- (126) Lenz, J.; Trieu, V.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Electroanalysis*, **2011**, *23*, 1186.
- (127) Faverjon, F.; Rakib, M.; Durand, G. *Electrochimica Acta* **2005**, *51*, 386.
- (128) Gyenge, E. L. *Journal of Power Sources* **2005**, *152*, 105.

- (129) Kaisheva, A.; Iliev, I.; Christov, S.; Kazareva, R. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1997**, *44*, 571.
- (130) Gharibi, H.; Zhiani, M.; Entezami, A. A.; Mirzaie, R. A.; Kheirmand, M.; Kakaei, K. *Journal of Power Sources* **2006**, *155*, 138.
- (131) Tseng, C.-J.; Lo, S.-K. *Energy Conversion and Management*, **2010**, *51*, 677.
- (132) Giorgi, L.; Antolini, E.; Pozio, A.; Passalacqua, E. *Electrochimica Acta* **1998**, *43*, 3675.
- (133) Aricò, A. S.; Antonucci, V.; Alderucci, V.; Modica, E.; Giordano, N. *Journal of Applied Electrochemistry* **1993**, *23*, 1107.
- (134) Maoka, T. *Electrochimica Acta* **1988**, *33*, 379.
- (135) Paganin, V. A.; Ticianelli, E. A.; Gonzalez, E. R. *Journal of Applied Electrochemistry* **1996**, *26*, 297.
- (136) Gharibi, H.; Mirzaie, R. A.; Shams, E.; Zhiani, M.; Khairmand, M. *Journal of Power Sources* **2005**, *139*, 61.
- (137) Gullá, A. F.; Gancs, L.; Allen, R. J.; Mukerjee, S. *Applied Catalysis A: General* **2007**, *326*, 227.
- (138) Santiago, E. I.; Paganin, V. A.; do Carmo, M.; Gonzalez, E. R.; Ticianelli, E. A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, *575*, 53.
- (139) Yao, W.; Yang, J.; Wang, J.; Nuli, Y. *Electrochemistry Communications* **2007**, *9*, 1029.
- (140) Natter, H.; Hempelmann, R. *Electrochimica Acta* **2003**, *49*, 51.
- (141) Löffler, M. S.; Natter, H.; Hempelmann, R.; Wippermann, K. *Electrochimica Acta* **2003**, *48*, 3047.
- (142) Löffler, M. S.; Groß, B.; Natter, H.; Hempelmann, R.; Krajewski, T.; Divisek, J. *Scripta Materialia* **2001**, *44*, 2253.
- (143) Löffler, M. S.; Gro; Natter, H.; Hempelmann, R.; Krajewski, T.; Divisek, J. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3*, 333.
- (144) Natter, H.; Keller, V.; Hempelmann, R.; Lopez, M.; Solvcore: United States Patent, 2008; 20100273085.
- (145) Cantet, J.; Bergel, A.; Comtat, M. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *18*, 72.
- (146) Yoon, S. K.; Choban, E. R.; Kane, C.; Tzedakis, T.; Kenis, P. J. A. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 10466.
- (147) Yoon, S. K.; Fichtl, G. W.; Kenis, P. J. A. *Lab on a Chip* **2006**, *6*, 1516.
- (148) Obón, J.; Almagro, M. J.; Manjón, A.; Iborra, J. *Journal of Biotechnology* **1996**, *50*, 27.
- (149) Délécouls-Servat, K.; Basséguy, R.; Bergel, A. *Chemical Engineering Science* **2002**, *57*, 4633.
- (150) Chen, X.; Fenton, J. M.; Fisher, R. J.; Peattie, R. A. *Journal of the Electrochemical Society* **2004**, *151*, E56.
- (151) Bourdillion, C.; Moiraux, J.; Bonnefoy, J. P. B.; Lava, J.-M. 1990; EP 355 102 B1.
- (152) Czerwiec, D.; Allen, R. J.; Giallombardo, J.; Shaikh, K. 1999; CA19992259836 19990120.
- (153) Pletcher, D.; Genders, J. D.; Weinberg, N. L.; Spiegel, E. 1994; Vol. US 5 246 551.

(154) Giomo, M.; Buso, A.; Fier, P.; Sandonà, G.; Boye, B.; Farnia, G. *Electrochimica Acta* **2008**, *54*, 808.

(155) Montiel, V.; Sáez, A.; Expósito, E.; García-García, V.; Aldaz, A. *Electrochemistry Communications*, **2010**, *12*, 118.

(156) Benziger, J.; Nehlsen, J.; Blackwell, D.; Brennan, T.; Itescu, J. *Journal of Membrane Science* **2005**, *261*, 98.

(157) Hara, K.; Kamata, M.; Sonoyama, N.; Sakata, T. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, *451*, 181.

Chapitre 3

Cristaux colloïdaux

3 Cristaux colloïdaux

3.1 Introduction aux cristaux colloïdaux

La matière peut se trouver à l'état liquide, gazeux ou solide. Un système colloïdal se définit comme étant un de ces états finement dispersé dans un autre. Les différents systèmes colloïdaux qui peuvent être considérés sont répertoriés dans le tableau suivant :

		Phase continue		
		gaz	liquide	solide
Phase dispersée	gaz	rien	mousse	mousse solide
	liquide	aérosol liquide	émulsion	gel
	solide	aérosol solide	sol	solide

Les systèmes colloïdaux présentent habituellement des dimensions allant du nanomètre au micromètre, ce qui aboutit à une proportion surface/volume très élevée. La caractéristique principale de ces mélanges est l'effet négligeable de la gravitation sur les particules colloïdales par rapport à ceux de l'agitation thermique, qui ne sont de ce fait pas ou peu enclines à précipiter. Les avancées technologiques de ces dernières décennies ont permis la préparation de nombreux colloïdes de tailles et de compositions diverses. Lorsque les particules colloïdales sont dispersées en solution, elles peuvent fournir un modèle fascinant et pratique pour étudier des principes fondamentaux de physique tels que les transitions de phase [1], les problèmes fondamentaux de cinétique de cristallisation [2,3] et la physique de nucléation et de croissance [4]. Les colloïdes ont des propriétés particulières qui ont une importance pratique remarquable pour de nombreuses technologies car ils offrent la possibilité d'élaborer une large gamme de matériaux d'un intérêt avéré pour les industries agro-alimentaire et cosmétique, de peinture, d'encre, de revêtement et de la photographie. Les différentes applications où les colloïdes rentrent en jeu font appel aux caractéristiques précises qu'ils peuvent présenter telles que leur monodispersité, leur dimension colloïdale, la fonctionnalisation de leur surface et leur capacité à pouvoir s'auto-assembler en réseau cristallin. Nous nous intéressons ici à des systèmes colloïdaux de particules solides dispersées en milieux aqueux. Les particules colloïdales faites à partir de polymère tel que le latex/polystyrène (PS), le poly(méthyl méthacrylate) (PMMA), ont fait l'objet de nombreuses recherches au niveau de leur synthèse et de leurs propriétés structurales dans le domaine de la chimie des polymères [5-7]. La silice est également un matériau couramment utilisé pour la fabrication de particules colloïdales [4]. Des colloïdes faits à partir de

métaux tels que l'argent ou l'or [8] ou de particules de matériaux semi-conducteurs [9] sont aussi utilisés.

Les particules colloïdales de PS ou de silice permettent d'accéder à l'élaboration de cristaux colloïdaux par l'introduction d'une déstabilisation douce de leur dispersion. En effet, grâce à des phénomènes d'auto-assemblage des microsphères colloïdales, des réseaux ordonnés périodiques tridimensionnels de particules qui jouent alors le rôle de « brique de construction élémentaire », peuvent se former. Ces matériaux sont appelés cristaux colloïdaux ou opales artificielles et représentent une classe innovante de matériaux sophistiqués.

De tels systèmes se sont révélés être d'excellents outils pour l'étude des transitions de phase des états désordonnés liquides, à vitreux, en passant par un état ordonné cristallin: ceci a été réalisé par simulations informatiques [10] et par voies expérimentales [11-13]. Un modèle simple établi par Pusey et Van Megan a permis d'établir l'étude du diagramme de phase [11]. Le système en question a été élaboré de façon à ce qu'il se rapproche le plus possible d'un système constitué de sphères dures, avec un potentiel égal à zéro pour des distances inter-particules supérieures à leur diamètre, et un potentiel infini pour les distances inférieures ou égales au diamètre des particules colloïdales. Leur étude s'est basée sur l'utilisation des particules de PMMA de 300 nm de diamètre avec une polydispersité de 0,05. Les particules de PMMA ont été stériquement stabilisées et mises en suspension dans un mélange de liquides choisi de telle façon que l'index de réfraction de celui-ci puisse coïncider avec celui de billes afin que la solution soit la plus transparente possible. La cristallisation des sphères a été induite par sédimentation gravitationnelle. Ce système a permis d'observer qu'avec l'augmentation de la fraction volumique de microparticules colloïdales (f), il se produit une évolution progressive d'un fluide colloïdal, qui se transforme en un fluide et une phase cristalline à partir de $f=0.494$, pour ensuite produire des échantillons complètement cristallisés pour $f>0.545$ et finalement une phase vitreuse amorphe pour $f>0.58$ (Fig. 19). Pour les concentrations les plus élevées, les échantillons deviennent très visqueux et une cristallisation complète ne peut s'y produire même après plusieurs mois de sédimentation. Dans ces échantillons, les particules sont arrangées dans un état similaire à un « verre colloïdal » amorphe, voir figure ci-dessous.

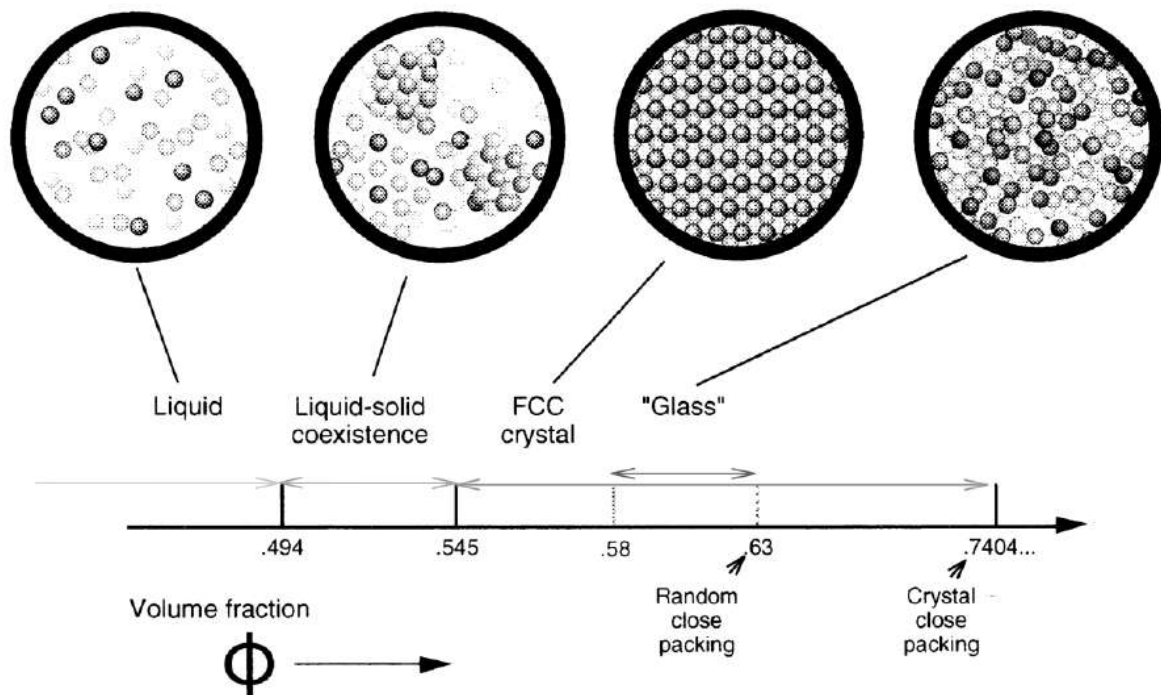


Figure 19 Diagramme de phase obtenu à l'équilibre par simulation informatique de systèmes colloïdaux fait par dispersion de sphères dures [12].

Les parties cristallisées appelées cristallites ont révélé des organisations similaires aux cristaux atomiques ou moléculaires : ces structures régulières à haute compacité peuvent s'arranger en système cubique face centré (cfc) [14] ou hexagonal compact (hc) [15]. La première structure, plus stable d'un point de vue énergétique, ne peut être obtenue par des procédés de cristallisation trop rapide [16]. L'apparition de la seconde, en revanche est expliquée par le fait que cette géométrie réduit les attractions de répulsion entre particules [16]. D'après ces considérations structurales, il est possible d'évaluer théoriquement l'épaisseur, e (cm), d'un cristal formé présentant un empilement compact :

$$e = \frac{N}{N} \cdot d$$

où N est le nombre de couche de billes constituant le cristal, et d le diamètre en cm de celles-ci.

La longueur caractéristique de diffusion pour l'accroissement contrôlé d'un cristal est définie par le temps que prend une particule se rapprochant de l'interface cristal-liquide pour diffuser sur la distance équivalente à son propre diamètre. Comparés aux atomes, des colloïdes d'un demi-micron sont trois fois plus grands, ce qui implique une échelle de temps neuf fois plus courte. C'est pourquoi dans le cas des colloïdes constitués de nanoparticules, le phénomène de cristallisation peut se produire sur une période pouvant atteindre plusieurs jours [12].

Les cristallites colloïdaux présentent une apparence colorée. Ceci s'explique par la diffraction de Bragg de la lumière blanche par les cristaux plans arrangés en réseau cfc, qui sont espacés d'une

distance proche du micromètre, c'est-à-dire de l'ordre de grandeur de la partie visible du spectre de la lumière [17,18]. Les propriétés optiques de ces films peuvent être caractérisées par transmission en incidence normale du visible et du proche infra-rouge. La Figure 20 présente les différents spectres d'absorption obtenus pour différentes tailles de nanoparticules de silice [19]. Les pics obtenus sont étroits ce qui est expliqué par la diffraction de Bragg.

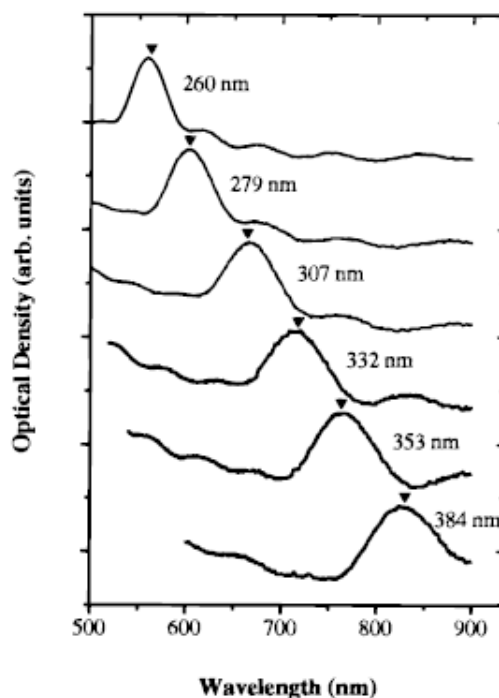


Figure 20 Spectre de transmission en incidence normale pour des cristaux colloïdaux obtenus avec des microsphères de différentes tailles. Ces courbes ont été recalibrées pour obtenir des intensités de pic égales pour plus de clarté [19].

3.2 Cristaux colloïdaux élaborés à partir de microsphères de polystyrène ou de silice auto-assemblées

3.2.1 Microsphères : synthèse et propriétés

- **Elaboration de microsphère de polystyrène**

La polymérisation en émulsion est un procédé original de polymérisation radicalaire en chaîne qui offre la possibilité de synthétiser des nanoparticules de polystyrène en une seule étape, pour des tailles allant de centaines de nanomètres à plusieurs micromètres.

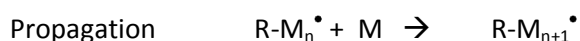
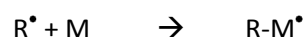
Les principaux constituants intervenant dans une polymérisation en émulsion conventionnelle sont le milieu dispersant (eau), le monomère insoluble dans la phase continue, un tensio-actif et un amorceur insoluble. Lorsque la concentration d'un tensioactif excède sa concentration micellaire critique (CMC), les molécules se rassemblent en structures organisées appelées micelles dont la taille

est de l'ordre d'une centaine de nanomètres. Dans la plupart des réactions de polymérisation en émulsions, la concentration en tensio-actif est nettement supérieure à la CMC, de sorte que la majorité du tensioactif présent est sous forme micellaire.

Lors de l'ajout du monomère insoluble dans la phase aqueuse, seule une faible fraction de ce dernier pourra être accueillie au sein des micelles. La grande majorité des molécules de monomères (~95%) se trouve dans des gouttelettes stabilisées par des molécules de tensioactifs adsorbés à leur surface. Ces gouttes de monomère dont la taille est comprise entre 1 et 10 μm forment l'émulsion. Le partage du monomère entre le milieu aqueux, les micelles et les gouttes réservoirs est contrôlé par un équilibre thermodynamique et dépend de nombreuses variables telles que la structure chimique du monomère, sa solubilité dans l'eau ainsi que les propriétés du tensioactif employé. La réaction de polymérisation conduisant à la formation de nodules se déroule en plusieurs étapes.

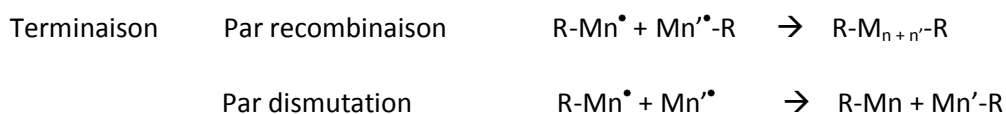
La première étape consiste à dissocier l'amorceur noté A au sein de la phase aqueuse. Les amorceurs les plus couramment utilisés sont des sels minéraux tels que les persulfates ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ou $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) et des composés azoïques (porteurs d'une liaison $\text{N}=\text{N}$) comme l'azobis(isobutyronitrile). Si ces espèces ont pour point commun de posséder des liaisons chimiques peu stables dont la dissociation conduit à la formation de radicaux libres, les modes d'amorçage peuvent en revanche varier : ils peuvent être électrochimique, thermique ou photochimique [20].

Les espèces $\text{R}^\bullet$ ainsi formées réagissent avec une première molécule de monomère M rencontrée dans la phase aqueuse pour former un autre centre actif $\text{R-M}^\bullet$. Ce dernier, de par son caractère radicalaire, agit de façon analogue sur une autre molécule de monomère, permettant ainsi d'initier le processus de polymérisation. La répétition de ce mécanisme constitue la phase de propagation au cours de laquelle se forment les chaînes polymères. Les équations bilan d'une polymérisation radicalaire sont présentées ci-dessous :



Après un petit nombre d'étapes ($n \sim 20$) réalisés exclusivement au sein du milieu aqueux, les molécules formées deviennent des macromolécules à courtes chaînes (oligomères) à réactivité radicalaire. Ces entités, de par leur caractère hydrophobe prédominant, pénètrent au sein des micelles, qui deviennent le siège principal de la réaction de polymérisation. Ainsi les micelles grossissent par adjonction du monomère qui provient de la phase aqueuse, tandis que le volume des gouttelettes réservoir diminue, alimentant les nodules en croissance. A ce stade, chaque micelle se comporte comme un microréacteur indépendant et constitue le siège d'une réaction de polymérisation confinée qui va conduire à la formation d'une particule de polymère unique. La polymérisation n'opère pas dans les gouttelettes de monomères car, leur surface développée étant trop inférieure par rapport à celle des micelles, elles ne peuvent participer à la capture de radicaux.

Enfin le processus de croissance des chaînes polymères peut être suspendu par des réactions de terminaison. Ces dernières correspondent à la rencontre de deux chaînes en croissance (recombinaison) ou de leur désactivation conjointe (dismutation).



Il est généralement admis que chaque micelle est le lieu de croissance d'une chaîne polymère unique. Ainsi la réaction s'interrompt si un second oligoradical pénètre à l'intérieur (réaction de terminaison) formant une micelle « dormante ». Il faut alors attendre qu'un radical entre de nouveaux dans la micelle pour que la polymérisation redémarre. Cette alternance de croissance et d'inactivité des particules polymère se poursuit jusqu'à la consommation complète du monomère. Néanmoins, ce phénomène ne se réalise que dans la mesure où les particules de polymère ne sont pas de dimension trop importante.

Ce procédé peut être modifié afin de s'affranchir de l'utilisation des tensio-actifs tout en assurant la monodispersité des billes obtenues. Deux types de synthèse permettent d'obtenir des colloïdes de cette façon : « la polymérisation en émulsion sans tensio-actif » [21-23] et « la polymérisation en dispersion » [24]. Dans ce travail nous nous intéressons seulement à la première, plus répandue et plus populaire. Le principe de cette synthèse est basé sur l'utilisation d'un monomère non hydrosoluble et d'un initiateur radicalaire hydrosoluble (par exemple le peroxydisulfate de potassium). Le mécanisme de formation de particules s'explique de la façon suivante : les gouttelettes de monomère sont générées par l'agitation mécanique du milieu réactionnel qui crée une perturbation de l'interface monomère/ solution aqueuse. Les gouttelettes de monomères se stabilisent par l'adsorption d'oligomères de courte chaîne générées en début de réaction et produit à la fois dans la phase aqueuse et à l'interface. Ceux-ci vont donc jouer le rôle d'émulsifiant. Le monomère se transfère à partir de la phase de monomère jusqu'aux particules en croissance via la coalescence de gouttelettes de monomères, formées par l'agitation mécanique. Les oligomères de plus longue chaîne, formés pour des plus fortes concentrations en monomère et en initiateur, sont dissoutes en phase aqueuse et conduisent au pontage et à la coagulation des particules synthétisées. Lors de ce procédé, il est important de contrôler le ratio monomère/eau et la charge surfacique des particules par le biais notamment de la concentration en initiateur radicalaire (par exemple le peroxydisulfate de potassium instaure une charge surfacique négative lors de l'accroissement de particule à cause des groupes sulfate). Le contrôle de cette charge surfacique permet non seulement de prévenir les effets de coagulation, mais aussi la monodispersité de la suspension colloïdale.

On relève donc la polymérisation en phase aqueuse de polystyrène et de 4-vinylpyridine qui offre la possibilité de synthétiser des billes monodisperses de 400 nm de diamètre environs [21,25].

Diverses propriétés présentées par les billes de polystyrène vont intervenir dans les mécanismes d'auto-assemblage. On s'intéressera notamment à la charge surfacique qu'elles portent pour

expliquer la présence d'interactions électrostatiques, ou à leur densité pour expliquer leur emploi préférentiel dans certaines techniques d'assemblage.

- **Elaboration de nanosphère de silice**

L'élaboration de nanoparticules de silice fait appel au procédé sol-gel. Ce principe de synthèse sera utilisé à deux reprises dans cette étude : pour la synthèse de billes mais aussi pour l'élaboration de couche de silice encapsulante. Nous proposons ici une explication simple du principe qui peut donc s'appliquer pour la fabrication des deux types d'objets.

Le procédé sol-gel est une méthode simple, peu onéreuse et facilement développable à l'échelle industrielle qui permet l'élaboration de matériau à base de silice. Celle-ci étant présente dans de nombreuses applications, l'intérêt croissant pour la mise au point de procédés d'élaboration innovants a permis le développement de nombreux protocoles capables de générer des structures diverses.

La chimie « sol-gel » se sert de précurseurs à l'état moléculaire, constitués d'un atome métallique tel que le silicium mais aussi le titane, l'aluminium ou le zirconium pour élaborer des matériaux présentant des mises en forme variées, selon une voie dite de « chimie douce », c'est-à-dire s'effectuant à température ambiante, sous pression atmosphérique et à partir de réactifs peu toxiques.

Les précurseurs utilisés déterminent si le procédé sera purement métallique ou métallo-organique. Dans le premier cas il s'agira de sels métalliques sous forme de nitrates ou de chlorure, et dans le second d'alkoxydes métalliques. La voie métallo-organique est la méthode qui représente un intérêt pour cette étude, car elle permet non seulement de réaliser la silice colloïdale dont le procédé est décrit dans ce chapitre, mais aussi des couches mésoporeuses ultra fines qui seront présentées et étudiées dans le chapitre suivant.

Ces alkoxydes sont des molécules de formule générale $M(OR)_n$ où M est l'atome métallique et OR un groupe alkoxy. La réaction de conversion de ces précurseurs en un réseau macromoléculaire s'effectue en deux étapes. Tout d'abord l'hydrolyse totale ou partielle est l'étape qui permet la conversion des groupes MOR en groupe MOH (Fig. 21 A). Ensuite la polycondensation des groupes MOH entre eux va former les oligomères puis des macrochaînes, suivant deux mécanismes possibles : il s'établit soit des liaisons M-O-M (métal-oxygène-métal), appelées liaisons siloxane si M est le silicium, suivi d'une réaction dite d'oxolation, soit des pseudo-complexes $M-(OH)_2-M$ où un des doublet de l'oxygène pontage partiellement un atome de métal adjacent dont le centre métallique n'est donc pas complètement coordonné, selon la réaction qui dans ce cas est dite d'ololation (Fig. 21 B).

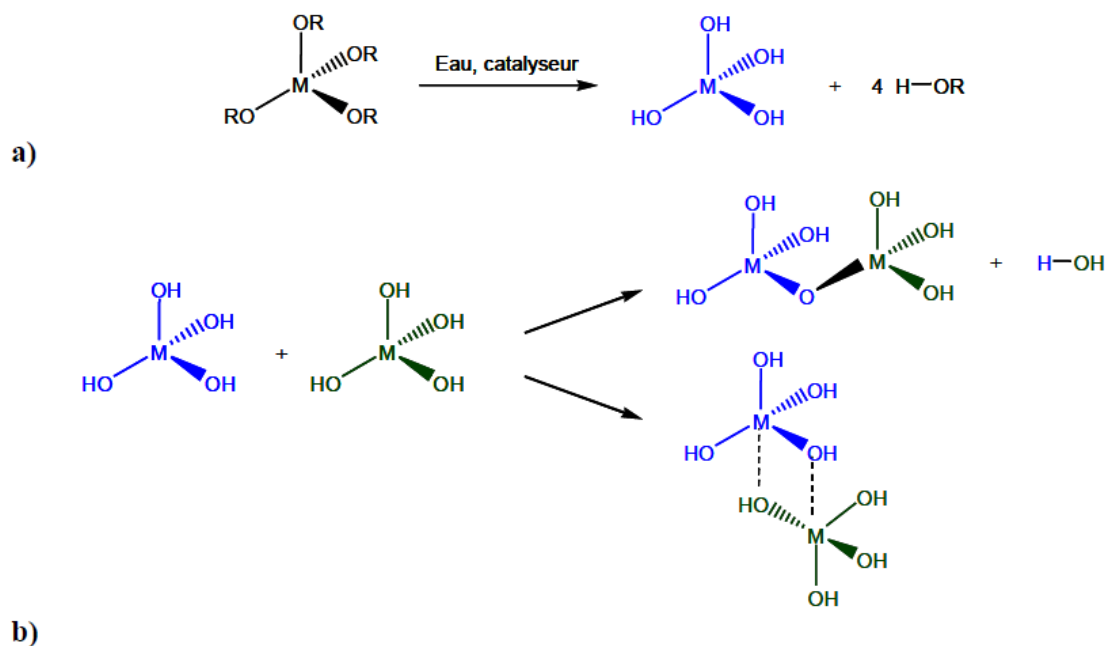


Figure 21 : Représentation schématique du mécanisme réactionnel des procédés sol-gel à base d'alkoxydes métalliques a) réaction d'hydrolyse en présence d'un catalyseur, b) réaction de condensation par oxolation (avec formation d'eau et oxolation [26]).

Les réactions d'hydrolyse et de condensation présentent des cinétiques qui dépendent des caractéristiques physico-chimiques des précurseurs, telles que, par exemple le caractère électrophile de l'atome métallique ou la longueur de la chaîne alkyle R. Comme le silicium est très peu électrophile et ses alkoxydes très peu réactifs, les précurseurs de la silice nécessitent l'emploi d'un catalyseur. En revanche, les précurseurs constitués de zirconium ou de titane déclenchent des réactions dont les vitesses sont très grandes. Ceci s'explique par le fait que ces atomes présentent des nombres de coordination élevés (7 et 6 respectivement) supérieurs à leur degré d'oxydation (+IV), ce qui induit la tendance à augmenter leur nombre de coordination traduite par la réactivité de ces molécules.

Au moment où le processus d'hydrolyse-condensation est initié, il se forme de petits oligomères de l'ordre de la dizaine de nanomètres, présentant des modes de croissance individuels. Comme ils sont en suspension dans un milieu liquide, le système est alors appelé « sol ». Ensuite, au cours de leur croissance, les oligomères évoluent en de plus grosses entités qui, lorsqu'elles atteignent une taille critique pour laquelle elles se retrouvent proches de leur voisine, constituent le « point de gel ». Au-delà de cette limite les réactions de polycondensation se produisent entre ces différents objets, de façon simultanée et de manière isotrope, ce qui aboutit à la formation de matériau tridimensionnel, gonflé par le solvant et le reste des réactifs appelé le « gel ».

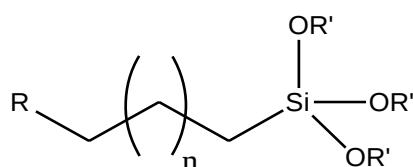
Le procédé sol-gel est la voie chimique qui permet d'obtenir de la silice colloïdale. Il est possible de fabriquer des nanoparticules de ce matériau suivant deux types de procédés. Le premier dit de « Stöber » en référence à son inventeur, consiste en une réaction d'hydrolyse-condensation de

tetraéthoxysilane (TEOS), en milieu alcoolique et avec pour catalyseur une solution aqueuse d'ammoniaque, placée sous agitation continue [4]. Les auteurs présentent ce protocole comme une méthode simple, peu onéreuse, et reproductible pour produire des nanoparticules de silice. L'influence de la nature du précurseur et du solvant a été investiguée par ces auteurs. Ils ont mis en évidence la relation qui existe entre la longueur de la chaîne solvant et la taille des nanoparticules formées : plus le solvant possède une longue chaîne carbonée, plus le diamètre moyen des particules augmente, ce qui s'accompagne d'un élargissement de la distribution des tailles.

Ces travaux, souvent cités en référence ont par la suite été complétés par d'autres études afin d'établir d'une part une compréhension plus précise du mécanisme [27-29], et d'autre part de mieux maîtriser l'efficacité, en jouant notamment sur les paramètres tels que la température du milieu réactionnel [30], la nature du précurseur [30] ou sa concentration [31].

Afin d'obtenir des billes de silice de taille calibrée et monodisperses, nous nous servons du procédé de type Kang. Ces particules serviront à l'élaboration des cristaux colloïdaux. Il s'agit d'un procédé semi-continu en réacteur ouvert où une solution alcoolique de précurseur de silice est ajoutée en continu au milieu réactionnel selon un temps variable [32,33]. L'ajout régulier du précurseur de silice, TEOS, est assuré par un pousse-seringue électronique. Il a été montré que le nombre de particules formées par cette méthode était constant tout au long de la réaction car la condensation des précurseurs de silice ne s'opère qu'à la surface des particules formées, pour une vitesse adaptée suffisamment faible. Le phénomène de croissance étant dans ce cas favorisé par rapport à la formation de nouveaux nucléi.

Les applications pour lesquelles les billes de silice sont destinées nécessitent une fonctionnalisation de leur surface. Cette opération est réalisée à partir de molécules de type trialkoxysilane porteuses du groupe fonctionnel souhaité, où R représente ce groupement espacé de l'atome de silicium par une chaîne alkyle et R' un groupement alkyle à courte chaîne, voir figure ci-dessous:



Le protocole de fonctionnalisation est basé sur une hydrolyse totale des groupements Si-OR' en Si-OH, ses derniers étant susceptibles de se présenter à la surface des billes précédemment synthétisées. Les trialkoxysilanes fonctionnels sont ajoutée au milieu de synthèse des particules colloïdales. Après quelques heures, les molécules s'adsorbent à la surface des billes, puis le milieu est chauffé à 80°C pendant une heure afin de promouvoir l'ancrage covalent du silane par pont siloxane (déplacement de l'équilibre pour pouvoir éliminer l'eau). Le choix de la nature des fonctionnalisations sera expliqué dans la partie 3.2.7 de ce chapitre.

Une fois que les billes sont synthétisées, il faut les purifier du milieu réactionnel pour éliminer les traces de solvant, de précurseurs de silice et d'agent fonctionnalisant. Ceci est d'abord effectué à

l'évaporateur rotatif, qui permet d'éliminer l'ammoniac et la quasi-totalité du solvant. En ce qui concerne l'élimination des excès de réactifs, il existe deux techniques à privilégier.

Les particules de silice de diamètre supérieur à 200 nm (telles que celles que nous avons manipulées dans ce travail) peuvent être simplement séparées du milieu réactionnel par centrifugation. Plusieurs cycles de centrifugation/redispersion (sous agitation mécanique et sous ultra-sons) dans le solvant souhaité sont ainsi appliqués systématiquement. Le solvant en question peut être de l'eau ou de l'éthanol.

Pour évaluer la masse totale de billes synthétisées ou pour faciliter le stockage, il peut être avantageux de récupérer des particules sous forme de poudre sèche. Pour ce faire, lorsque les particules de silice sont lavées et dispersées dans de l'eau distillée à une concentration raisonnable (à hauteur de quelques dizaines de gramme par litre), la lyophilisation est une technique que l'on peut envisager. Elle consiste à travailler avec une dispersion congelée et à en sublimer le solvant pour l'éliminer.

Afin de déterminer le diamètre des billes de silices synthétisées on peut se servir d'un appareil de diffusion dynamique de la lumière DLS (dynamic light scattering), (Fig. 22). Cette méthode est basée sur le principe de diffusion de la lumière par des particules colloïdales soumises à des mouvements thermiques aléatoires, les mouvements Browniens. La diffusion de lumière varie avec le temps, et peut être reliée au coefficient de diffusion des particules dans un milieu donné et donc, par la suite, à un diamètre de particule.

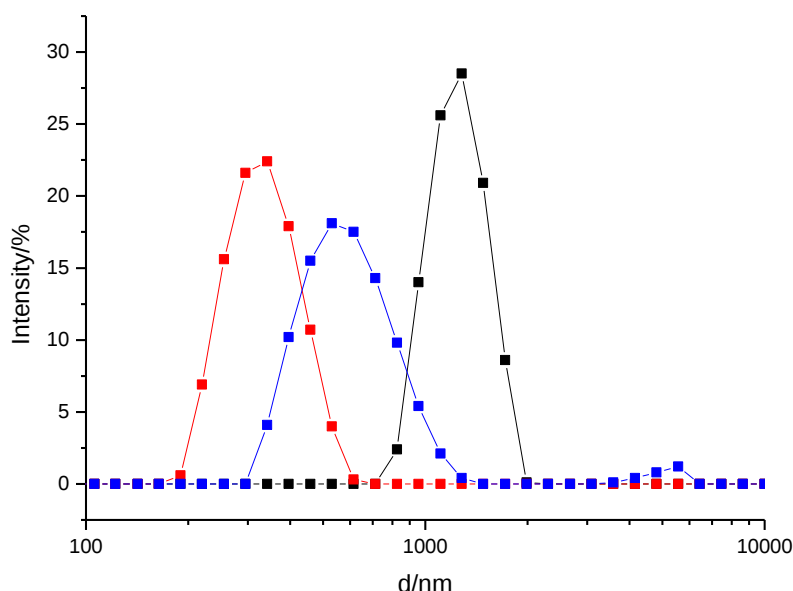


Figure 22 Calcul du diamètre des particules colloïdales de silice par diffusion dynamique de la lumière, issues de trois synthèses différentes. La courbe rouge indique que la première dispersion est constituée de billes de diamètre d'environ 260 nm, la courbe bleue de billes de diamètre d'environ 480 nm et enfin la courbe noire des billes de 1200 nm environ.

3.2.2 Sédimentation

La sédimentation de billes nanométriques est une technique élémentaire et extrêmement simple. Si les billes présentent une densité suffisante pour ressentir les effets de la gravitation, celles-ci peuvent précipiter et se déposer sur le substrat placé au fond de la suspension [34,35]. L'élimination du solvant se produit par évaporation. L'étude de l'impact de la température à laquelle se déroule le procédé a été effectuée par Li *et al* [36]. Suivant la vitesse de sédimentation, l'arrangement des structures obtenues par cette méthode peut-être hexagonal compact (hc) ou cubique face centrée (cfc) [16].

3.2.3 Evaporation horizontale

L'évaporation horizontale est la méthode la plus simple pour obtenir un cristal colloïdal. Le substrat sur lequel l'auto-assemblage des particules colloïdales doit se produire est placé, comme son intitulé l'indique, à l'horizontale et est recouvert d'une solution où les billes de polystyrène sont en suspension. Le processus d'auto-assemblage des billes s'effectue sous l'action de l'évaporation du solvant. Les premières études faites sur ce procédé ont permis d'obtenir des substrats présentant une formation de cristaux bidimensionnels [37,38]. Les cristaux colloïdaux tri-dimensionnels réalisés par cette méthode ont été obtenus par la suite par Sabramania *et al* [39].

Divers mécanismes pouvant expliquer l'auto-assemblage de bille en suspension ont été décrits dans la littérature. Ceux-ci sont à l'origine de la méthode dite de Colvin expliquant la formation du cristal comme étant le résultat de phénomène de capillarité [19] et peuvent s'appliquer à de plus larges sphères telles que les nanoparticules de silice et de polystyrène présentant un diamètre de l'ordre de la centaine de nanomètres [40]. Par exemple les travaux de Im *et al* justifient la formation de cristaux colloïdaux à l'interface air/eau d'un volume conséquent de suspension par l'action combinée d'interactions électrostatiques et de forces latérales de capillarité, aussi appelées forces d'immersion (Fig. 23) [41]. Celles-ci sont également mises en jeu lorsque les sphères colloïdales sont partiellement immergées dans une fine couche de liquide. La déformation du ménisque de liquide cause leur attraction les unes envers les autres. C'est pourquoi le rôle de ces forces dans la formation de cristaux colloïdaux par évaporation horizontale a été considérablement étudié [38,42-44].

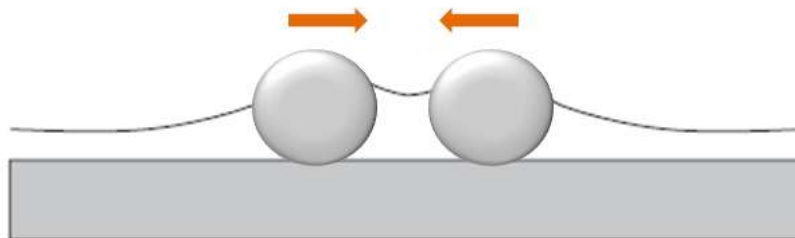


Figure 23 Schéma des forces capillaires latérales responsables de l'auto-assemblage de billes colloïdales pour le procédé d'évaporation horizontale

Toutefois selon Bush *et al*, l'évaporation horizontale serait préférentiellement due à des mécanismes d'auto-assemblage convectifs [45]. Si on considère la tranche d'un film de suspension colloïdale déposé sur un substrat, on remarque que le profil observé est convexe, car l'épaisseur aux coins du film est plus fine que celle en son centre, voir Figure 24 [46]. Suite à l'évaporation progressive du solvant, l'épaisseur de la suspension à la périphérie de la goutte atteint la taille du diamètre des particules qui sont alors concentrées, immobilisées et finalement contraintes de nucléer à cause des forces d'immersion capillaires [45,47]. Comme l'évaporation est plus importante sur les bords de la goutte qu'en son milieu, il se produit un flux convectif du centre vers la périphérie. Les particules de la goutte sont poussées par des transports convectifs vers le ménisque pour s'auto-organiser autour de nucléus et former une structure cristalline grâce aux forces d'attraction capillaires. Comme la cristallisation opère de la périphérie vers le centre, la concentration des particules au centre de la goutte décroît au fur et à mesure du phénomène de cristallisation. Par conséquent, dans cette zone du cristal, l'épaisseur du cristal sera plus faible, voire même, suivant la concentration initiale, absente. Pour pallier cet inconvénient, une procédure rapide et originale de déposition horizontale a été mise en place par Velez *et al* : un cristal colloïdal d'épaisseur contrôlable peut être élaboré en déplaçant, avec une vitesse constante, un faible volume de suspension confinée dans un ménisque créé entre le substrat horizontal sur lequel se forme le dépôt et une autre plaque mise en mouvement. Sa vitesse doit être précisément ajustée afin de permettre au phénomène de cristallisation de se produire dans les conditions optimales [48].

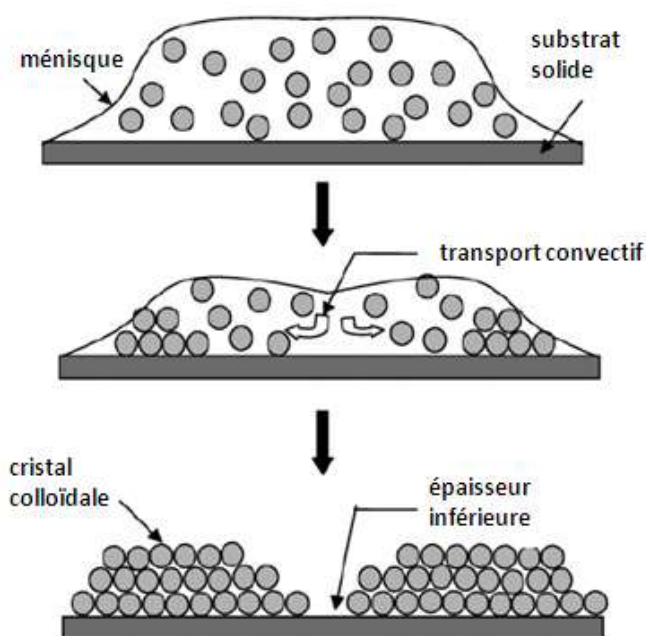


Figure 24 Schéma du mécanisme d'auto-assemblage pour une suspension colloïdale de billes déposées sur un substrat horizontal [46]

3.2.4 Évaporation verticale

Une autre méthode très largement employée pour la constitution de cristaux colloïdaux est l'évaporation verticale [49]. Tout aussi simple d'application que la précédente, elle consiste à disposer un substrat dans un bécher contenant la suspension de sphères colloïdales (à typiquement 1 %_{vol}) à la verticale ou avec un léger angle d'inclinaison (Figure 25). Le film formé par le dépôt des particules à la surface du substrat présente une épaisseur qui augmente suivant que l'on s'éloigne du niveau initial du ménisque [19]. L'évaporation du solvant est le phénomène responsable de la déposition de cet arrangement tridimensionnel de billes. Celles-ci s'organisent sous l'action combinée de phénomènes de capillarité, d'interactions électrostatiques, de tension de surface, d'interactions stériques entre colloïdes et substrat et inter-colloïdes. Ce phénomène est localisé au niveau du ménisque formé par le solvant sur le substrat à l'interface liquide/air. Même si plusieurs explications ont été proposées, une description complète du procédé n'a pas encore été explicitée. Le défi que représente l'optimisation de cette méthode d'élaboration de cristaux colloïdaux réside dans la définition des paramètres expérimentaux pouvant assurer un fort degré de précision et de reproductibilité [50,51]. L'efficacité de l'évaporation verticale réside principalement dans l'équilibre qu'il faut établir entre l'évaporation du solvant et la sédimentation des billes [16]. Si la sédimentation des billes se produit plus rapidement que l'évaporation, l'auto-organisation des billes ne peut s'effectuer. Ce phénomène se réalise de façon plus prononcée avec les billes de silice qu'avec celles de PS, ce qui est expliqué par leur densité supérieure. C'est la raison pour laquelle il est plus

fructueux de travailler avec des billes de taille n'excédant pas les 3 μm . Par exemple si l'on dispose des sphères d'une taille avoisinant les 400 nm, les conditions pour obtenir des cristaux colloïdaux les plus réguliers possibles sur différents types de supports sont faciles à établir, grâce au contrôle que l'on peut avoir sur la fraction de particules en suspension et la taille des sphères [19]. L'influence d'autres paramètres tels que la température et la nature du solvant a été donc étudiée afin d'évaluer leur impact sur la structure du cristal [40]. Par exemple pour parer à la sédimentation des billes, responsable d'une organisation plus aléatoire du cristal en bas de substrat, Vlasov *et al* ont généré un gradient de température dans le bécher contenant la suspension. L'application d'une température plus élevée au bas du récipient permet d'augmenter dans cette zone l'agitation thermique, ainsi que les mouvements de convection qui permettent un meilleur approvisionnement de billes au niveau du ménisque. Ceci a pour conséquence la diminution des défauts formés dans le cristal tels que la formation de joint de grain ou les défauts ponctuels, plus localisés [40]. Un chauffage isothermique de la suspension a aussi été examiné par Wong *et al* [50], cette technique est nommée déposition sous convection. Pour une température fixée à 79.8°C, il permettrait également d'obtenir des films de cristaux colloïdaux dont les défauts sont limités pour des tailles de billes plus grandes sachant que leur utilisation était limitée à cause de leur tendance à sédimenter plus rapidement. Les travaux de Li *et al* ont en revanche révélé que la composition du solvant de la suspension, constitué d'eau et d'alcool, n'avait aucune influence sur la distribution des craquelures dans le cristal. Toutefois ils ont mis en évidence qu'un faible pourcentage d'alcool dans l'eau pouvait améliorer la qualité et l'arrangement de la structure [52]. L'impact du pH et de la force ionique de la solution aqueuse contenant les nanoparticules en suspension aussi été étudié de façon indépendante l'une de l'autre [51]. Ses travaux ont mis en évidence les améliorations apportées à la structure colloïdale constituée dans ce cas de billes de silice, par l'ajustement de la suspension à des pH très acides qui engendrent une diminution des interactions répulsives coulombiennes entre billes, et favorisent de cette façon leur auto-assemblage. De même ils ont également souligné qu'ajuster la force ionique de la suspension par l'ajout de NaCl écranerait les charges surfaciques des colloïdes pour en diminuer les effets de répulsion et favoriser une nouvelle fois l'auto-assemblage. Toutefois il demeure difficile d'obtenir une structure sans défauts, c'est pourquoi les études visant à comprendre les mécanismes de formation des cristaux ont été aussi explorées [53].

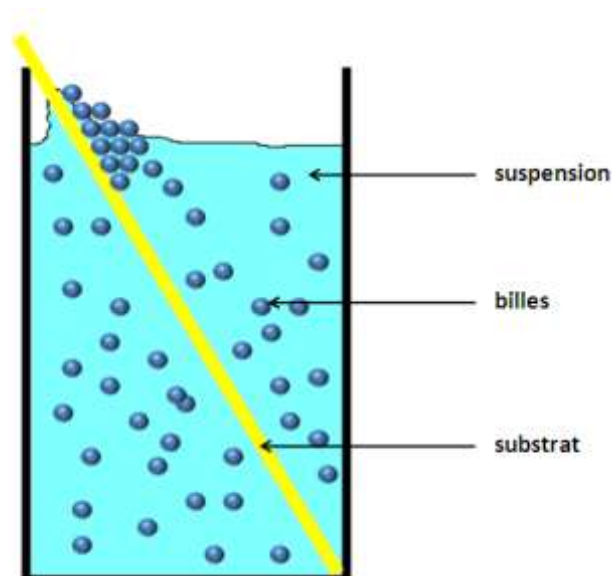


Figure 25 Schéma du mécanisme d'auto-assemblage pour une suspension colloïdale de billes déposées par déposition verticale.

Le désavantage principal que présente la méthode d'évaporation verticale est l'augmentation d'épaisseur du cristal en bas de substrat. Afin donc de prévenir l'augmentation de la concentration de billes en fin d'évaporation, due à leur sédimentation et l'évaporation du solvant, responsable du dépôt inhomogène sur le substrat, il est possible de placer celui-ci verticalement dans le récipient contenant la suspension et de la chauffer de façon à ce que la suspension de billes soit soumise à des mouvements de convections, (Fig. 26). Ceux-ci vont permettre aux billes de ne pas sédimenter et de constamment homogénéiser la concentration globale de la suspension colloïdale [50].

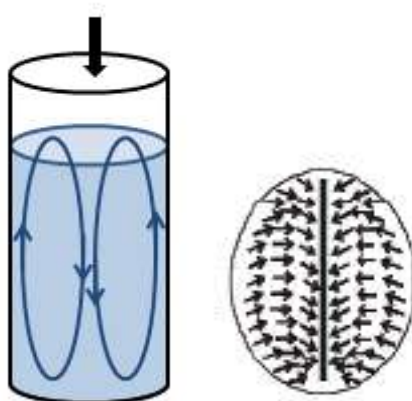


Figure 26 Schéma de l'évaporation verticale assistée par des mouvements de convection. Le substrat est placé à la verticale dans la suspension, dont la concentration se retrouve en permanence homogénéisée par les mouvements de convection.

3.2.5 « Dip-drawing » méthode

La méthode de dip-drawing consiste à tremper (dip) un substrat dans la suspension colloïdale et à l'en retirer (draw) avec une vitesse constante et contrôlable afin de déplacer le ménisque, le long du substrat (Fig. 27). Comme le ménisque est le siège des phénomènes d'auto-assemblage, le dépôt va donc se produire sur le support au fur et à mesure que celui-ci est retiré de la solution contenant les nanoparticules. Il s'agit d'une méthode d'assemblage efficace qui peut autant s'opérer à température ambiante ^[54-56] que sous l'application d'une température donnée ^[57]. L'avantage de la deuxième méthode réside dans sa rapide exécution. En effet quelques minutes suffisent pour élaborer un cristal. De plus, ce procédé n'est pas sensible aux conditions de fabrication. Le point critique de cette méthode réside dans le succès du transfert des billes sur le substrat au niveau du ménisque, ce qui est directement lié à la température à laquelle se trouve la suspension. En effet la température détermine l'évaporation du solvant, les mouvements de convection impactant celui des billes et par conséquent la vitesse d'accroissement du cristal. Les phénomènes responsables de cette arrangement colloïdal sont l'adsorption des billes sur les substrats et, comme précédemment évoqué pour les autres méthodes, les forces de capillarité entre les billes et le substrat et les billes entre elles ^[58]. La qualité de l'arrangement colloïdal est directement dépendante de la vitesse de retrait du substrat et de la température de la suspension.

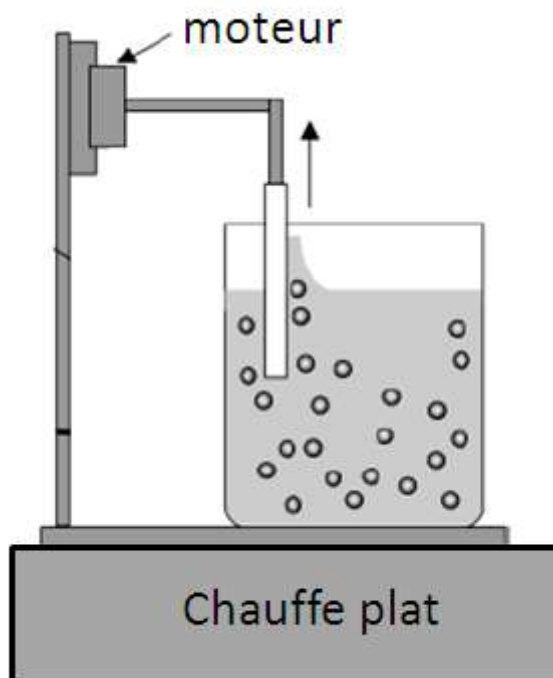


Figure 27 Schéma du dispositif de « dip-drawing » : le b cher contenant la suspension est placé sur un chauffe plat, le substrat   recouvrir est maintenu   la verticale par un bras mécanique assurant le retrait   vitesse constante du substrat de la solution de billes ^[56].

3.2.6 Dépôt électrophorétique

Le dépôt électrophorétique de particules colloïdales utilise la charge portée à leur surface afin de les déplacer par un phénomène de migration sous l'effet d'un champ électrique. Les nanoparticules se trouvent attirées par l'électrode de charge opposée à celle qu'elles portent (Fig. 28). Les caractéristiques de la suspension font que les billes de silice et de PS sont généralement négativement chargées. Au cours du procédé l'anode se trouve donc recouverte d'un assemblage de billes, qui, suivant les conditions expérimentales, peuvent être organisées sous forme de cristal colloïdal. Les microsphères de PS sont fréquemment utilisées pour ce type de dépôt : en effet, la densité de telles particules neutralise les effets éventuels de la gravité qui entrent en compétition avec les phénomènes de migration [59-61]. Les billes de silice, en revanche, sont plus délicates à manipuler. Toutefois, leur indice de réfraction étant plus adapté à l'élaboration de cristaux photoniques, différentes études cherchent à optimiser leur dépôt électrophorétique [62].

Cette méthode d'assemblage colloïdal peut être conduite en milieux aqueux, et dans ce cas les électrodes sont placées parallèlement l'une à l'autre à des distances très proches pour éviter les phénomènes d'électrolyse de l'eau [63]. Le recours à des solvants organiques tel que l'éthanol, permet une élimination (quasi) complète des phénomènes d'électrolyse. De cette manière, les défauts structurels dus à la formation de gaz aux électrodes sont limités [64]. De plus les solvants organiques présentent, au contraire de l'eau, une faible pression capillaire. Ceci permet de minimiser les altérations structurales, occasionnées par l'évaporation du solvant au moment où le substrat est retiré de la cellule d'électrodépôt. Par ailleurs, en jouant sur les paramètres tels que la valeur du champ électrique et le pH de la solution, Huang *et al* ont réussi à limiter les défauts sur les cristaux colloïdaux obtenus par cette méthode [62]. Afin d'obtenir un dépôt électrophorétique cathodique, Radice *et al* [64] a recouvert des billes de PS par une couche de TiO_2 qui permet, dans un environnement expérimental précis, de modifier la charge surfacique des particules vers des valeurs positives. Ceci permet donc d'appliquer un potentiel négatif sur le substrat à recouvrir qui n'est de ce fait, plus soumis à d'éventuels effets d'oxydation.

Trau *et al* propose un mécanisme pour expliquer l'organisation ordonnée des billes de PS sous l'action d'un champ électrique [65]. Durant le dépôt électrophorétique, les particules sont influencées par un procédé à longue portée. Si celui-ci est suffisamment intense, il permet d'assembler les particules en un agrégat cristallin bidimensionnel. Ceci peut se produire car il a été observé que les billes peuvent se mouvoir les unes par rapport aux autres sur la surface de l'électrode sur laquelle elles sont électrodéposées. Cette migration transverse au champ appliqué est suffisamment puissante pour former le cristal bidimensionnel stable. Il est également possible de moduler, grâce au contrôle des paramètres expérimentaux, la magnitude des interactions latérales attractives entre particules déposées pour obtenir un assemblage hautement multicouches [66]. Pour assurer une bonne adhésion des billes à la surface du substrat, une étape supplémentaire de « gel » de celles-ci

est produite par l'application d'un potentiel engendrant un phénomène de coagulation contrôlée entre elles.

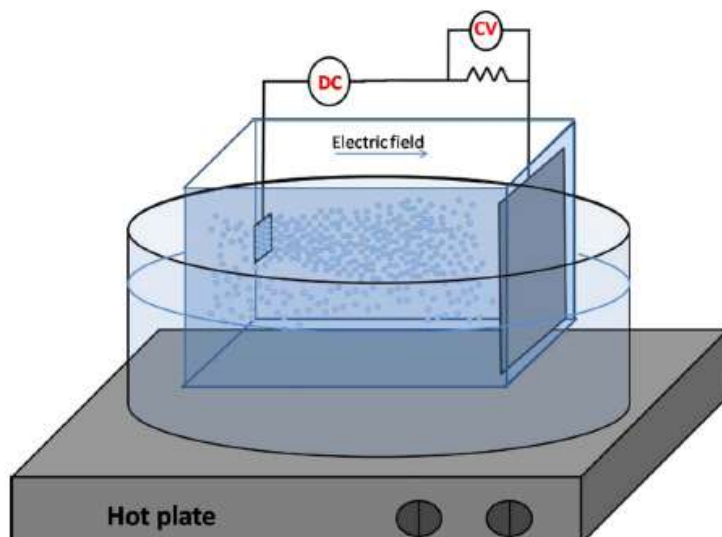


Figure 28 Schéma du dispositif de dépôt électrophorétique : la cellule de dépôt est placée dans un bain thermostaté permettant de maintenir la température de la suspension constante et d'assurer des mouvements de convection limitant la sédimentation des billes [67].

3.2.7 Technique de Langmuir-Blodgett

Le nom de cette technique fait référence au nom de ses créateurs, les physico-chimistes Irving Langmuir (1881-1957) et Katherine Burr Blodgett (1898-1979). Tout au long de sa carrière I. Langmuir s'intéressa à l'étude des forces interfaciales à la surface des liquides. Ses recherches, qui lui valurent le prix Nobel de Chimie en 1932, se sont en partie concentrées sur le comportement de molécules amphiphiles à la surface de l'eau [68]. Ces molécules, qui présentent une tête hydrophile et une chaîne aliphatique hydrophobe, ont la particularité de se placer spontanément aux interfaces. Il a été observé que lorsque ces molécules sont dispersées dans un solvant approprié, il est possible de les épandre à la surface d'une cuve, dite de Langmuir, contenant une sous-phase donnée (typiquement de l'eau) pour former ce qui est appelé un film de Langmuir. Ce procédé favorise le positionnement de ces molécules à l'interface air-eau, car il permet à la tête hydrophile d'être immergée dans l'eau et à la chaîne hydrophobe de rester dans la phase non-aqueuse, c'est-à-dire l'air. L'organisation que ces molécules peuvent présenter donne naissance à différents états appelés phases. On distingue donc la phase « gazeuse », dans laquelle les molécules sont relativement éloignées les unes des autres. Il s'agit dans ce cas non pas d'un gaz au sens commun du terme, qualifié dans ce cas de gaz parfait, mais d'un « gaz » bidimensionnel.

L'équivalent tridimensionnel, répond à la loi des gaz parfaits, vérifiée lorsqu'aucune interaction ne se produit entre molécules :

$$P.V=n.R.T$$

où P est la pression, V le volume occupé, n le nombre de moles, R la constante des gaz parfaits ($8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T la température absolue. De cette équation résulte le tracé du diagramme de phase de la molécule étudiée : il s'agit de diminuer de manière artificielle la distance intermoléculaire moyenne, ce qui revient pour un système à trois dimensions, à augmenter la pression P en réduisant le volume V alloué au gaz. Par analogie avec la loi des gaz parfaits, on détermine la pression surfacique Π pour un gaz bidimensionnel, qui augmente lorsque la surface A disponible pour les molécules diminue :

$$\Pi.A=n.R.T$$

Cette formule n'est valable que si les molécules n'ont aucune interaction les unes avec les autres. Lorsque la pression surfacique augmente, les molécules commencent à interagir faiblement puis de manière forte avant d'être en contact entre elles. Ces trois situations correspondent aux cas des phases « liquide expansé », « liquide condensé » et « solide » (Fig. 29). Au niveau macroscopique, la phase solide correspond au moment où le film de Langmuir est organisé en une monocouche. Toute augmentation de pression du film peut s'accompagner d'une rupture de celui-ci, et de chevauchement de ses différents morcellements, ce qui conduit alors à la création de multicouches. Ce phénomène est appelé « collapse ». Pour obtenir les isothermes de compression, il convient de tracer $\Pi=f(A)$, pour une température constante. La superposition de différentes isothermes d'une même molécule permet de remonter à son diagramme de phase.

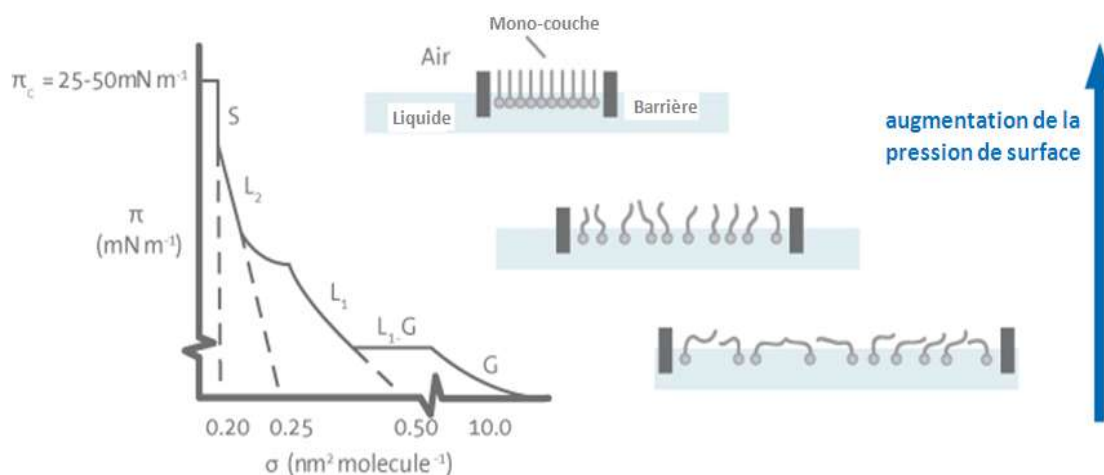


Figure 29 Exemple de courbe isotherme d'une molécule amphiphile, qui montre différentes phases lorsque celle-ci est organisée sous forme de film monocouche à l'interface air-eau. Le plateau renvoie à une transition de phase d'un état non ordonné de phase liquide expansé (L1) également qualifié de gaz bidimensionnel (G) à un état ordonné de phase de liquide condensée (L2). Lorsque la pression de surface est suffisamment élevée le film présente une phase solide (S) pour laquelle toutes les molécules sont en contact [69].

La collaboration de K. Blodgett avec I. Langmuir porta sur le transfert de molécules amphiphiles constituant un film monomoléculaire, par exemple d'acide gras, sur un substrat en verre [70]. Suite à ses travaux, les dépôts de monocouches ou de multicouches obtenues par cette technique sont appelés films de Langmuir-Blodgett (films LB). Deux étapes sont nécessaires à l'obtention d'un film LB. Dans un premier temps, l'isotherme de compression de la molécule amphiphile doit être tracée. Cela permet de déterminer la pression de transfert Π_t à laquelle une monocouche compacte de molécules peut être transférée sur le substrat, sans que la phase « solide » ne soit trop fragile et ne se rompe. Deuxièmement, les transferts successifs des monocouches sur le substrat peuvent s'effectuer. Selon les conditions de l'expérience, les vitesses d'immersion et d'émersion du substrat dans et hors de la sous-phase ou encore la nature de la molécule comprimée, différents types de films LB peuvent être obtenus (Fig. 30).

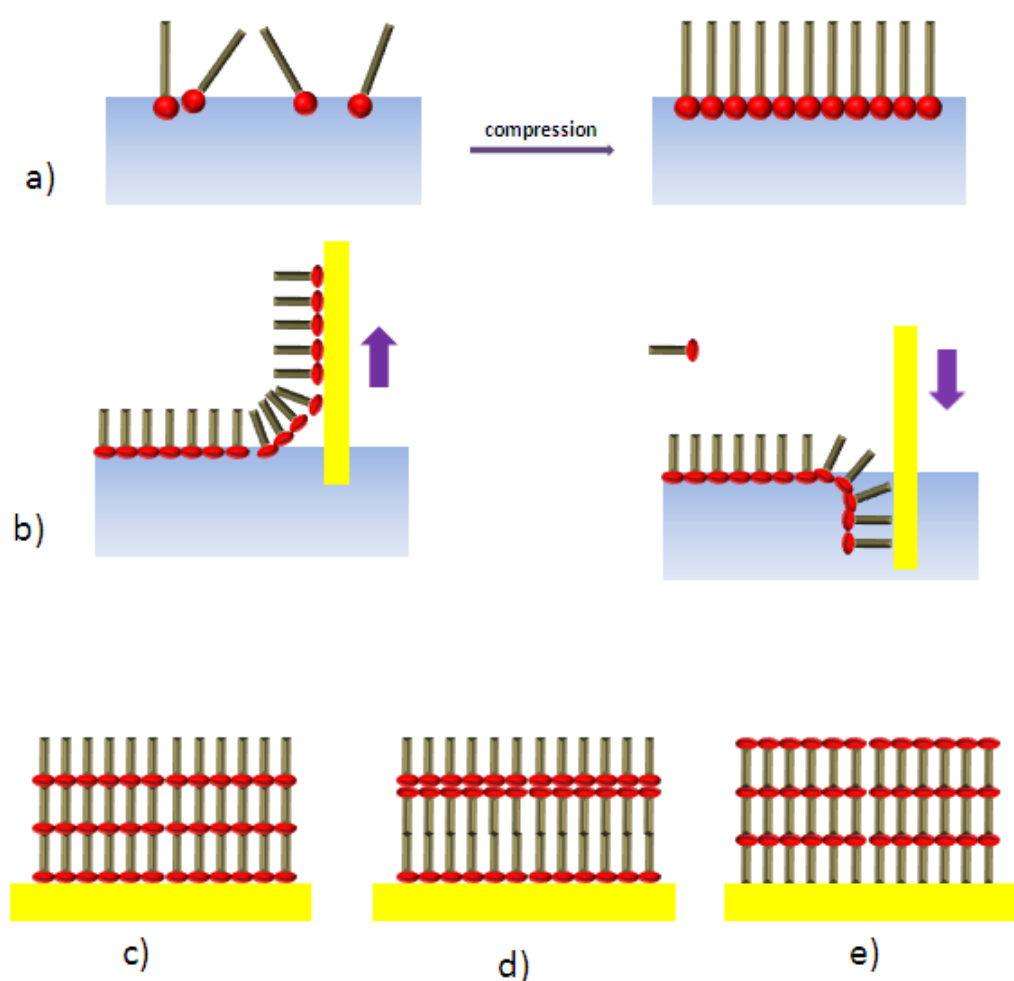


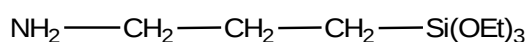
Figure 30 Représentation schématique des différentes étapes d'élaboration de films de Langmuir-Blodgett à partir de molécules amphiphiles, a) compression du film de Langmuir à l'interface air-eau. b) transfert de la première couche sur un substrat hydrophile (gauche) et hydrophobe (droite). c), d), e) différents types de films LB selon les conditions du transfert

L'obtention de cristaux colloïdaux par la technique de Langmuir-Blodgett, se base sur la manipulation de particules pouvant, comme les molécules amphiphiles, se placer à l'interface air-eau. Cependant il n'est pas possible de parler de caractère amphiphile pour une particule, à moins que celle-ci

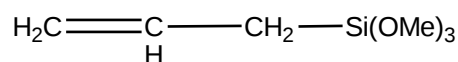
présente deux hémisphères distincts possédant l'un des propriétés hydrophiles et l'autre hydrophobes, ce qui n'est pas le cas pour les objets que nous manipulons ici. Il s'agit donc d'élaborer des particules colloïdales dont la fonctionnalisation surfacique permet d'instaurer un caractère ambivalent hydrophile/hydrophobe. Pour de telles particules, il apparaît que les forces de capillarité soient prédominantes. Toutefois les forces d'attraction/répulsion à courte portée de type Van der Waals ou électrostatiques entre deux objets suffisamment proches sont plus importantes que pour des molécules.

On note que pour déterminer les interactions interparticulaires d'un film à l'interface air-eau, il est possible de considérer leur flottabilité, déterminée par leur état de surface. En effet, suivant les forces qui vont dominer ces interactions, la flottabilité s'avèrera être différente. Par exemple, des particules chargées à caractère hydrophile, se retrouvant immergées pour la plus grande partie de leur volume, sont soumises à des répulsions électrostatiques. Au contraire, si ces particules chargées présentent un caractère hydrophobe, elles ne seront que très partiellement immergées et dans ce cas subiront l'effet d'attraction de type Van-der-Waals se manifestant hors de l'eau. Le procédé de LB fonctionne préférentiellement avec cette catégorie de particules.

Les nanoparticules de silice s'avèrent être des objets adéquats pour la réalisation de film LB. Les détails de leur synthèse ont été explicités dans la partie 3.2.1 de ce chapitre. Les travaux de Reculasa *et al* ont permis de déterminer quel type de fonctionnalisation des particules de silice pouvait permettre à celles-ci de former des films LB [32,71]. Le greffage covalent de divers groupements a donc permis d'obtenir des sphères de silice capables de former un film de Langmuir stable à l'interface air-eau. On note que les différentes fonctions testées sont reliées à la matrice de silice via un longue chaîne alkyle ce qui confère à la particule un caractère relativement hydrophobe, expliquant de cette manière son positionnement préférentiel à l'interface, établi par la répulsion de la sous-phase. Si les billes ne possèdent pas de telle propriété, elles auront tendance à traverser facilement l'interface ce qui empêchera l'élaboration de films stables. En effet la compression de billes de silice non-fonctionnalisées ne conduit pas à une grande augmentation de pression de surface ce qui indique que les billes ne se concentrent pas à l'interface mais passent en phase aqueuse. Toutefois afin de ne pas générer d'agrégats de billes dans les films, dus à des interactions entre chaînons hydrophobes de deux objets voisins, il est nécessaire d'intégrer une ambivalence hydrophile-hydrophobe dans leurs caractéristiques surfaciques. D'après leur travaux, il a été déterminé que les dérivés de types trialkoxysilanes fonctionnels, utilisés comme agents de fonctionnalisation de surface, permettent de conduire à des films de particules de bonne qualité. L'aminopropyltriéthoxysilane et l'allyltriméthoxysilane ont permis d'obtenir les résultats les plus convaincants, voir formules ci-dessous.



Aminopropyltriéthoxysilane



allyltriméthoxysilane

Figure 31 Formule des agents de fonctionnalisation des billes de silice

Grâce à ce type de fonctionnalisation, les billes fonctionnalisées restent à l'interface air-eau et peuvent former des films stables. Il est possible de les transférer sur des substrats appropriés, tels que par exemple, des lames de verre (Figure 32)

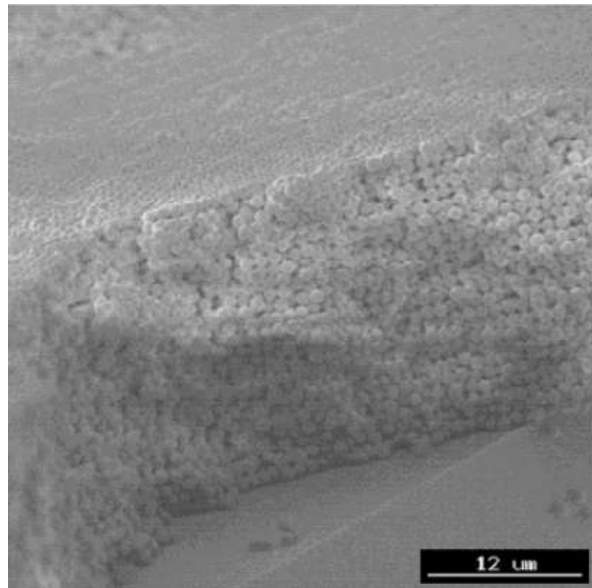


Figure 32 Observation MEB d'une coupe transverse d'un cristal colloïdal de particules de silice (diamètre 680 nm) transféré sur un substrat de verre. 25 couches de billes constituent ce cristal [32].

3.3 Exploitation des cristaux colloïdaux

De par leur structure régulière et organisée, les cristaux colloïdaux présentent des propriétés particulières qui peuvent être mises au service de différentes applications. Une fois que le cristal colloïdal est obtenu, suivant les techniques précédemment présentées, il existe trois façons d'exploiter cet assemblage :

- soit les propriétés de la structure brute du cristal sont directement mises au profit d'une application
- soit on inclut la structure colloïdale dans une construction secondaire dont les propriétés globales sont mises à contribution
- soit on se sert de l'assemblage colloïdal comme un template c'est-à-dire un élément sacrificiel intermédiaire de construction, pour obtenir la structure inverse de celui-ci dont la porosité ordonnée peut être utilisée

Les deux dernières voies d'exploitation du cristal colloïdal nécessitent la mise en forme d'un matériau capable d'infiltrer la structure du cristal, de façon dense et homogène. Ceci doit être respecté pour ne pas générer entre autre une structure colloïdale inverse fragile, susceptible de

s'affaïsser. Pour répondre à ces critères de mise en forme, il existe diverses techniques d'infiltrations qui sont décrites dans les paragraphes suivants.

3.3.1 Infiltration

3.3.1.1 Par imprégnation

Comme les sphères du cristal colloïdal adhèrent les unes aux autres ainsi qu'au support, l'assemblage de billes peut être immergé dans différents liquides sans que ceci n'altère sa structure.

Cette stabilité du cristal rend possible l'imprégnation de la structure par un liquide contenant des éléments précurseurs de matériau destiné à infiltrer l'opale. Ils sont alors à l'état de solution ou de suspension. Il s'agit d'une méthode simple et efficace où l'espace vide entre les billes est rempli par capillarité. Le procédé nécessite par la suite une seconde étape de transformation pour générer le matériau final, par exemple une réaction de polymérisation, de carbonisation, ou d'hydrolyse [^{72,73}]...

- **Procédé sol-gel**

Il s'agit ici d'infiltrer le cristal colloïdal avec des alcoxydes de métaux qui tiennent lieu de précurseurs de matériaux générés par procédé sol-gel. Ce procédé a été précédemment décrit dans la partie 3.2.1 de ce chapitre. Ceux-ci doivent passer par une étape préalable d'hydrolyse qui est suivie d'une étape de condensation qui se produit une fois que les précurseurs hydrolysés se trouvent à l'intérieur du cristal pour donner naissance au matériau d'oxyde métallique. Il est donc possible d'obtenir des oxydes métalliques macroporeux de Si, Ti, Zr, Al, Sb, Sn [⁷⁴⁻⁷⁶] ainsi que des mélanges d'oxydes métalliques Co/Ti [], Pb/Ti [^{77,78}]. La pénétration du précurseur dans le template peut se produire naturellement par forces capillaires [⁷⁹], ou par application d'un vide forcé [⁷⁵].

- **Polymérisation organique**

La polymérisation *in situ* de précurseurs organiques à l'intérieur des espaces vides du cristal donne la possibilité de créer une grande variété de polymères macroporeux tels que le polyuréthane [⁸⁰], le PMMA [⁸¹], l'époxy [⁸¹] etc.... Si la structure colloïdale sert de template, elle peut être constituée de billes de silice ou de polystyrène, tant que le solvant utilisé pour l'extraire ne dissout pas le polymère de remplissage. L'infiltration de cristaux colloïdaux par des précurseurs monomères est assez fréquente car leur solidification par traitement thermique ou par irradiation aux UV ont des mises en œuvre simples, ce qui offre une voie d'obtention rapide de matériaux originaux et structurés. Après l'élimination du cristal, les films macroporeux obtenus de cette façon peuvent être souples ou rigides.

- **Nanoparticules**

Une autre alternative possible est de remplir les espaces vides de l'opale directement avec des nanoparticules de métal ou de semi-conducteur qui peuvent également s'auto-assembler à l'intérieur du cristal primaire. Dans ce cas la taille des nanoparticules doit être largement inférieure à la taille des espaces vides entre les billes du cristal [82]. Cette technique peut s'appliquer à toutes les compositions pour lesquelles des nanoparticules peuvent être synthétisées. La limitation de ce procédé réside dans l'épaisseur du film macroporeux formé qui ne peut être trop épais. On peut effectuer l'infiltration de l'opale par les nanoparticules selon plusieurs méthodes. En effet, le cristal préformé peut être infiltré par une suspension de nanoparticules sous l'effet de l'évaporation du solvant, ou elles peuvent être contraintes à remplir les interstices sous l'action d'un flux [83]. Le remplissage du cristal peut aussi se produire alors qu'il est lui-même à l'étape d'auto-assemblage : un assemblage concomitant des nanoparticules et des sphères s'effectue à partir d'une suspension commune [84].

L'imprégnation d'un cristal colloïdal peut être améliorée en vitesse et en homogénéité par un procédé de filtration [85]. Ce procédé a la particularité de se servir d'un cristal colloïdal élaboré sur un substrat poreux tel qu'une membrane. L'imprégnation des éléments précurseurs va donc s'effectuer au fur et à mesure que le milieu dans lequel ils sont solubilisés ou mis en suspension s'élimine au travers de la structure poreuse qui les retient. Pour assurer une infiltration complète et rapide, une pression négative peut être appliquée sur le système. Les solutions d'alcoxyde de métaux tels que l'éthoxyde de titane ou le n-propoxyde de zirconium, ou de nanoparticules peuvent être infiltrées dans des cristaux colloïdaux par cette méthode [75,85]. Une fois concentrés dans les interstices du cristal, ces éléments peuvent également subir des transformations supplémentaires avant l'élimination du template.

3.3.1.2. Par précipitation de sels métalliques

Une méthode alternative pour fabriquer les matériaux poreux est d'immerger le cristal colloïdal dans une solution saturée en sels métalliques, qui vont précipiter et remplir les espaces vides du cristal. Ceux-ci vont devoir subir par la suite des transformations chimiques *in situ* pour donner naissance à la structure macroporeuse de l'oxyde métallique en question (MgO , Cr_2O_3 , Mn_2O_3 ...) [86]. Les acétates métalliques sont généralement utilisés pour cette technique car ils présentent de hautes solubilités dans les solvants utilisés ce qui permet l'introduction rapide d'une grande quantité de matière dans l'opale [87].

3.3.1.3 Par *déposition sans courant*

Les métaux macroporeux suivants, à savoir Ni, Cu, Ag, Au et Pt, peuvent être obtenus par dépôt sans courant autour des particules du cristal si celles-ci ont été au préalable modifiées par des nanoparticules catalytiques [88]. Les sphères formant le cristal sont dans un premier temps fonctionnalisées par des fonctions thiols, via des agents de couplage siloxane, et subissent ensuite le procédé d'auto-assemblage. Une fois le cristal formé, il est immergé dans une solution de toluène contenant les nanoparticules d'or, suivi d'une étape de séchage. La structure résultante présente donc un arrangement de billes de silice recouverte de nanoparticules métalliques. A la suite de l'immersion de ces substrats dans des bains de dépôt sans courant, les métaux se déposent autour des sphères. La structure métallique est révélée lorsque les billes de silice sont éliminées dans l'acide fluorhydrique.

3.3.1.4 Par *dépôt chimique en phase vapeur*

Le dépôt chimique en phase vapeur (suivant la terminologie anglaise : chemical vapor deposition (CVD)) se produit grâce à des réactions chimiques permettant la transformation de molécules à l'état gazeux (les précurseurs) en un matériau solide à la surface d'un substrat, sous forme de film ou de poudre. La fabrication de dispositifs faisant appel à des semi-conducteurs, a largement recours à ce procédé. Pour appliquer cette méthode à l'élaboration d'opales inverses, les cristaux colloïdaux sont infiltrés avec des semi-conducteurs gazeux. Le dépôt se produit par la suite par traitement thermique [89]. Blanco *et al.* [47] et Miguez *et al.* [90] décrivent une méthode permettant d'infiltrer du silicium et du germanium à l'intérieur des espaces vides du cristal par dépôt en phase vapeur du disilane (Si_2H_6) et du germanium (GeH_4), respectivement. Vlasov *et al* ont par la suite développé une procédé CVD alternatif pour obtenir un film de cristal colloïdal de silice inverse d'une très grande qualité [40].

3.3.1.5 Par *Electrodépôt*

L'électrodépôt est un outil puissant permettant de fabriquer des nanostructures disposant d'une grande qualité structurale. Cette méthode d'infiltration est mise œuvre pour des opales construites sur des substrats conducteurs. Celui-ci est placé dans un bain contenant l'élément à électrodéposer, face à la contre électrode (Fig. 33). Sous l'application d'un potentiel approprié l'électrodéposition peut opérer. Le matériau va se former du bas vers le haut du cristal en remplissant complètement et uniformément ses espaces vides [91]. Il suffit de contrôler le temps d'électrodépôt ou la charge pour ajuster l'épaisseur du matériau déposé [92]. Cette méthode assure une haute densité du matériau déposé dans les espaces vides du template en épousant parfaitement les volumes interstitiels ainsi

que les surfaces des billes. Par conséquent, aucun phénomène d'affaissement structurel ne se produit lors de l'élimination du template, étape après laquelle le matériau poreux obtenu est immédiatement disponible. On obtient donc une réelle projection inverse de la structure de l'opale où le volume des cavités est exactement celui des billes qui constituaient le cristal. Dans la totalité du film métallique, les pores se trouvent interconnectés par de plus petites ouvertures à l'endroit où les billes du template étaient en contact entre elles [92]. La méthode offre aussi un large choix de matériaux qui peuvent être rendus poreux par ce procédé : des métaux, des alliages, des oxydes, des semiconducteurs et des polymères conducteurs. Ceux-ci doivent être en solution, aqueuse ou non, dans des conditions compatibles avec la stabilité du template.

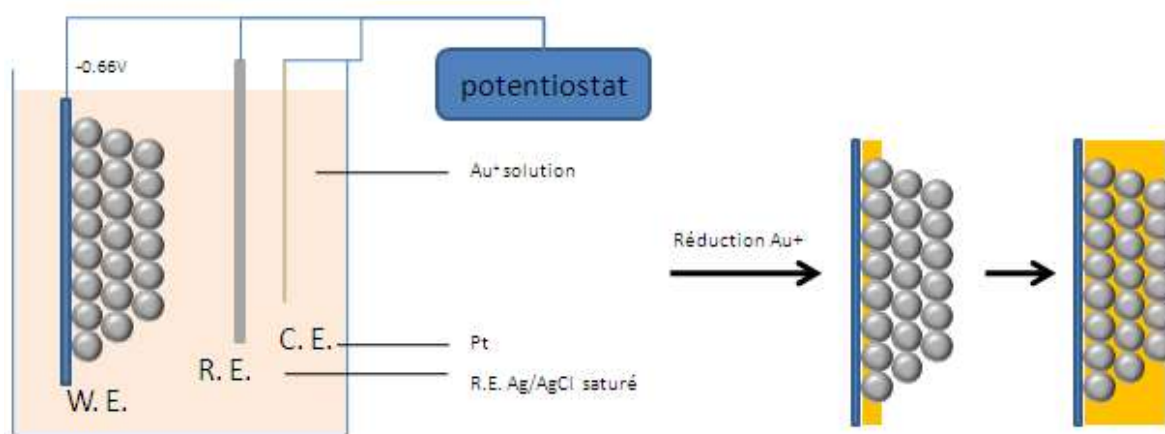


Figure 33 Schéma de l'infiltration d'un cristal colloïdal effectuée par électrodépôt d'or [93]

Il existe une exception notable concernant l'uniformité du remplissage obtenu par électrodépôt. Elle se produit dans le cas de l'électrodépôt de polymères conducteurs. Pour le polyaniline et polypyrrole, il arrive que les interespaces vides ne soient pas remplis en leur centre, et pour le polypyrrole, il peut également se former un assemblage de sphères de polymère interconnectées [94].

Braun et Wiltzius se sont servis de cette approche pour préparer un film tridimensionnel ordonné de sélénide de cadmium et de sulfide de cadmium [95]. Wijnhoven *et al* ont décrit le dépôt électrochimique de films macroporeux ordonnés d'or au travers de templates élaborés à partir de particules de silice ou de polystyrène [96]. Xu *et al* [97] ont utilisé cette technique pour électrodéposer du nickel et de l'or dans un template de billes de silice de 300nm de diamètre obtenu après plusieurs mois de sédimentation. Ils ont observé que la structure pouvait s'effondrer mais ont néanmoins pu enregistrer les premières mesures magnétiques avec des structures de nickel. Le groupe de Bartlett a travaillé sur l'élaboration de films fins macroporeux ordonnés de Pt, Pd et Co en utilisant un template de billes de PS par la réduction électrochimique du $[\text{PtCl}_6]^{2-}$, $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ ou de $[\text{Co}(\text{Ac})_2]$ en solution aqueuse [98]. Des images obtenues par microscopie à balayage électronique des films d'or montrent la formation d'une structure poreuse tridimensionnelle parfaitement ordonnée, constituée de pores sphériques organisés en une structure cubique face centrée (cfc).

Bien que le contrôle de la charge nécessaire à l'électrodépôt du film permette de maîtriser de façon précise l'épaisseur de la couche générée [⁹²], il existe une méthode alternative proposée par Szamocki *et al.* Lors de l'électrodépôt de l'or par réduction des ions AuSO_3^{2-} à l'intérieur d'une opale de billes de silice parfaitement organisées, le courant oscille temporellement suivant le niveau de remplissage du template, ce qui permet de contrôler l'épaisseur du dépôt avec une précision approximative de 10 nm [⁹⁹]. Ces oscillations peuvent être expliquées par la variation périodique de l'aire de la surface active de l'électrode au fur et à mesure de l'accroissement de l'or métallique dans le template. Suivant que le niveau dépôt se forme à la base d'une couche de billes, ou atteigne leur équateur, la surface active en contact avec le milieu extérieur sera à son maximum ou son minimum, respectivement. On peut ainsi suivre de façon simple et fiable la localisation du niveau du dépôt dans le cristal (Fig. 34). Ces observations sont également possibles pour d'autres types de dépôts métalliques tel que le nickel par exemple [¹⁰⁰].

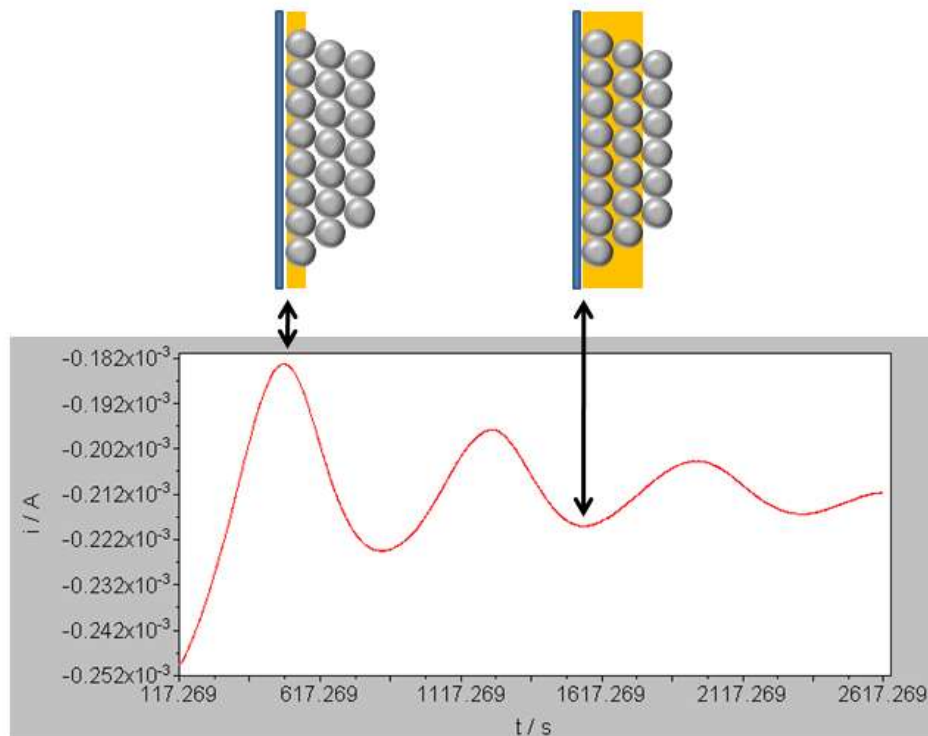


Figure 34 Evolution du courant de réduction lors de l'électroréduction de l'or à l'intérieur d'un cristal colloïdal : lorsque le niveau du dépôt est l'équateur des billes d'une couche, le courant est à son minimum et lorsqu'il est à leur base ou leur sommet suivant la couche considérée, il se trouve à son maximum

3.3.2 Applications

3.3.2.1 Cristaux photoniques

Dans les années 1980 des travaux de recherche de Yablonovitch et John ont révélé que les cristaux colloïdaux pouvaient être d'un grand intérêt pour l'élaboration de cristaux photoniques, qui sont des matériaux diélectriques à périodicité uni-, bi- ou tridimensionnelle du même ordre de grandeur que la longueur d'onde [^{101,102}]. Ces matériaux sont capables d'interagir de façon très particulière avec les ondes électromagnétiques en général et plus particulièrement avec la partie visible du spectre de la lumière. En effet la périodicité de l'indice diélectrique joue le même rôle pour les photons que la périodicité du potentiel ionique dans un cristal pour les électrons. Ainsi dans un certain domaine de fréquence propre à la périodicité et la nature du matériau, les ondes peuvent être diffractées par le cristal. Selon la nomenclature employée dans le domaine des semi-conducteurs, on est alors dans une zone de « gap » ou bande électromagnétique interdite par opposition aux domaines de conduction appelés « bandes », ce qui engendre l'appellation présente dans la littérature de matériaux à bande photonique interdite, dite « band-gap » photonique. En référence à la terminologie anglaise on parle de matériau PBG.

Outre le respect d'une périodicité uniforme de la distance interréticulaire comparable avec les longueurs d'onde de la PBG, différentes caractéristiques doivent également être respectées afin de répondre aux critères que présentent les cristaux photoniques. Cela inclut une faible fraction solide, de seulement 20% du volume doit être occupé par de la matière solide, un contraste minimum de l'indice de réfraction de 2,8 (pour les matériaux présentant la structure cubique face centrée, cfc), une absorption négligeable dans le domaine d'intérêt du spectre. On remarque que la condition de faible fraction solide dans le volume total du matériau ne peut être respectée par les structures engendrées par les cristaux colloïdaux, par conséquent ceux-ci ne peuvent disposer a priori d'une PBG complète. Toutefois il s'agit d'une des structures très fréquemment employées pour répondre au défis qu'est la fabrication de tel réseau 3D de façon contrôlable et présentant le minimum de défauts. Ainsi les cristaux colloïdaux permettent de parvenir à l'élaboration de cristaux photoniques, via l'assemblage colloïdal [¹⁰³] ou l'utilisation de la construction colloïdale en tant que template [^{104,105}].

Les cristaux photoniques à bande interdite photonique, sont des applications très prometteuses des matériaux ordonnés macroporeux tridimensionnels. La réalisation de matériaux à PBG représente un grand intérêt scientifique et technologique [^{106,107}]. Par exemple ces matériaux peuvent être capables de localiser ou de diriger le flux de lumière ce qui ouvre la possibilité de développer des filtres [¹⁰⁸], des guides d'onde [¹⁰⁹] et des circuits optiques [¹¹⁰]. Ils présentent également des propriétés d'inhibition envers certaines émissions spontanées, ce qui pourrait être notamment être utilisé afin d'améliorer des réactions photocatalytiques [¹¹¹]. On trouve également des structures photoniques

faite à partir d'oxydes de métaux qui conduisent à des applications électrochimiques telles que les cellules solaire [112] et les super condensateurs [113].

3.3.2.2 Diffusion Raman exaltée de surface

Comme décrit précédemment dans le partie 3.2 relatif aux infiltrations, les cristaux colloïdaux peuvent servir de template dont l'interespace peut être rempli de nanoparticules métalliques. Après élimination du template, la structure métallique poreuse résultante peut servir en spectroscopie Raman exaltée de surface (surface enhanced Raman spectroscopy SERS) pour des applications analytiques. Des films poreux d'or ont permis d'une détection efficace de substances chimiques en très faible concentration par SERS [84,114]. Les pores apparaissent après la dissolution dans le toluène des billes de polymère. Le phénomène de plasmon de surface est amplifié lorsque les molécules à analyser se trouvent proches de la surface des nanoparticules d'or. Pour un film présentant deux couches de pores, ces molécules émettent un spectre Raman 10^4 fois plus intense que si le substrat avait été du verre plan et deux fois plus élevé que si les nanoparticules avaient été disposées aléatoirement sur une surface de verre. Ce type de matériau peut par exemple être utilisé pour la détection de polluants.

3.3.2.3 Capteurs et actionneurs

Grâce à leurs propriétés spécifiques précédemment évoquées, les cristaux colloïdaux interviennent dans les procédés d'élaboration de divers matériaux qui peuvent être utilisés pour des applications de capteurs ou d'actionneurs. Leur structure tridimensionnelle organisée en fait d'excellents supports pour accroître la sélectivité et la sensibilité de ces dispositifs. On distingue deux catégories de matériaux élaborés à partir des cristaux colloïdaux utilisés pour ces applications : les opales inverses obtenues via l'utilisation du cristal colloïdal en tant que template et les matériaux qui incluent le cristal dans leur composition globale.

Les opales inverses disposent d'une grande surface spécifique ce qui intensifie de façon très significative les réactions où l'interface entre matériau et milieu réactionnel rentre en jeu. Ainsi les matériaux d'oxyde métallique macroporeux sont fréquemment utilisés pour la détection de gaz car leur sensibilité et donc leur seuil de détection est optimisé de façon significative par l'introduction d'une porosité. SnO_2 , TiO_2 , et NiO sont donc nano-structurés afin de détecter le plus efficacement possible les gaz H_2 , C_3H_8 , CH_4 , NO_2 et $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ [115-117].

Un biocapteur potentiométrique a été élaboré à partir d'une opale inverse de poly-pyrrole (PPY) dans laquelle est immobilisée une enzyme, la créatinine déiminase (CD). Le template était un cristal

colloïdal de billes de polystyrène. La CD est capable de convertir la créatinine en 1-méthylhydantoïne et en ammoniac. Or l'ammoniac induit un changement réversible du potentiel de Fermi du PPY par un changement local de pH, ce qui peut être mesuré par potentiométrie. La porosité et la perméabilité du film de PPY occasionne une excellente sensibilité du dispositif envers son analyte. De plus, cette structure ouverte permet un retour au pH initial plus rapidement dans le cas d'une structure ordonnée tridimensionnelle que pour un film plan. Les films mésoporeux métalliques obtenus grâce l'utilisation d'un template sont des supports idéaux pour la réalisation de biocapteurs. En effet la grande surface spécifique interne dont ils disposent permet l'immobilisation d'une plus grande quantité du matériel bio-electrocatalytique nécessaire à la transduction du message biologique à détecter. Des biocapteurs à adénosine triphosphate (ATP) ont été réalisés avec des films mésoporeux d'or et montrent une efficacité supérieure comparée à celle obtenue avec un substrat d'or plan [¹¹⁸]. Des capteurs à glucose opérant sans enzyme montrent également une sensibilité accrue comparé au même type de biocapteur unidimensionnel [¹¹⁹]. Szamocki *et al* ont utilisé des électrodes macroporeuses pour les domaines des biocapteurs et de la biocatalyse électrochimique [^{93,99,120,121}]. Les films d'or macroporeux ont été modifiés avec une fluorénone servant de médiateur pour détecter la présence de glucose via la construction d'une chaîne électro-enzymatique (enzyme, cofacteur) en solution. Le courant catalytique et ces variations en présence de 8 mM de glucose ont été comparés à des substrats d'or présentant 1, 3 et 5 demi-couches de pores. Des courants plus intenses ont été observés lorsque l'épaisseur de l'électrode était plus importante. Les courants maximaux ont été atteints sur des périodes de temps plus conséquentes car la diffusion du glucose requiert des temps plus longs pour que le substrat puisse se répandre à l'intérieur de l'épaisseur de la structure. Il est également possible d'immobiliser tous les composants électrocatalytiques sur la surface interne de l'électrode car la connectivité des pores présente des dimensions suffisante pour permettre aux biomolécules de circuler dans la structure macroporeuse [^{93,120,122}].

Des cristaux colloïdaux faits à partir de particules de matériau piézoélectrique d'environ 1 μm de diamètre ont été élaborés par dépôt électrophorétique. Le support en céramique sur lequel le cristal a été déposé possède une forme de spirale et le système ainsi constitué fournit une nouvelle catégorie d'actuateur [¹²³].

La combinaison d'une structure colloïdale photoniquement active avec un environnement polymère chimiquement réactif peut donner naissance à divers capteurs et actionneurs. Par exemple un hydrogel de polyacrylamide (PAA) qui encapsule un cristal colloïdal de PS subit des changements de volume avec des variations de pH et de force ionique du milieu dans lequel il se trouve. Ces fluctuations volumiques entraînent des changements de périodicité/du paramètre de maille du cristal. Par conséquent les longueurs d'ondes diffractées par celui-ci vont donc évoluer en fonction des changements occasionnés par le milieu extérieur environnant le cristal [¹²⁴]. La détection du glucose peut également être effectuée par ce type de capteur lorsque la matrice de PAA est fonctionnalisée par des groupements d'acide boronique. En effet l'interaction entre le sucre et l'hydrogel engendre aussi un phénomène de gonflement de ce dernier [¹²⁵]. Un actuateur fait à partir

d'une opale de billes de silice prises dans un gel de poly(diméthylsiloxane) (PDMS) et d'un mélange de poly(uréthane)/2-hydroxyéthyle méthacrylate montre des propriétés réversibles de changement de forme et de couleur suivant le solvant dans lequel il est placé [¹²⁶] (Fig. 35).

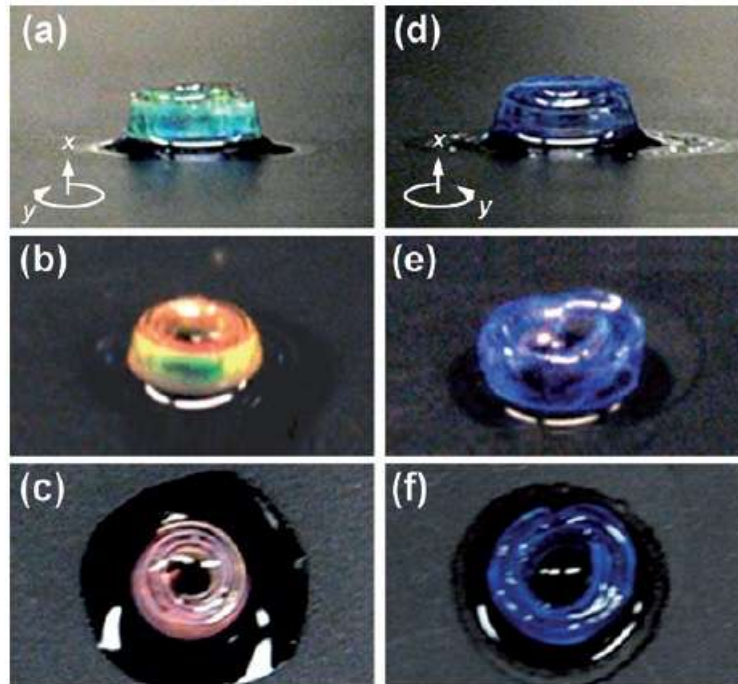


Figure 35 Actuateur photonique placé dans l'acide acétique : a) vue de côté, b) vue à 45°, c) vue de haut, d), e), f) même actuateur suivant les mêmes prises de vue placé dans l'hexane [¹²⁶].

3.3.2.4 Cellules solaires

Les cristaux colloïdaux peuvent également intervenir dans l'élaboration de cellules solaires. Par exemple des nanosphères de silice auto-assemblées peuvent servir de couche anti-réflexion car elles possèdent d'excellentes propriétés d'absorption des longueurs d'onde appartenant au domaine de l'UV et du proche infrarouge. Ceci permet donc la production de cellules solaires de silicium polycristallin dont l'efficacité de conversion est améliorée de 11.8 % lorsque le cristal colloïdal se trouve à la surface de la cellule [¹²⁷].

D'autres types de cellules solaires ont fait appel à des cristaux colloïdaux lors de leur fabrication. Des opales inverse de TiO_2 et de ZnO peuvent servir d'électrode dans certains de ces dispositifs photoélectrochimiques [^{128,129}].

3.3.2.5 Electrodes poreuses

Les électrodes macroporeuses préparées via un template montrent que l'organisation des pores est hautement ordonnée dans un arrangement hexagonal, assurée en partie par la monodispersité des billes. Dans cet arrangement, les particules qui se touchent les unes aux autres se comportent comme des sphères rigides, c'est pourquoi, une fois que le métal est électrodéposé entre elles et qu'elles sont dissoutes, des communications entre chaque pore sont obtenues. Ces ouvertures sont également appelées interconnexions qui permettent à la structure d'opale inverse d'être en contact avec le milieu extérieur ce qui engendre une aire de surface active bien supérieure à l'aire géométrique d'une telle électrode.

Les électrodes macroporeuses préparées via un cristal colloïdal servant de template, sont obtenues par électrodépôt du métal dans les interstices du cristal qui est dans un deuxième temps dissous. Les structures métalliques résultantes montrent que l'organisation de leurs pores est hautement ordonnée selon la réplication exacte de l'arrangement du cristal. La qualité de cette structure est assurée par celle du cristal qui dépend en partie de la monodispersité des billes mais aussi de leur technique d'assemblage.

Les premières électrodes macroporeuses de ce type ont été obtenues par Xu *et al*, qui ont électrodéposé de l'or et du nickel dans des structures obtenues par sédimentation [⁹⁷]. Par la suite Bartlett *et al* ont proposé une méthode d'obtention d'électrodes poreuses de Pd, Pt et Co par l'emploi d'un cristal obtenu par évaporation d'une suspension de billes de PS [¹³⁰]. Ces électrodes ont rapidement été exploitées pour des applications dans l'électrocatalyse [^{131,132}] et pour l'élaboration de biocapteurs [^{120,121}].

Dans cette étude, l'objet de l'intérêt porté aux cristaux colloïdaux est justement leur emploi en tant que template pour l'élaboration de l'électrode de travail du réacteur pilote qui doit présenter une surface géométrique de plusieurs dizaines de cm². Elle sera donc obtenue par électrodépôt d'or à l'intérieur d'un cristal colloïdal, qui, une fois éliminé, révélera la structure métallique macroporeuse ordonnée. Le chapitre suivant est dédié à l'investigation des méthodes permettant d'obtenir un tel objet.

Références Bibliographiques

- (1) Gast, A. P.; Russel, W. B.; Hall, C. K. *Journal of Colloid and Interface Science* **1986**, 109, 161.
- (2) Auer, S.; Frenkel, D. *Nature* **2001**, 409, 1020.
- (3) Henderson, S. I.; Mortensen, T. C.; Underwood, S. M.; van Megen, W. *Physica A: Statistical and Theoretical Physics* **1996**, 233, 102.
- (4) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, 26, 62.
- (5) Tsaur, S.-L.; Fitch, R. M. *Journal of Colloid and Interface Science* **1987**, 115, 450.
- (6) Lee, J.; Ha, J. U.; Choe, S.; Lee, C.-S.; Shim, S. E. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 298, 663.
- (7) Bosma, G.; Pathmamanoharan, C.; de Hoog, E. H. A.; Kegel, W. K.; van Blaaderen, A.; Lekkerkerker, H. N. W. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, 245, 292.
- (8) Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. A. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 331, 251.
- (9) Eggins, B. R.; Robertson, P. K. J.; Murphy, E. P.; Woods, E.; Irvine, J. T. S. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1998**, 118, 31.
- (10) Meijer, E. J.; El Azhar, F. *The Journal of Chemical Physics* **1997**, 106, 4678.
- (11) Pusey, P. N.; van Megen, W. *Nature* **1986**, 320, 340.
- (12) Cheng, Z.; Chaikin, P. M.; Russel, W. B.; Meyer, W. V.; Zhu, J.; Rogers, R. B.; Ottewill, R. H. *Materials & Design* **2001**, 22, 529.
- (13) Pusey, P. N.; van Megen, W. *Physical Review Letters* **1987**, 59, 2083.
- (14) Rundquist, P. A.; Photinos, P.; Jagannathan, S.; Asher, S. A. *The Journal of Chemical Physics* **1989**, 91, 4932.
- (15) Scodeler Raimundo, D.; Salcedo, W. J. *physica status solidi (c)* **2004**, 1, S62.
- (16) Yoldi, M.; Arcos, C.; Paulke, B.-R.; Sirera, R.; González-Viñas, W.; Görnitz, E. *Materials Science and Engineering: C* **2008**, 28, 1038.
- (17) Gil, S. C.; Seo, Y. G.; Kim, S.; Shin, J.; Lee, W. *Thin Solid Films*, **2010**, 518, 5731.
- (18) Liu, K.; Schmedake, T. A.; Tsu, R. *Physics Letters A* **2008**, 372, 4517.
- (19) Jiang, P.; Bertone, J. F.; Hwang, K. S.; Colvin, V. L. *Chemistry of Materials* **1999**, 11, 2132-2140.
- (20) Odian, G. *La polymérisation, principes et applications*, Polytechnica 1994.
- (21) Ni, H.; Du, Y.; Ma, G.; Nagai, M.; Omi, S. *Macromolecules* **2001**, 34, 6577.
- (22) Goodwin, J. W.; Hearn, J.; Ho, C. C.; Ottewill, R. H. *Colloid & Polymer Science* **1974**, 252, 464.
- (23) Egen, M.; Zentel, R. *Chemistry of Materials* **2002**, 14, 2176.
- (24) Ober, C. K.; Lok, K. P. *Macromolecules* **1987**, 20, 268.
- (25) Shim, S.-E.; Cha, Y.-J.; Byun, J.-M.; Choe, S. *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, 71, 2259.

- (26) Reculosa, S., thèse Université Bordeaux I Synthèse de matériaux d'architecture contrôlée à base de silice colloïdale 2004.
- (27) Matsoukas, T.; Gulari, E. *Journal of Colloid and Interface Science* **1988**, *124*, 252.
- (28) Matsoukas, T.; Gulari, E. *Journal of Colloid and Interface Science* **1989**, *132*, 13.
- (29) Bogush, G. H.; Zukoski Iv, C. F. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142*, 1.
- (30) Tan, C. G.; Bowen, B. D.; Epstein, N. *Journal of Colloid and Interface Science* **1987**, *118*, 290.
- (31) Van Helden, A. K.; Jansen, J. W.; Vrij, A. *Journal of Colloid and Interface Science* **1981**, *81*, 354.
- (32) Reculosa, S.; Ravaine, S. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 598-605.
- (33) Kang, S.; Hong, S. I.; Choe, C. R.; Park, M.; Rim, S.; Kim, J. *Polymer* **2001**, *42*, 879.
- (34) Deng, T.-S.; Zhang, J.-Y.; Zhu, K.-T.; Zhang, Q.-F.; Wu, J.-L. *Materials Chemistry and Physics*, **2011**, *129*, 540.
- (35) Mine, E.; Hirose, M.; Nagao, D.; Kobayashi, Y.; Konno, M. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *291*, 162.
- (36) Li, Q.; Chen, Y.; Dong, P. *Materials Letters* **2005**, *59*, 3521.
- (37) Denkov, N.; Velev, O.; Kralchevski, P.; Ivanov, I.; Yoshimura, H.; Nagayama, K. *Langmuir* **1992**, *8*, 3183.
- (38) Denkov, N. D.; Velev, O. D.; Kralchevsky, P. A.; Ivanov, I. B.; Yoshimura, H.; Nagayama, K. *Nature* **1993**, *361*, 26.
- (39) Subramania, G.; Constant, K.; Biswas, R.; Sigalas, M. M.; Ho, K. M. *Synthetic Metals* **2001**, *116*, 445.
- (40) Vlasov, Y. A.; Bo, X.-Z.; Sturm, J. C.; Norris, D. J. *Nature* **2001**, *414*, 289.
- (41) Im, S. H.; Kim, M. H.; Park, O. O. *Chemistry of Materials* **2003**, *15*, 1797-1802.
- (42) Denkov, N. D.; Velev, O. D.; Kralchevsky, P. A.; Ivanov, I. B.; Yoshimura, H.; Nagayama, K. *Langmuir* **1992**, *8*, 3183.
- (43) Dimitrov, A. S.; Dushkin, C. D.; Yoshimura, H.; Nagayama, K. *Langmuir* **1994**, *10*, 432-440.
- (44) Nagayama, K. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, *109*, 363.
- (45) Busch, K.; John, S. *Physical Review E* **1998**, *58*, 3896.
- (46) Yan, Q.; Zhou, Z.; Zhao, X. S. *Langmuir* **2005**, *21*, 3158.
- (47) Blanco, A.; Chomski, E.; Grabtchak, S.; Ibisate, M.; John, S.; Leonard, S. W.; Lopez, C.; Meseguer, F.; Miguez, H.; Mondia, J. P.; Ozin, G. A.; Toader, O.; van Driel, H. M. *Nature* **2000**, *405*, 437.
- (48) Prevo, B. G.; Velev, O. D. *Langmuir* **2004**, *20*, 2099.
- (49) Joannopoulos, J. D. *Nature* **2001**, *414*, 257.
- (50) Wong, S.; Kitaev, V.; Ozin, G. A. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 15589-15598.
- (51) Piret, F.; Su, B. L. *Chemical Physics Letters* **2008**, *457*, 376.

- (52) Li, H.-L.; Marlow, F. *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 1803-1810.
- (53) Koh, Y. K.; Wong, C. C. *Langmuir* **2005**, *22*, 897.
- (54) Liu, Z.; Ya, J.; Xin, Y.; Ma, J.; Zhou, C. *Journal of Crystal Growth* **2006**, *297*, 223.
- (55) Liu, Z.; Jin, Z.; Li, W.; Qiu, J.; Zhao, J.; Liu, X. *Applied Surface Science* **2006**, *252*, 5002.
- (56) Gu, Z.-Z.; Fujishima, A.; Sato, O. *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 760.
- (57) Fu, Y.; Jin, Z.; Liu, Z.; Liu, Y.; Li, W. *Materials Letters* **2008**, *62*, 4286.
- (58) Liu, Z.; Jin, Z.; Liu, X.; Fu, Y.; Liu, G. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2006**, *38*, 73.
- (59) Kanamura, K.; Hamagami, J.-i. *Solid State Ionics* **2004**, *172*, 303.
- (60) Dziomkina, N. V.; Hempenius, M. A.; Vancso, G. J. *Advanced Materials* **2005**, *17*, 237.
- (61) Hayward, R. C.; Saville, D. A.; Aksay, I. A. *Nature* **2000**, *404*, 56.
- (62) Huang, Y.-J.; Lai, C.-H.; Wu, P.-W. *Electrochemical and Solid-State Letters* **2008**, *11*, 20.
- (63) Trau, M.; Saville, D. A.; Aksay, I. A. *Science* **1996**, *272*, 706.
- (64) Radice, S.; Kern, P.; Dietsch, H.; Mischler, S.; Michler, J. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *318*, 264.
- (65) Trau, M.; Saville, D. A.; Aksay, I. A. *Langmuir* **1997**, *13*, 6375.
- (66) Jankowski, A. F. *Nanostructured Materials* **1995**, *6*, 179.
- (67) Huang, Y.-J.; Lai, C.-H.; Wu, P.-W. In *Electrochemical and Solid-State Letters*; ECS: **2008**; *11*, 20.
- (68) Langmuir, I. *Journal of the American Chemical Society* **1917**, *39*, 1848.
- (69) <http://www.hucom.kr>.
- (70) Blodgett, K. B. *Journal of the American Chemical Society* **1935**, *57*, 1007.
- (71) Reculosa, S.; Ravaine, S. *Applied Surface Science* **2005**, *246*, 409.
- (72) Gates, B.; Yin, Y.; Xia, Y. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 2827.
- (73) Zakhidov, A. A.; Baughman, R. H.; Iqbal, Z.; Cui, C.; Khayrullin, I.; Dantas, S. O.; Marti, J.; Ralchenko, V. G. *Science* **1998**, *282*, 897.
- (74) Velez, O. D.; Jede, T. A.; Lobo, R. F.; Lenhoff, A. M. *Nature* **1997**, *389*, 447.
- (75) Holland, B. T.; Blanford, C. F.; Do, T.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 795.
- (76) Turner, M. E.; Trentler, T. J.; Colvin, V. L. *Advanced Materials* **2001**, *13*, 180.
- (77) Yin, J. S.; Wang, Z. L. *Advanced Materials* **1999**, *11*, 469.
- (78) Yang, P.; Rizvi, A. H.; Messer, B.; Chmelka, B. F.; Whitesides, G. M.; Stucky, G. D. *Advanced Materials* **2001**, *13*, 427.
- (79) Wijnhoven, J. E. G. J.; Vos, W. L. *Science* **1998**, *281*, 802.
- (80) Park, S. H.; Xia, Y. *Advanced Materials* **1998**, *10*, 1045.
- (81) Jiang, P.; Hwang, K. S.; Mittleman, D. M.; Bertone, J. F.; Colvin, V. L. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 11630.
- (82) Vlasov, Y. A.; Yao, N.; Norris, D. J. *Advanced Materials* **1999**, *11*, 165.
- (83) Velez, O. D.; Tessier, P. M.; Lenhoff, A. M.; Kaler, E. W. *Nature* **1999**, *401*, 548.

- (84) Tessier, P. M.; Velev, O. D.; Kalambur, A. T.; Rabolt, J. F.; Lenhoff, A. M.; Kaler, E. W. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9554.
- (85) Holland, B. T.; Blanford, C. F.; Stein, A. *Science* **1998**, *281*, 538-540.
- (86) Yan, H.; Blanford, C. F.; Holland, B. T.; Smyrl, W. H.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 1134.
- (87) Yan, H.; Blanford, C. F.; Lytle, J. C.; Carter, C. B.; Smyrl, W. H.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 4314.
- (88) Jiang, P.; Cizeron, J.; Bertone, J. F.; Colvin, V. L. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 7957.
- (89) Chomski, E.; Ozin, G. A. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 1071.
- (90) Míguez, H.; Chomski, E.; García-Santamaría, F.; Ibisate, M.; John, S.; López, C.; Meseguer, F.; Mondia, J. P.; Ozin, G. A.; Toader, O.; van Driel, H. M. *Advanced Materials* **2001**, *13*, 1634.
- (91) Pérez, N.; Hüls, A.; Puente, D.; González-Viñas, W.; Castaño, E.; Olaizola, S. M. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *126*, 86.
- (92) Bartlett, P. N.; Baumberg, J. J.; Birkin, P. R.; Ghanem, M. A.; Netti, M. C. *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 2199.
- (93) Szamocki, R.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Bartlett, P. N.; Kuhn, A.; Hempelmann, R. *Angewandte Chemistry International Edition* **2006**, *45*, 1317.
- (94) Bartlett, P. N.; Birkin, P. R.; Ghanem, M. A.; Toh, C.-S. *Journal of Materials Chemistry* **2001**, *11*, 849.
- (95) Braun, P. V.; Wiltzius, P. *Nature* **1999**, *402*, 603.
- (96) Wijnhoven, J. E. G. J.; Zevenhuizen, S. J. M.; Hendriks, M. A.; Vanmaekelbergh, D.; Kelly, J. J.; Vos, W. L. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 888.
- (97) Xu, L.; Zhou, W. L.; Frommen, C.; Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; Malkinski, L.; Wang, J.-Q.; Wiley, J. B. *Chemical Communications* **2000**, 997.
- (98) Bartlett, P. N.; Birkin, P. R.; Ghanem, M. A. *Chemical Communications* **2000**, 1671.
- (99) Szamocki, R.; Velichko, A.; Holzapfel, C.; Mucklich, F.; Ravaine, S.; Garrigue, P.; Sojic, N.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 533.
- (100) Sumida, T.; Wada, Y.; Kitamura, T.; Yanagida, S. *Langmuir* **2002**, *18*, 3886.
- (101) Yablonovitch, E. *Physical Review Letters* **1987**, *58*, 2059.
- (102) John, S. *Physical Review Letters* **1987**, *58*, 2486.
- (103) Prasad, T.; Rengarajan, R.; Mittleman, D. M.; Colvin, V. L. *Optical Materials* **2005**, *27*, 1250.
- (104) Bohn, J. J.; Ben-Moshe, M.; Tikhonov, A.; Qu, D.; Lamont, D. N.; Asher, S. A. *Journal of Colloid and Interface Science*, *344*, 298.
- (105) Wijnhoven, J., E. G. J.; Vos, W. L. *science* **1998**, *281*, 802.
- (106) Xia, Y.; Gates, B.; Li, Z. Y. *Advanced Materials* **2001**, *13*, 409.
- (107) Birner, A.; Wehrspohn, R. B.; Gösele, U. M.; Busch, K. *Advanced Materials* **2001**, *13*, 377.

- (108) Koops, H. W. P.; Hoinkis, O. E.; Honsberg, M. E. W.; Schmidt, R.; Blum, R.; Böttger, G.; Kuligk, A.; Liguda, C.; Eich, M. *Microelectronic Engineering* **2001**, 57-58, 995.
- (109) Rawal, S.; Sinha, R. K. *Optics Communications* **2009**, 282, 3889.
- (110) McGurn, A. R. *Physica B: Condensed Matter* **2001**, 296, 201.
- (111) Ren, M.; Valsaraj, K. T. *Separation and Purification Technology* **2008**, 62, 523.
- (112) Biswas, R.; Bhattacharya, J.; Lewis, B.; Chakravarty, N.; Dalal, V. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 94, 2337.
- (113) Jiang, W.; Gu, L.; Chen, X.; Chen, R. T. *Solid-State Electronics* **2007**, 51, 1278.
- (114) Tessier, P. M.; Velez, O. D.; Kalambur, A. T.; Lenhoff, A. M.; Rabolt, J. F.; Kaler, E. W. *Advanced Materials* **2001**, 13, 396.
- (115) Sutti, A.; Baratto, C.; Calestani, G.; Dionigi, C.; Ferroni, M.; Faglia, G.; Sberveglieri, G. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, 130, 567.
- (116) Kim, I.-D.; Rothschild, A.; Yang, D.-J.; Tuller, H. L. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, 130, 9.
- (117) Cho, N. G.; Hwang, I.-S.; Kim, H.-G.; Lee, J.-H.; Kim, I.-D. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2011**, 155, 366.
- (118) Zhou, J.; Huang, H.; Xuan, J.; Zhang, J.; Zhu, J.-J. *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**, 26, 834.
- (119) Bai, Y.; Yang, W.; Sun, Y.; Sun, C. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, 134, 471.
- (120) Szamocki, R.; Velichko, A.; Mücklich, F.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, 2121.
- (121) Ben-Ali, S.; Cook, D. A.; Bartlett, P. N.; Kuhn, A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, 579, 181.
- (122) Szamocki, R.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Bartlett, P.N.; Kuhn, A.; Hempelmann, R.; *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 1317.
- (123) Chen, Y. H.; Li, T.; Boey, F. Y. C.; Ma, J. *Ceramics International* **2008**, 34, 1.
- (124) Lee, K.; Asher, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 9534.
- (125) Asher, S. A.; Alexeev, V. L.; Goponenko, A. V.; Sharma, A. C.; Lednev, I. K.; Wilcox, C. S.; Finegold, D. N. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 3322.
- (126) Jeong, K.-U.; Jang, J.-H.; Koh, C. Y.; Graham, M. J.; Jin, K.-Y.; Park, S.-J.; Nah, C.; Lee, M.-H.; Cheng, S. Z. D.; Thomas, E. L. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, 19, 1956.
- (127) Huang, C. K.; Lin, H. H.; Chen, J. Y.; Sun, K. W.; Chang, W. L. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, In Press, Corrected Proof.
- (128) Rodriguez, I.; Atienzar, P.; Ramiro-Manzano, F.; Meseguer, F.; Corma, A.; Garcia, H. *Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications* **2005**, 3, 148.
- (129) Wang, M.; Wang, X. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2008**, 92, 357.
- (130) Bartlett, P. N.; Birkin, P. R.; Ghanem, M. A. *Chem. Commun.* **2000**, 1671.
- (131) Ben-Ali, S.; Cook, D. A.; Evans, S. A. G.; Thienpont, A.; Bartlett, P. N.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **2003**, 5, 747.
- (132) Urbanová, V.; Vytras, K.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **2010**, 12, 114.

Chapitre 4

Elaboration de cristaux colloïdaux de grandes surfaces

4 Elaboration de cristaux colloïdaux de grandes surfaces

Le projet, tel qu'il a été défini dans le chapitre 2, vise à élaborer un réacteur pilote permettant de produire, avec des rendements en cohérence avec des applications industrielles, des produits chimiques à haute valeur ajoutée tels que des composés chiraux sous forme énantiopure ou des sucres rares.

Dans le but de favoriser l'obtention de taux de conversion électrochimique élevés pour assurer des rendements satisfaisants, l'aire de la surface active de l'électrode de travail, sur laquelle a lieu la réaction de synthèse, doit être maximisée. Comme il a été énoncé précédemment dans la partie 3.3.5 de ce rapport, introduire une porosité contrôlée dans la structure de l'électrode de travail permet d'augmenter significativement l'aire de sa surface active sans pour autant faire varier sa surface géométrique. Par conséquent le volume du dispositif final dans lequel l'électrode sera insérée ne sera pas modifié par cette optimisation. A terme, l'objectif étant d'assembler plusieurs réacteurs en parallèle pour accéder à une production à l'échelle industrielle, il apparaît donc judicieux d'avoir recours à une optimisation n'impliquant pas une exigence supérieure en termes de volume.

L'objectif premier qu'il est indispensable d'atteindre est de produire l'opale servant de template pour l'élaboration de l'électrode de travail. Comme il est ici question de travailler directement à l'échelle pilote, l'électrode finale devra présenter une surface géométrique atteignant la quarantaine de centimètres carrés, ainsi que le définit le cahier des charges sur lequel le projet se base. C'est à partir de ce critère à respecter que doivent être définies les technologies permettant d'obtenir le cristal colloïdal, de préférence de façon simple et, si cela est possible, sans la nécessité d'avoir à recourir à des dispositifs onéreux. Les méthodes doivent donc idéalement être rapides, peu coûteuses et permettre une élaboration contrôlable et reproductible de l'opale artificielle afin d'assurer une fabrication aussi fiable que rentable de l'électrode de travail des futurs dispositifs industriels. Une attention particulière sera consacrée à l'optimisation de la qualité du cristal afin que ses défauts éventuels ne se retrouvent pas dans la structure métallique de l'électrode. On note que la présence de lacunes, de dislocations, de chevauchements et de joints de grain [1] dans les opales artificielles sont autant de défauts susceptibles d'impacter son fonctionnement, et qui ne permettraient pas la comparaison de résultats obtenus d'une électrode à l'autre. En outre si la reproductibilité n'est pas assurée entre chaque électrode fabriquée, les optimisations futures du procédé de catalyse électroenzymatique activée sur celles-ci ne pourront être établies.

Comme les informations présentes dans les publications relatives à l'élaboration de cristaux colloïdaux font état de structures dont les surfaces géométriques n'excèdent pas l'ordre de la centaine de micromètre [2-4], rarement du centimètre [5], l'exploration à de plus grandes échelles s'impose. Il s'agira donc d'évaluer la viabilité de différentes méthodes testées sur des surfaces de

plusieurs cm^2 , en prenant soin d'observer les structures métalliques poreuses qui en résultent. Cela permettra également de déterminer si les défauts relatifs à chacune des méthodes étudiées peuvent être maîtrisés et par conséquent diminués, voire éventuellement réparés.

4.1 Cristaux colloïdaux formés sous évaporation

Les différentes voies d'élaboration du cristal ont été présentées dans le chapitre 3. Pour la majeure partie, elles font l'objet dans ce chapitre d'études en termes de développement « upscaling », c'est-à-dire, que l'on va chercher à augmenter l'aire totale du cristal colloïdal, tout en respectant la qualité de son arrangement. Dans cette partie, on étudie les méthodes d'obtention de cristaux colloïdaux induites par l'évaporation du solvant de la suspension colloïdale. Il s'agit de procédés simples, c'est-à-dire ne nécessitant pas de dispositifs spécifiques. Par conséquent, il est ici question de déterminer s'il est possible de fabriquer des électrodes d'or macroporeuses de grandes surfaces et à des coûts optimisés. Les travaux présentés dans les paragraphes suivants ont été effectués sur des électrodes d'une surface de 3 cm^2 environ afin d'évaluer de façon préliminaire la qualité des cristaux produits suivant les différentes méthodes. Les observations dans cette partie seront principalement qualitatives.

4.1.1 Evaporation verticale

L'évaporation verticale est une méthode permettant d'obtenir des cristaux colloïdaux de grandes surfaces. Il s'agit donc dans ce contexte d'appréhender si cette technique d'élaboration peut générer une aire d'opale exploitable pour l'électrodépôt d'or et par conséquent pour l'application du bioréacteur.

La majorité des méthodes d'élaboration de cristaux colloïdaux précédemment évoquées dans le chapitre 3 opèrent principalement sur des substrats non-conducteurs de silice [^{3,6,7}] ou semi-conducteur de silicium [²], non optimaux pour un électrodépôt d'or homogène. On trouve une publication faisant mention d'un substrat d'ITO [⁸]. Toutefois sa faible conductivité ne permet pas encore une fois un électrodépôt d'or satisfaisant. Aucune publication ne fait mention de transfert par évaporation verticale sur des substrats d'or. Le caractère hydrophobe de cette surface métallique influence les interactions en jeu lors de l'auto-assemblage des billes. Par conséquent les dépôts obtenus sur ce type d'échantillon ne sont pas comparables avec ceux décrits dans la littérature. On choisit donc de travailler avec des substrats d'or modifiés par des monocouches moléculaires auto-assemblées pouvant leur conférer un caractère hydrophile plus prononcé. La cystéamine est une molécule qui présente une fonction thiol reliée à une fonction amine via une chaîne alkyle de deux carbones. La fonction thiol assure l'adsorption de la molécule sur l'or, l'amine instaurant une

fonction hydrophile dirigée vers l'extérieur (Fig. 36). Dans un premier temps, l'impact de cette couche hydrophile sur la réalisation par évaporation verticale de cristaux colloïdaux de bonne qualité sera évalué. Ensuite il s'agira de déterminer les surfaces d'or macroporeux que l'on peut obtenir par la méthode d'évaporation verticale ainsi que leur qualité.

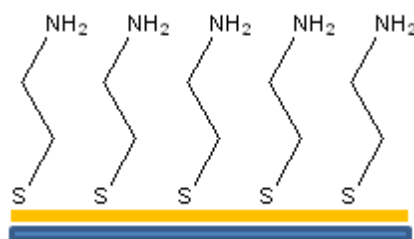


Figure 36 Schéma d'un substrat de verre recouvert par une couche d'or fonctionnalisée par une couche auto-assemblée de cystéamine

• Procédure expérimentale d'élaboration du cristal colloïdal par évaporation verticale

Des substrats de verre recouverts d'une couche d'or de 300 nm par l'intermédiaire d'une couche d'accroche Nickel/Chrome obtenus commercialement, sont d'abord lavés par une solution de piranha (2/3 H_2SO_4 , 1/3 H_2O_2). Ceux-ci sont ensuite rincés à l'eau puis séchés à l'air comprimé. Les billes ont été synthétisées suivant un procédé sans tensio-actifs décrit dans la littérature [9]. Les différentes concentrations des suspensions de billes de PS vont de 0.05 à 0.2 %_{solide}. La composition en solvant de la suspension varie entre 100 % eau, 50 % eau-50 % éthanol, 20 % eau-80 % éthanol. L'évaporation de la suspension s'est faite pour des températures allant de 25°C à 80°C. Différents taux d'humidité sont obtenus suivant que l'évaporation se produise dans des fours sans et avec application de vide (TH1 et TH2), et sous cloche dans un four sans application de vide (TH3). Avant chaque dépôt sur le substrat, la suspension colloïdale est passée au bain à ultra-son pour éliminer les éventuels agrégats.

Les substrats sont soit placés directement dans la suspension colloïdale, soit immergés au préalable dans une solution de 25 mM de cystéamine pendant 24 h. Après ce traitement et avant d'être placés dans la suspension, les substrats sont rincés à l'éthanol puis à l'eau avant d'être délicatement séchés sous air comprimé.

Une fois qu'un cristal colloïdal de qualité satisfaisante est élaboré, le substrat conducteur sur lequel il est déposé est relié à un potentiostat en tant qu'électrode de travail (ET). Une plaque de platine est utilisée en tant que contre-électrode (CE) et l'électrode d'Ag/AgCl saturée est mise à la référence (RE). Le bain d'électrodépôt commercial ECF 60 contenant les ions or à réduire sur la surface du métal est obtenu commercialement. L'électrode à recouvrir est placée 15 min dans le bain avant électrodépôt afin de permettre à la solution d'infiltrer complètement le cristal. Lors de l'électrodéposition, une attention particulière est apportée au positionnement de la CE

parallèlement à l'ET pour établir un champ électrique homogène sur le substrat et ainsi assurer un électrodépôt régulier. L'électrodépôt s'effectue à un potentiel de -0,66 V appliqué à l'électrode de travail sur un temps variable généralement compris entre 500 sec et 3000 sec.

Pour révéler la structure d'or macroporeux, les substrats modifiés par électrodépôt sont immergés dans une solution de toluène pendant dix minutes environs. Ils sont ensuite rincés une nouvelle fois dans une solution de toluène neuve afin de s'assurer de l'élimination complète de toute trace de PS.

- **Résultats**

Dans un premier temps, on évalue l'effet de la couche auto-assemblée de cystéamine sur la qualité du dépôt colloïdal. On observe que pour des paramètres expérimentaux similaires, à savoir la concentration en billes (particules de PS de 300nm de diamètre) de la suspension (0,1 %_{solide}), la température d'évaporation (50°C), le taux d'humidité (TH1) et le niveau initial du liquide sur les substrats, le front de dépôt apparaît beaucoup plus tôt sur l'or traité (substrat de droite, Figure 37).

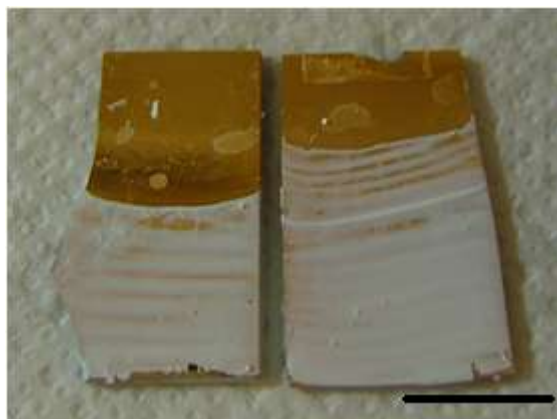


Figure 37 Comparaison de deux substrats d'or non traité (à gauche) et traité par une couche auto-assemblée de cystéamine (à droite). Pour le substrat traité, le dépôt de billes de PS (300nm) se produit dès le début du phénomène d'évaporation de solvant, alors qu'il se déclenche plus tard pour le substrat non modifié (échelle : 1 cm).

La photographie ci-dessus révèle que le dépôt de billes est favorisé lorsqu'il se produit sur un substrat dont le caractère hydrophile est plus marqué. L'affinité du solvant de la suspension pour le substrat influence directement la forme du ménisque, siège de l'auto-assemblage des billes et donc favorise de cette façon le déclenchement du phénomène de formation du cristal. Par conséquent, on suppose que dans la zone formée par des ménisques obtus, lorsque solvant et substrat possèdent des affinités marquées, les phénomènes d'auto-assemblage sont avantagés par une évaporation plus rapide, ce qui entraîne des transports convectifs plus marqués ainsi qu'une contrainte générée par des forces de capillarité plus intenses dues à la faible épaisseur de liquide dans cette région (Fig. 38).

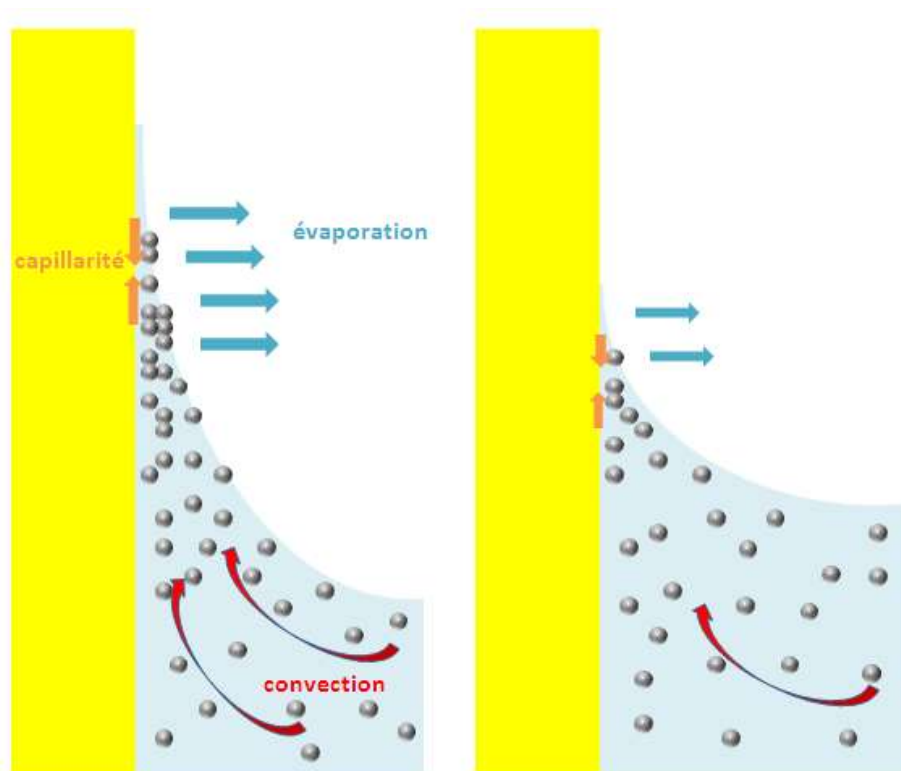


Figure 38 Schématisation des différents types de paramètres concourants à la favorisation d'auto-assemblage de billes dans le cas d'un ménisque marqué (gauche) et d'un ménisque moins prononcé (droite)

Il est important de noter dans le cliché de la Figure 37 l'augmentation de l'épaisseur en bas de substrat. Ceci est aisément expliqué par les variations de concentration de la suspension qui, au fur et à mesure que le solvant s'évapore, se concentre en billes.

Par ailleurs, l'observation des substrats de la Figure 37 révèle dans le cas des deux substrats des variations plus ou moins périodiques de l'épaisseur du dépôt. En effet, il apparaît que l'auto-assemblage de billes créé à la surface de l'or s'effectue sous forme de « vagues ». Les clichés MEB de la Figure 39 montrent que le nombre de couches de billes déposées peut passer de quelques couches (trois couches de billes sur le cliché A)) à plusieurs dizaines de couches (cinquantes couches environ sur le cliché C)).

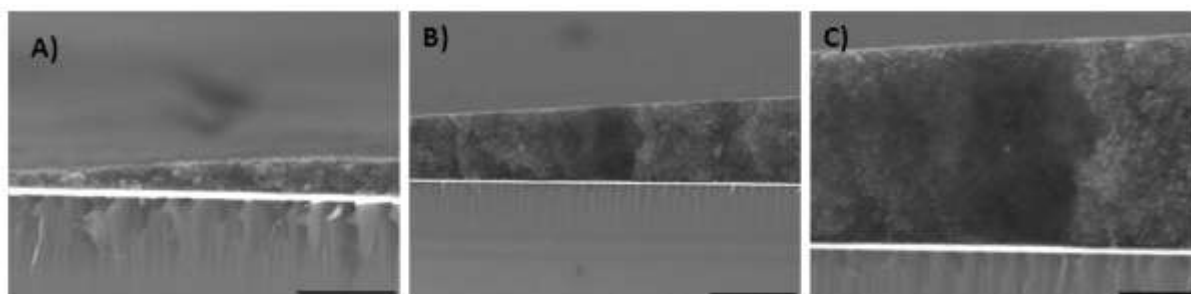


Figure 39 Clichés MEB d'une coupe transverse d'un cristal colloïdal obtenu par évaporation verticale à 50°C, TH1 d'une suspension de billes de 380 nm de diamètre (échelle A) et C) : 5 µm, B) 15 µm)

L'explication de la variation quasi périodique de l'épaisseur du dépôt réside dans la considération de l'état du ménisque au cours de la procédure d'évaporation verticale. Lorsque le phénomène de dépôt débute, la forme du ménisque est déterminée seulement par l'affinité du solvant pour la surface d'or (modifiée ou non). Dans un premier temps, l'auto-assemblage de billes se constitue dans cette zone lorsque les paramètres favorables de concentration en particules, de taux d'évaporation du solvant et d'attractions interparticulaires dues à la capillarité sont réunis. Dans un deuxième temps et une fois que le dépôt de particules a débuté, l'état du ménisque se modifie. En effet, un nouveau paramètre influence sa forme : il s'agit du réseau de particules déposées qui, par des phénomènes de capillarité, retiennent le liquide à une altitude plus élevée que si elles étaient absentes de la surface du support. Ceci a pour conséquence de modifier la forme du ménisque, donc son volume ainsi que son aire de recouvrement du substrat. Il en résulte des conditions de dépôt modifiées qui impliqueront des assemblages de particules plus fins. Dans un troisième temps, lorsque le ménisque se forme sur le substrat au niveau de cristaux colloïdaux de faible épaisseur, l'influence des billes déjà auto-assemblées est moindre. Le ménisque se rapproche alors de sa forme initiale et l'épaisseur du dépôt augmente à nouveau et ainsi de suite. L'évolution de l'état du ménisque au cours de l'évaporation verticale a été schématisée dans la figure ci-dessous :

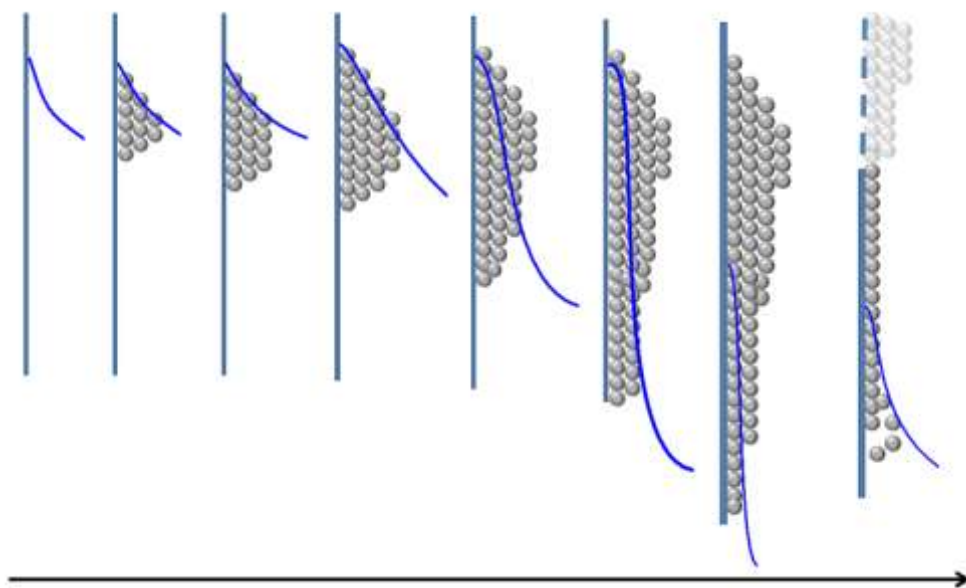


Figure 40 Schéma de l'évolution du ménisque formé par la suspension de billes et le substrat au cours de l'évaporation verticale.

Par la suite, divers paramètres sont testés à savoir la concentration de la suspension, la température d'évaporation, la composition du solvant de la suspension, l'angle d'inclinaison ainsi que le taux d'humidité. Il s'agit de déterminer s'il est possible de minimiser les défauts macroscopiques à savoir le phénomène de vagues ainsi que ceux qui apparaissent à l'échelle microscopique tels que les craquelures du cristal.

L'étude des différentes concentrations de la suspension colloïdale initiale a révélé que pour des concentrations trop faibles ($<0.1\ \%_{\text{solide}}$), le front de dépôt du cristal se trouve à une distance très en dessous du niveau initial du ménisque, engendrant de faible proportion de surface exploitable pour l'électrodépôt par rapport à celle du substrat initial. De plus, pour cette gamme de concentration, le dépôt se forme de façon très irrégulière, révélant une alternance de langue de dépôt de billes et de zones non recouvertes du substrat d'or. A l'opposé, pour des concentrations trop importantes ($>0.2\ \%_{\text{solide}}$), l'épaisseur du cristal en bas de substrat est considérablement élevée ce qui engendre une fragilité du dépôt qui se désolidarise facilement du reste du substrat. Un compromis doit donc être défini pour obtenir une surface de dépôt satisfaisante tout en assurant un assemblage de billes stable même en bas de substrat. La concentration de $0,1\ \%_{\text{solide}}$ donne des résultats convenables. Par conséquent elle est conservée pour poursuivre les tests suivants.

A l'échelle microscopique, des craquelures qui sillonnent verticalement le cristal colloïdal sont observées. Il apparaît que ces défauts, quelle que soit l'origine de leur formation, sont quasiment inévitables. Leur cause fondamentale est l'assèchement en solvant du cristal dû à l'évaporation qui élimine la couche de solvation qui entoure encore chaque sphère après qu'elles se soient auto-assemblées en un réseau compact [10,11]. La perte de la couche de solvation engendre une diminution de la taille individuelle des sphères forçant le réseau compact à se contracter ce qui produit les craquelures. La photographie MEB ci-dessous montre une fissure du cristal à partir de son point de départ, ainsi que son chemin de propagation au travers de l'assemblage de particules, qui scinde le cristal en deux. L'aspect de la brèche montre que de part et d'autre de la craquelure, l'assemblage des billes s'emboîtait parfaitement avant l'apparition du défaut. Ceci confirme que l'apparition de l'imperfection n'est pas concomitante avec l'auto-assemblage des billes, mais lui succède.

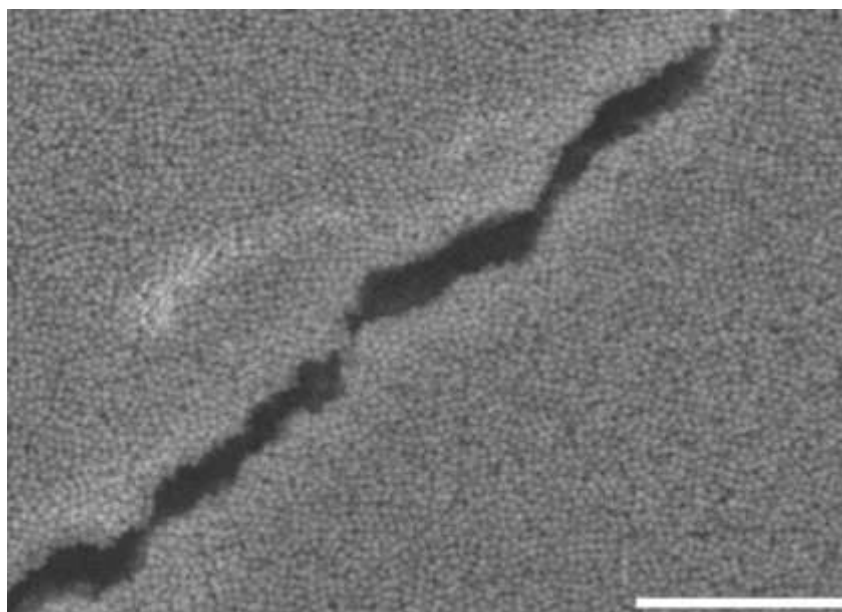


Figure 41 Observation MEB d'une fissure d'un cristal colloïdal obtenu par évaporation horizontale à partir d'une solution de billes à $0.1\ \%_{\text{solide}}$ à 50°C et TH2. (échelle: $10\ \mu\text{m}$)

Les observations MEB permettent par ailleurs de constater que la distance intercraquelures diminue avec l'augmentation de la concentration de la suspension. Par exemple des cristaux formés à partir de suspensions de billes PS de 500 nm de diamètre à 50°C et à TH1 ayant des concentrations de 0.05 %_{solide}, 0.1 %_{solide} et 0.2 %_{solide} montrent des espacements de craquelures respectives de 160, 140 et 125 μm , voir Figure 42.

Les observations microscopiques de ces mêmes échantillons ont permis de souligner que les craquelures verticales ne sont pas les seuls défauts apparaissant à l'échelle macroscopique. En bas de substrat, pour des épaisseurs de cristaux de quelques centaines de micromètres, des craquelures apparaissent en dehors des fissures régulières précédemment décrites. On suppose qu'en ces zones très épaisses, les défauts ne peuvent plus se canaliser au niveau des fissures mais sont contraints de se produire de façon plus répartie sur le cristal. Ceci souligne une nouvelle fois l'intérêt de contrôler et de minimiser l'épaisseur du cristal en fin de dépôt.

On note que la qualité de la suspension colloïdale initiale joue également un rôle dans la régularité de l'organisation du cristal. En effet, si les nanoparticules ne sont pas monodisperses des lignes de dislocation qui peuvent s'initier et se propager dans le cristal [6]. Cela est généralement dû à des particules « doublet » ou des particules dont le diamètre excède la moyenne. Une bille manquante dans un réseau génère un défaut de moindre importance, nommé lacune.

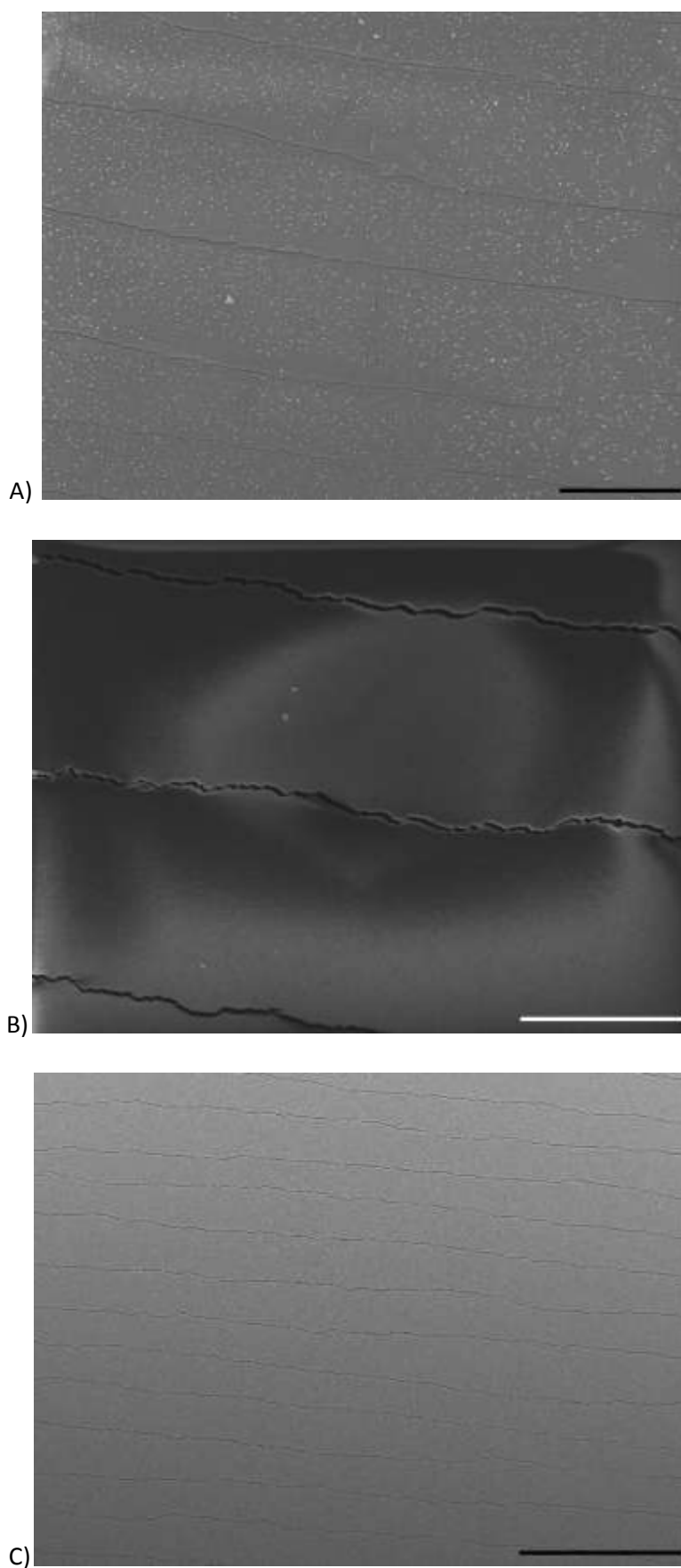


Figure 42 Clichés MEB de cristaux colloïdaux obtenus à partir de billes de 320 nm de diamètre ayant subi une évaporation verticale à 50°C à TH1. A) 0.05 %_{solide} B) 0.1 %_{solide} C) 0.2 %_{solide} (échelle : A) 150 μm, B) 100 μm, C) 500 μm)

La Figure 43 permet d'observer les détails du cristal colloïdal obtenu par la méthode d'évaporation horizontale. De nombreuses zones d'arrangement compact sont visibles mais leur surface est relativement faible et elles se trouvent entourées des défauts tels que des lacunes ou des zones de joint de grain.

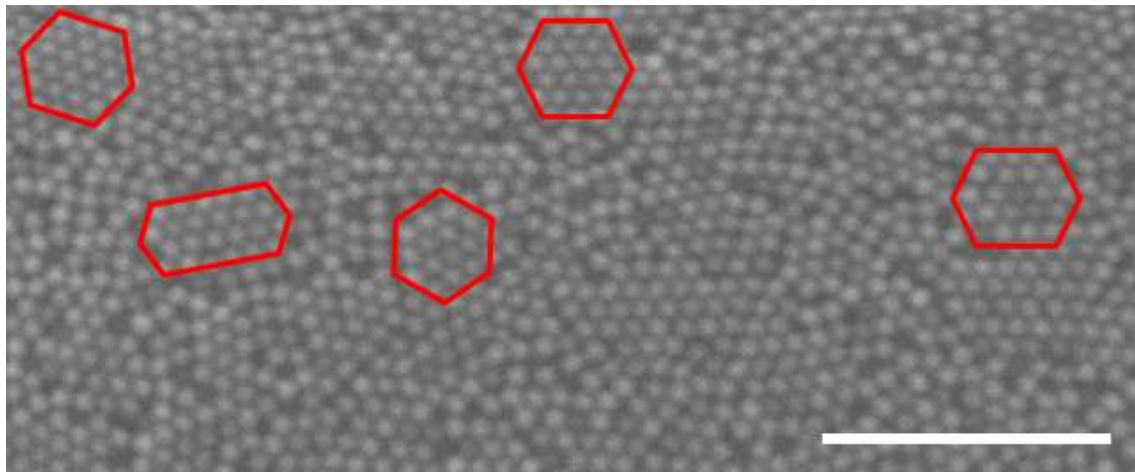


Figure 43 Observations MEB de la structure d'un cristal colloïdal obtenu par évaporation verticale à partir d'une solution de billes de 330 nm à 0.1 %_{solide} à 50°C et TH2. Les hexagones rouges mettent en valeur certaines zones d'organisation compactes. (échelles : 5 µm)

On remarque qu'aucune influence notable de la concentration sur l'organisation compacte des cristaux à l'échelle microscopique n'a pu être relevée. (Il aurait fallu pouvoir comparer le ratio des aires organisées par rapport à celles qui ne le sont pas pour toutes les catégories de substrats, mais ceci est difficilement réalisable avec les outils à disposition.)

L'impact de la température sur la qualité du cristal se révèle d'abord à l'échelle macroscopique. On constate en effet que des substrats obtenus pour des températures élevées (aux alentours de 75°C) ont tendance à présenter des variations périodiques de leur épaisseur plus amples, ce qui peut contribuer à l'inhomogénéité d'un électrodépôt d'or dans ce cristal. A l'échelle microscopique, suite aux observations des clichés MEB, on remarque que plus la température d'évaporation est basse, plus les zones d'arrangement des cristaux sont grandes et les fractures du cristal rapprochées (Fig. 44 A)). A contrario plus la température est élevée, plus les cristaux formés présentent des zones d'arrangement de petite taille, et plus les craquelures sont espacées (Fig. 44 B)). Ceci peut s'expliquer par l'apparition de contraintes beaucoup plus marquées et localisées dans le cas de structures parfaitement ordonnées au sein desquelles des « tensions » nécessaires à l'arrangement apparaissent tandis que ces contraintes se trouvent plus réparties dans une structure moins organisée et moins compacte.

Par ailleurs des cristaux obtenus à partir d'une même suspension de billes (320 nm de diamètre dispersées à 0.1 %_{solide}) évaporée à deux températures différentes, 35°C et 75°C, vont présenter des fissures plus rapprochées pour des températures d'évaporation élevées : 115 µm pour ceux obtenus à 75°C et 150 µm pour ceux à 35°C. Il semblerait donc que la densité des craquelures dans le cristal

soit déterminée par la vitesse de formation du cristal, une forte concentration ou une haute température d'évaporation.

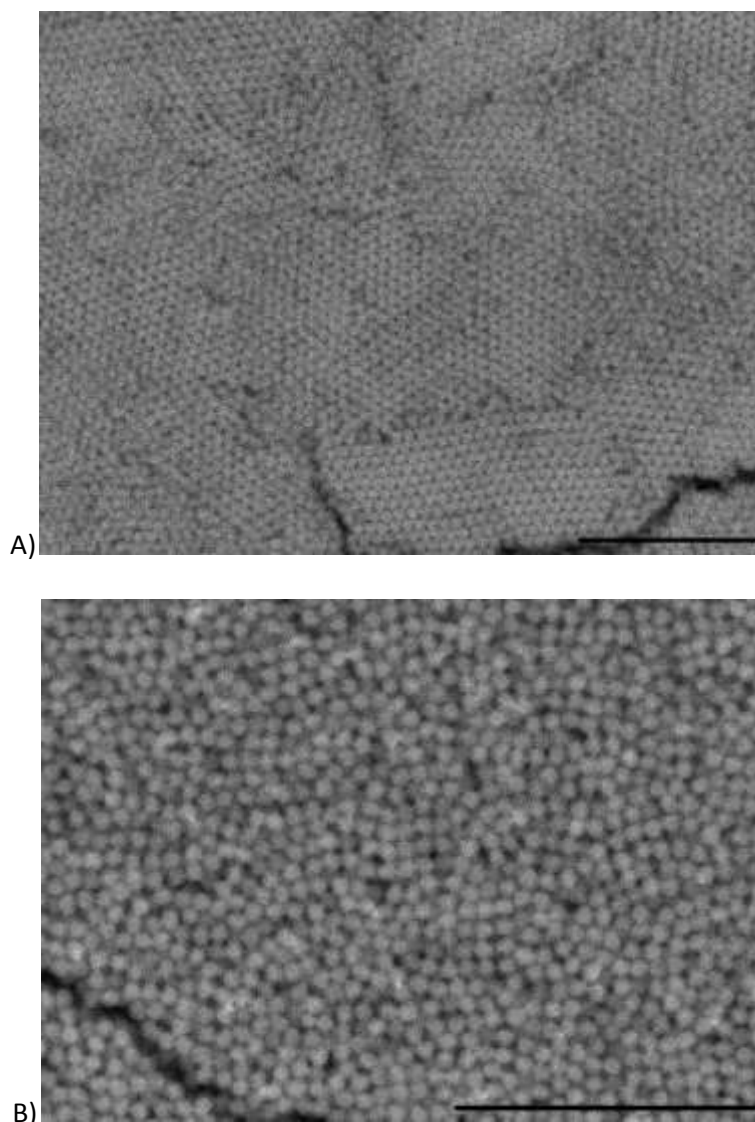


Figure 44 Clichés MEB d'un cristal colloïdal obtenu à partir d'une suspension de billes de 320 nm de PS évaporé à TH1 et à A) 35°C, B) 75°C (échelles : A) et B) 5 μ m)

De façon prévisible, on observe que les variations de composition du solvant de la suspension, de par les différences de température d'évaporation qu'elles induisent, vont influencer sur la cinétique du processus d'assemblage et donc sur la qualité de l'organisation du cristal. Ainsi si la suspension n'est pas seulement composée d'eau mais possède un pourcentage en éthanol (20 %_{vol} ou 50 %_{vol}), la température d'évaporation sera abaissée et par conséquent la formation du cristal sera accélérée. Celui-ci présentera donc des craquelures plus rapprochées et une stabilité moindre. Ainsi employer un solvant présentant une basse température d'ébullition donne des résultats équivalents à ceux obtenus par évaporation pour des températures élevées. Comme l'objectif est de former le cristal de meilleure qualité, l'emploi de l'éthanol comme solvant de suspension n'a pas été retenu.

Dans le but d'appréhender si l'angle d'inclinaison du substrat dans le récipient contenant la suspension pouvait impacter la qualité du cristal déposé, trois différents angles ont été expérimentés : 0°, 36° et 70°. Aucune différence n'a été relevée pour les angles les plus faibles, en revanche lorsque le substrat se rapproche de l'horizontale, c'est-à-dire de 90°, la qualité de l'opale à l'échelle microscopique est altérée, et ceci de façon plus marquée à mesure que l'on se rapproche du bas du substrat. En effet, en fin de procédure de dépôt, lorsque la suspension de billes s'est concentrée sous l'évaporation du solvant, l'assemblage de particules n'est plus seulement dirigé par les phénomènes caractéristiques agissant dans la zone du ménisque mais aussi par l'évaporation horizontale simple. Or, comme expliqué précédemment, l'évaporation rapide d'une suspension présentant des concentrations élevées n'est pas favorable à la création d'un cristal de bonne qualité. Pour des raisons pratiques et de comparaison, une évaporation verticale stricte, c'est-à-dire à 0°C a été appliquée.

La qualité du cristal en fonction des différents taux d'humidité auxquels ils sont soumis lors de leur formation a été évaluée macro et microscopiquement. On note que plus l'humidité est basse et plus le cristal est organisé et plus il est nervuré de fissures verticales. Des taux d'humidité élevés à l'inverse vont avoir tendance à déstabiliser les mécanismes d'auto-assemblage au niveau du ménisque, vont retarder le dépôt et le rendre moins homogène sur le substrat. La photographie de la Figure 45 présente un substrat recouvert par un dépôt de billes effectué dans un four à 50°C, dans un premier temps sans application du vide puis dans un deuxième temps avec, en d'autres termes, suivant les taux d'humidité TH1 puis TH2. Le dépôt formé sous TH1 est relativement fin et présente des irrégularités visibles à l'œil nu, tandis que celui formé sous vide à TH2, semble plus régulier et plus compacte. Ceci est conforté par les clichés MEB qui montrent une organisation aléatoire des billes dans le cas d'évaporation sous forte humidité, et une organisation plus compacte de ces dernières lorsque l'humidité est plus basse. On en conclut que plus le taux d'humidité est faible, plus la formation d'un dépôt organisé et exploitable pour l'électrodéposition est favorisée.

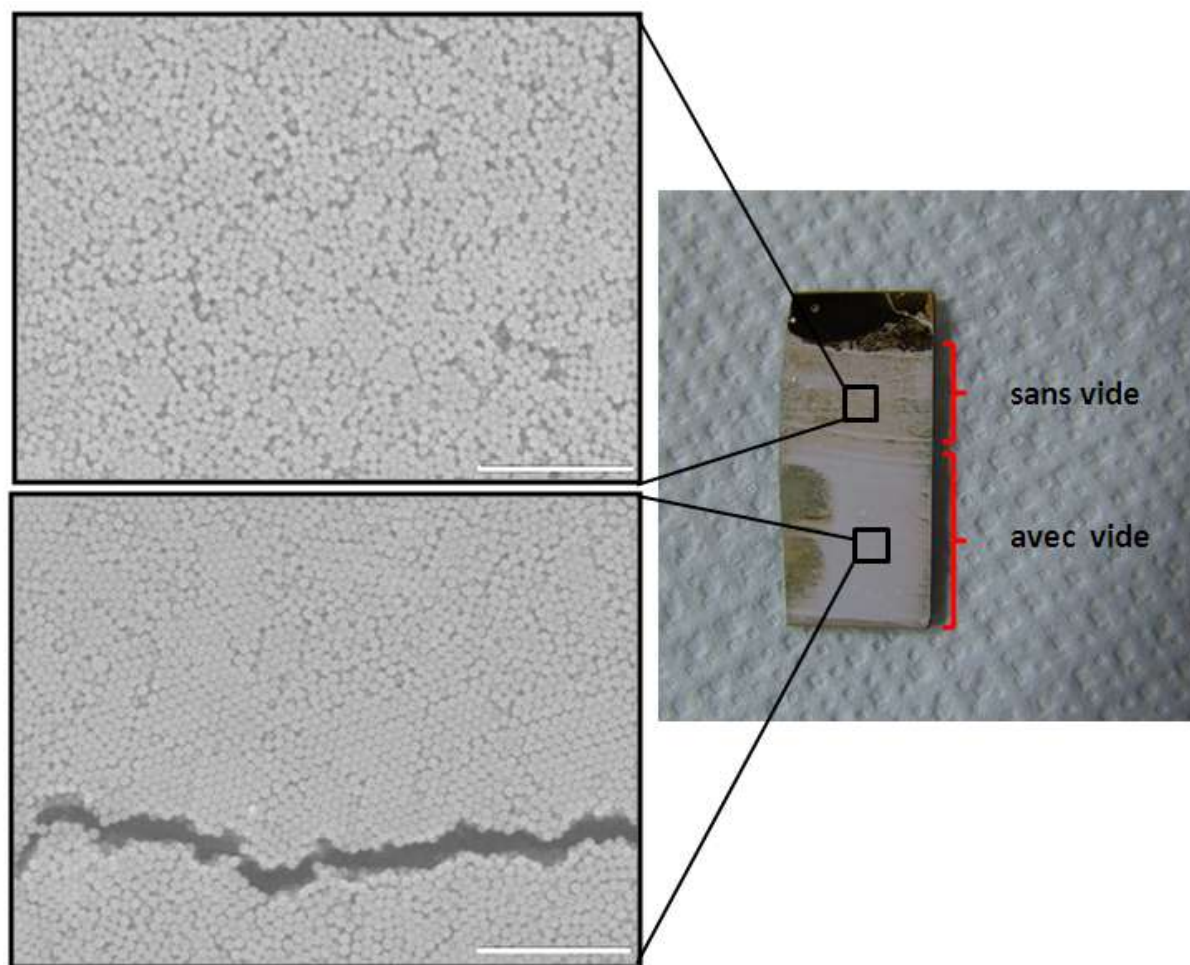


Figure 45 Substrat recouvert par un dépôt de bille effectué par évaporation verticale dans un four à 50°C. La première phase du dépôt se déroule sans vide à TH2, et la deuxième avec application du vide à TH1.

En conclusion de ces tests, les conditions optimales qui semblent se démarquer sont une concentration de 0.1 %_{solide}, une température de 35°C, une solution constituée d'eau uniquement, un substrat placé à la verticale et un taux d'humidité aussi bas que possible. Ces conditions permettent d'établir un compromis entre une bonne cohésion globale du substrat, un front de dépôt du cristal suffisamment élevé et une épaisseur en bas de substrat la plus fine possible.

Les substrats recouverts par les dépôts de particules colloïdales obtenus par cette méthode optimisée sont modifiés par électrodépôt d'or puis passés au toluène pour obtenir la structure macroporeuse métallique finale. Pour pouvoir électrodéposer le métal dans un tel dépôt, il est nécessaire de sélectionner les zones où l'arrangement et l'épaisseur révèlent la meilleure homogénéité. En effet, lors de la réduction des sels d'or en or métallique, le phénomène d'électrodépôt débutera dans les endroits du cristal faciles d'accès, c'est-à-dire où l'épaisseur est moindre, dans les trous ou dans les crevasses occasionnés par les défauts. Dans ces zones, le champ électrique se fait plus intensément ressentir que dans les parties du cristal plus épaisses ou mieux organisées à cause d'un effet d'«écranage» plus intense occasionné par la densité du réseau compact de billes. De plus, une fois que l'électrodépôt s'est amorcé en un point, il se poursuit

préférentiellement à cet endroit au détriment des zones de meilleure qualité à cause d'un transport diffusionnel plus efficace.

Au cours de l'électrodépôt, on constate que les chronoampérogrammes enregistrés ne permettent pas le suivi de l'évolution de la croissance de l'or dans le template. En effet, les oscillations ne sont pas systématiquement présentes, et si elles peuvent être observées en début de signal, elles sont vite atténuées (voir Figures 46). Les défauts du cristal tels que l'inhomogénéité de son épaisseur et les craquelures qui le sillonnent induisent une croissance désordonnée ce qui ne peut générer les oscillations dans le signal ampérométrique. Ces inconvénients ne permettront ni de prédire si la structure poreuse est ouverte (c'est-à-dire se termine sur une demi couche de pore ouverte), ni de contrôler le nombre de demi-couches ou de couches d'or que l'on électrodépose.

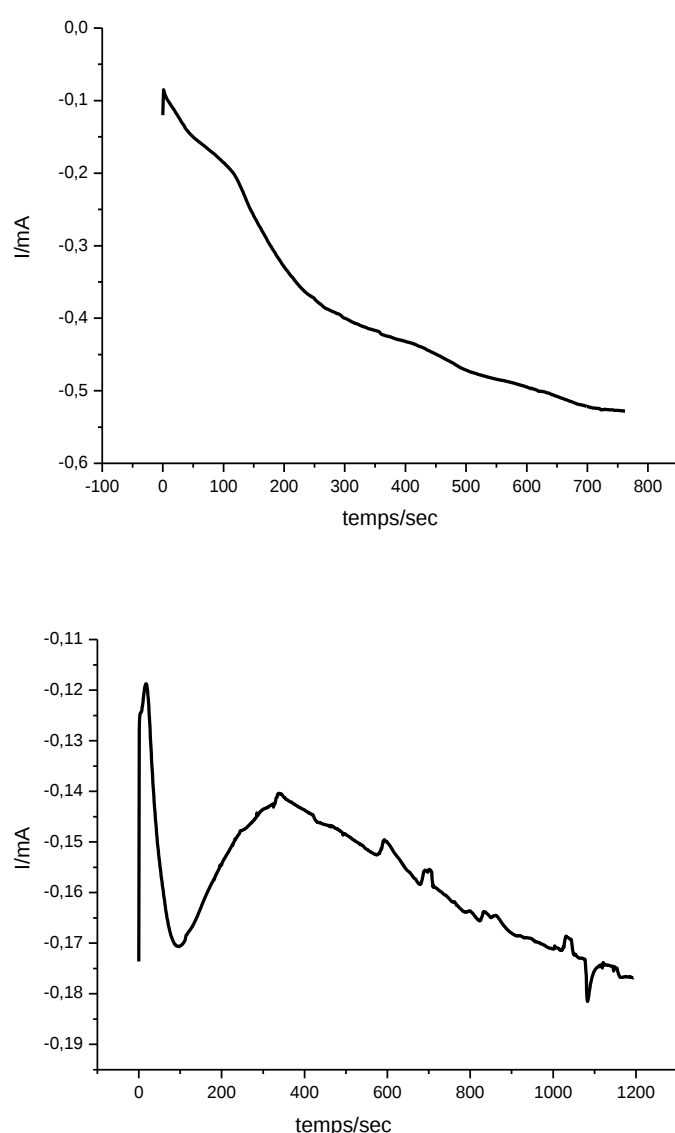


Figure 46 Exemples de chronoampérogrammes lors de l'électrodépôt d'or. ($E(V) = -0.66 V$)

De façon pragmatique, déjà à l'échelle macroscopique, on constate que le dépôt d'or poreux est très inhomogène à cause des variations de couleurs qu'il présente, (Fig. 47 A)):

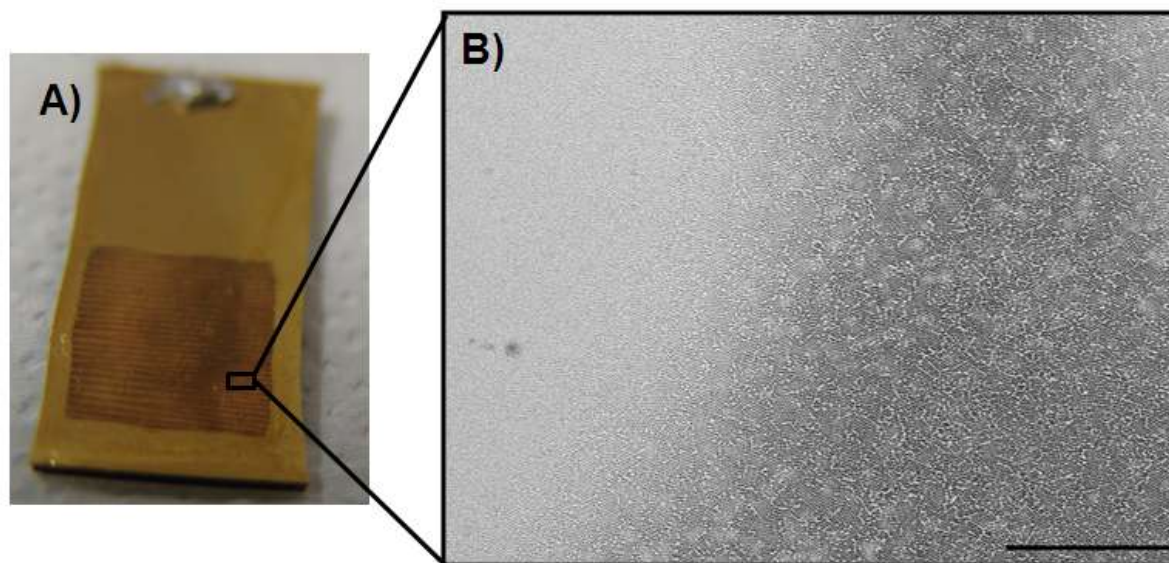


Figure 47 Photographie d'un substrat d'or sur lequel a été effectué un dépôt d'or macroporeux obtenu via un template de billes élaboré par évaporation verticale.

Le cliché obtenu au MEB (Fig. 47 B)) montre que les ondulations de l'épaisseur du cristal se répercutent sur l'aspect général de l'électrodépôt. En effet, dans les creux de l'opale, l'or électrodéposé n'est rapidement plus poreux étant donné qu'il se forme au-dessus de la dernière couche de billes.

D'autre part, comme le révèle le cliché MEB suivants, l'or macroporeux formé présente des zones de pores hautement organisées en structure hexagonale compacte, cohabitant avec des zones moins organisées où la disposition des espaces vacants laissés par les billes dissoutes est plus aléatoire (Fig. 48).

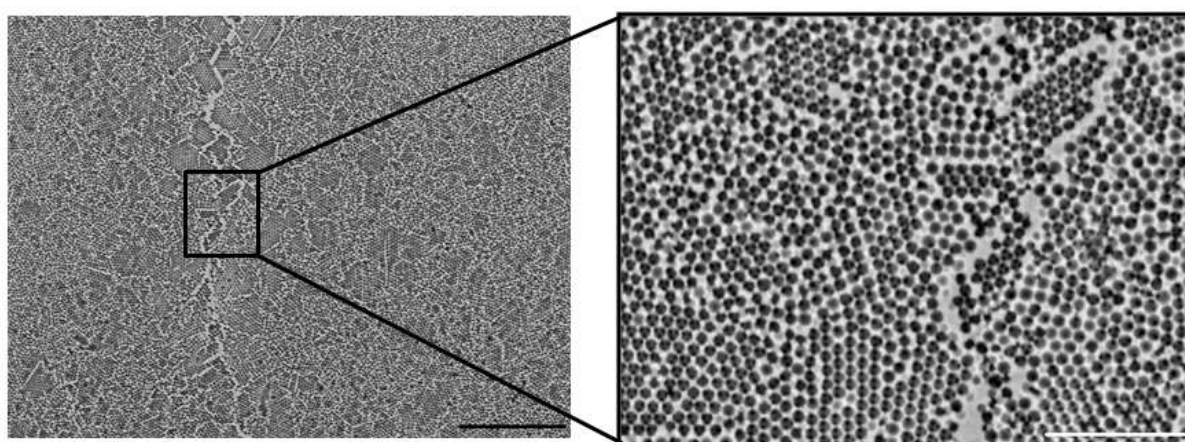


Figure 48 Observations MEB d'un électrodépôt d'or macroporeux effectué dans un cristal colloïdal obtenu par évaporation verticale. A droite, un agrandissement de la structure métallique inverse d'une zone hexagonale compacte. (échelle à gauche : 15 μm , échelle à droite: 5 nm)

Par ailleurs, l'image MEB de gauche de la Figure 48 montre que les zones d'organisation hexagonale compacte sont plus concentrées au niveau du comblement de la fissure du template. Cette observation souligne une nouvelle fois que les fissures se propagent dans les zones où les domaines d'arrangement sont plus denses afin de libérer les tensions créées en ces zones. L'or électrodéposé a moulé l'intégralité de la structure colloïdale, répercutant ses arrangements et ses défauts dans la structure poreuse inverse. Comme pour les substrats obtenus par évaporation horizontale, l'inconvénient souligné dans ces clichés est la projection des fissures du cristal dans la structure poreuse sous forme de nervures d'or dense. Une forte densité de ces altérations peut également conduire à l'isolement de certaines zones de l'électrode (voir schéma ci-dessous).

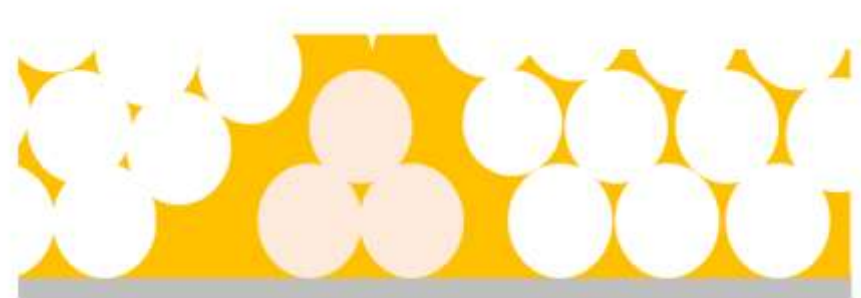


Figure 49 Schéma d'une coupe transverse d'une électrode macroporeuse présentant des pores isolés par des défauts de la structure du template

Si on considère l'application finale de cette structure métallique poreuse, il s'agit donc d'un problème majeur car les zones de défauts qui marquent une rupture de la porosité peuvent entraver par endroit la communication électrochimique entre électrode et milieu réactionnel extérieur. Par conséquent ceci peut limiter l'accès des espèces électrocatalytiques en jeu à l'intégralité de la structure poreuse. Dans ces conditions il apparaît impossible d'utiliser de telles électrodes pour les études d'optimisation du système électrocatalytique. De plus les défauts plus petits créés au niveau de juxtaposition de deux zones d'arrangement distinctes nuiront également à une activité électrochimique optimale de l'électrode. Malgré la possibilité qu'offre cette méthode pour élaborer des cristaux colloïdaux de grande taille, jusqu'à $12,5 \text{ cm}^2$ dans le cas de cette étude, cette catégorie d'électrode ne peut être retenue pour la mise en place et l'optimisation du système électrocatalytique responsable de la synthèse fournie par le réacteur.

4.1.2 Évaporation verticale sous retrait : méthode du « dip-drawing »

Cette méthode d'élaboration de cristaux colloïdaux exploite également de l'auto-assemblage de nanoparticules au niveau d'un ménisque créé par le contact entre le liquide de la suspension colloïdale et le substrat à recouvrir. Dans cette zone, l'évaporation du solvant de la suspension entraîne la formation des opales artificielles à la surface du support. Dans le but d'harmoniser

l'épaisseur du cristal sur toute la surface d'un dépôt, le procédé d'évaporation verticale est complété d'une procédure de « dip-drawing ». Il s'agit donc de fixer le substrat sur lequel se déroule le dépôt à un bras mécanique qui le retire à une vitesse déterminée et constante afin que le dépôt formé ait une épaisseur plus homogène non impactée par l'augmentation de la concentration de la suspension. On cherche également à observer si ce type de procédé peut diminuer les ondulations de l'épaisseur du cristal. Pour cette méthode, la concentration en billes est largement supérieure à celle employée dans une procédure d'évaporation verticale classique. Cela est nécessaire à la formation du dépôt qui doit se faire dans un temps beaucoup plus court que précédemment. Le bécher contenant la suspension, est posé sur un chauffe ballon afin de maintenir le système à une température constante permettant l'évaporation plus rapide du solvant. Ceci permet d'accélérer l'évaporation du solvant au niveau du ménisque mais aussi d'homogénéiser la concentration de la suspension par les mouvements de convection.

- **Procédure expérimentale**

Les mêmes types de substrats de verre recouverts d'une couche d'or sont traités de façon similaire à ce qui a été décrit dans les méthodes d'évaporation précédentes en ce qui concerne les lavages et le traitement à la cystéamine. A la suite de ces premières étapes, ils sont placés dans une suspension de billes de PS à 1, 5, 7 ou 10 %_{solide}. Le bécher contenant la suspension colloïdale est maintenu à 40°C. Le substrat d'or est maintenu à la verticale par un « dipper » c'est-à-dire un bras mécanique, qui peut se déplacer à la verticale suivant une vitesse définie de 5 à 20 $\mu\text{m.s}^{-1}$.

- **Résultats**

Les substrats obtenus par cette méthode montrent également un dépôt dont l'épaisseur ondule. Néanmoins l'épaisseur finale du dépôt « en haut de vague » est comparable tout le long du dépôt, ce qui permet la formation d'un cristal plus homogène de haut en bas du substrat.

Les observations microscopiques faites au MEB montrent des cristaux colloïdaux présentant des zones d'arrangement d'orientation différentes accolées les unes aux autres. Malgré cette qualité microscopique, les dépôts obtenus par cette technique sont aussi nervurés de fissures verticales (Fig.50).

Afin de limiter les ondulations de l'épaisseur et les fissures du cristal, l'optimisation des paramètres de concentration de la suspension et de vitesse de retrait du procédé est étudiée. On constate que plus la solution est concentrée, plus la vitesse de retrait doit être élevée. Par exemple pour une concentration de 10 %_{solide}, une vitesse de retrait de 5 $\mu\text{m.s}^{-1}$ est inappropriée car le dépôt formé dans ces conditions est très irrégulier révélant d'importants amas de billes. A l'opposé, des concentrations faibles (1%_{solide}) combinées avec des vitesses de retrait trop élevées (>10 $\mu\text{m.s}^{-1}$) produisent des dépôts éparses et discontinus à la surface du substrat. Des dépôts d'homogénéité satisfaisante ont été obtenus pour une concentration de 10 %_{solide} associée à une vitesse de retrait de 7 $\mu\text{m.s}^{-1}$.

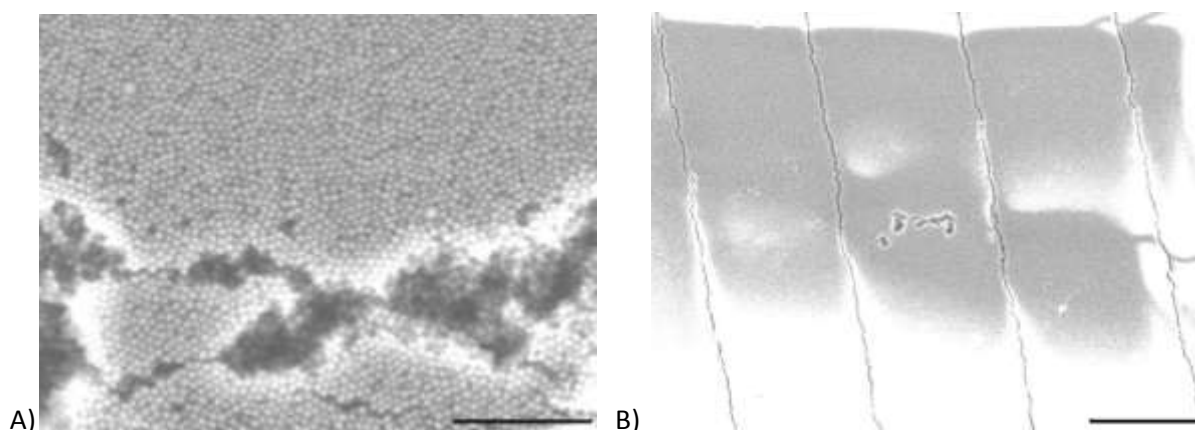


Figure 50 Observations MEB de cristaux colloïdaux obtenus par la méthode de « dip-drawing ». La photographie A) montre des zones d'arrangement juxtaposées les unes aux autres perturbées par la présence de craquelures. Le cliché MEB B) souligne la présence régulière de fissures verticales dans le cristal (échelle : A) 5 µm B) 100 µm)

Sur les échantillons obtenus selon les paramètres optimisés, il est possible de sélectionner des zones de plusieurs mm² voire d'environ 1 cm² où l'épaisseur semble assez homogène pour effectuer l'électrodépôt d'or. Les clichés MEB révèlent une bonne qualité des structures macroporeuses formées (Fig.51). Toutefois la variation périodique de l'épaisseur du cristal sur tout le substrat ne permet pas l'élaboration d'une électrode de grande surface de qualité homogène car il présente des zones d'arrangement de pores de qualité côtoyant des zones de dépôt d'or dense. La présence de nervures dues au comblement des craquelures lors de l'électrodépôt de l'or s'ajoute au défaut précédent. En conclusion, les observations microscopiques réalisées pour cette catégorie de substrat sont donc similaires à celles effectuées précédemment sur ceux obtenus par la méthode d'évaporation verticale présentée dans la partie 4.1.1.

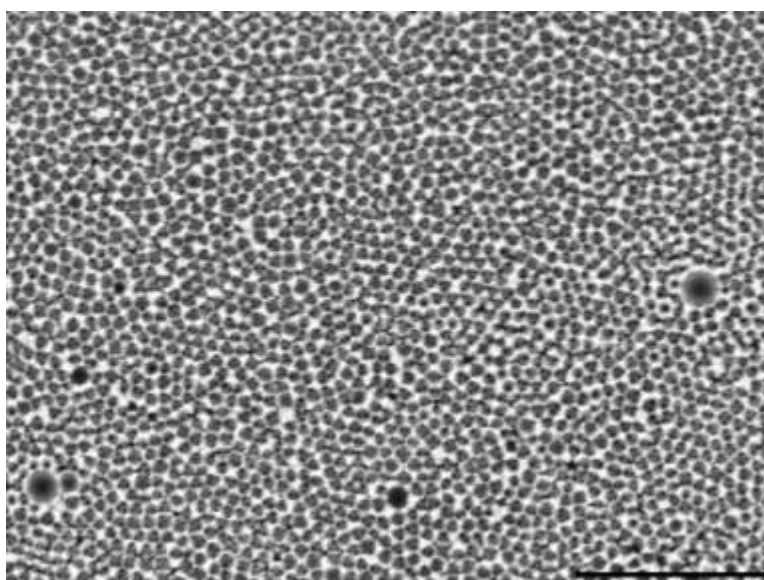


Figure 51 Observation MEB d'électrodépôts d'or au travers de cristaux colloïdaux obtenus par la méthode de « dip-drawing » (échelle : 5 µm).

La présence des défauts dans les cristaux est encore une fois prévisible grâce aux observations des courbes obtenues par électrodépôt, (voir courbes de la Figure 52). On note que pour des électrodépôt effectués sur des zones les plus petites, où l'occurrence des défauts est moindre, il est possible d'observer jusqu'à deux oscillations. Toutefois même pour ces petites surfaces de dépôt, la contribution des défauts résulte en un écrasement du signal, par rapport à celui attendu pour un cristal parfait. Plus la surface à recouvrir est grande et moins les oscillations sont faciles à obtenir, et moins la maîtrise de l'épaisseur de l'électrodépôt est envisageable (Fig. 52).

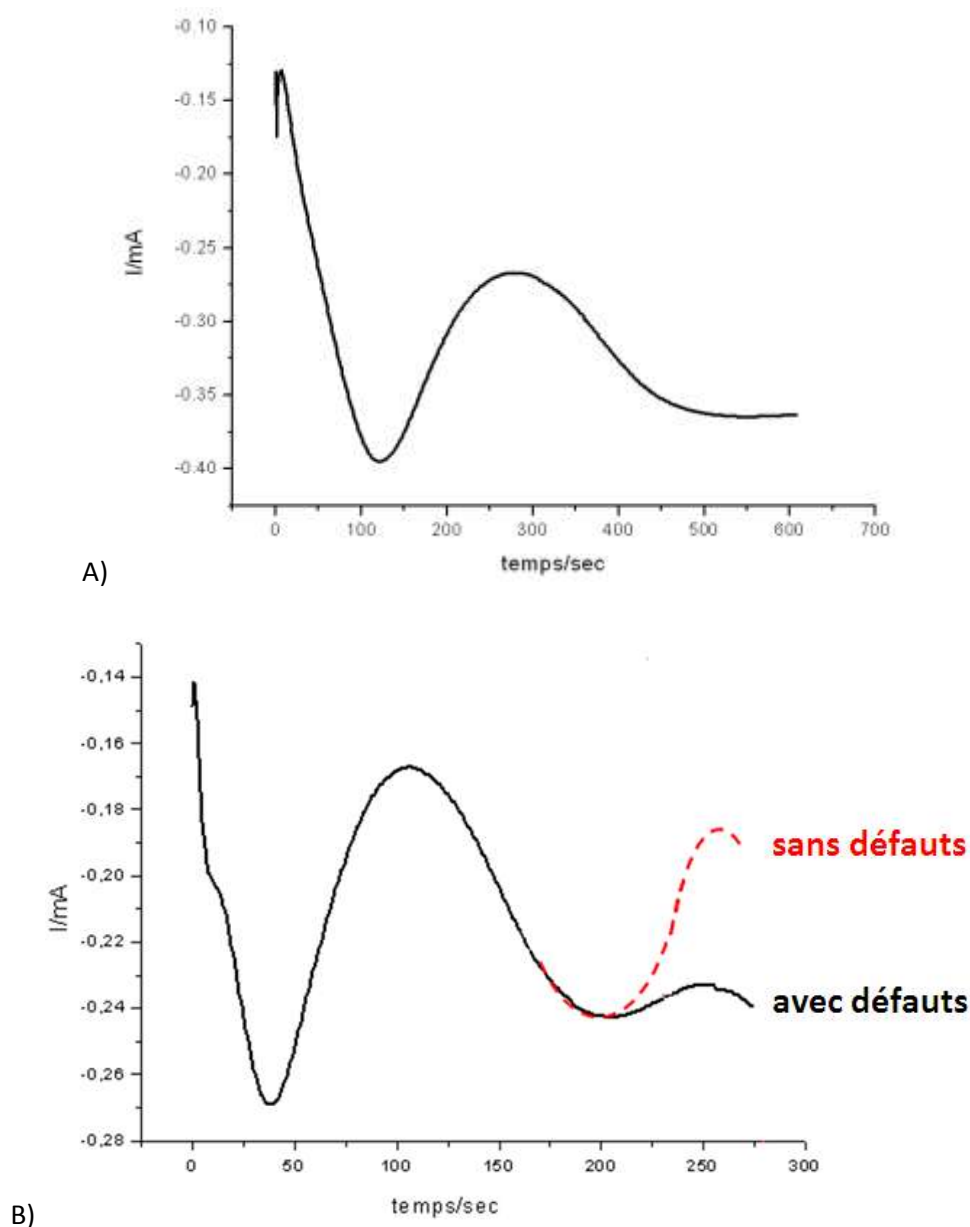


Figure 52 Exemples de chronoampérogrammes lors de l'électrodépôt d'or pour une surface A) de $0,8 \text{ cm}^2$, B) de $0,4 \text{ mm}^2$ ($E(V) = -0,66 \text{ V}$)

Les méthodes d'auto-assemblage de billes générées par l'évaporation du solvant de la suspension ne permettent pas d'accéder à des cristaux colloïdaux de qualité suffisante pour produire des électrodes macroporeuses de grande surface. Les variations de l'épaisseur des cristaux sont le défaut majeur empêchant la réalisation de surfaces poreuses dépassant le millimètre carré. A l'échelle microscopique, les différents défauts structuraux tels que les fissures du cristal se retrouvent également moulés dans l'électrodépôt d'or dégradant de cette manière l'interconnectivité des pores de la structure métallique macroporeuse. D'autres méthodes, nécessitant des dispositifs plus sophistiqués doivent être investiguées.

4.2 Cristaux colloïdaux formés par dépôt électrophorétique

Le dépôt électrophorétique a été étudié car il permet d'effectuer un dépôt de billes sur de grand substrat en un temps relativement court. Le but de ces expériences est d'évaluer si le dépôt est homogène et si l'organisation des billes à la surface du substrat peut être contrôlée.

4.2.1 Procédure expérimentale

Des billes de PS de 320 ou 500 nm de diamètre ont été mises en suspension avec une concentration de 0.1 %_{solide} dans des solutions constituées d'éthanol à 85 % et d'eau à 5 % et dont le pH est ajusté à 10, ceci permettant de limiter les phénomènes de sédimentation. L'ajustement du pH à cette valeur permet également aux particules de porter une charge surfacique négative et d'être de cette façon d'autant plus attirées par la borne positive. L'emploi de l'éthanol permet au phénomène d'hydrolyse de l'eau d'être diminué et de limiter ainsi la formation de gaz aux électrodes, ce qui déstabiliserait le dépôt de particules.

Le dispositif d'électrophorèse est constitué d'un générateur de courant dont la borne négative est reliée à la contre électrode et la borne positive à l'électrode à recouvrir. Ces deux électrodes sont placées parallèlement l'une à l'autre à une distance de 1 cm. Si la différence de potentiel entre ces deux électrodes est de 20 V, il se crée un champ de 20 V.cm⁻¹ dans la cellule. Des champs électriques de 5 et 10 V.cm⁻¹ ont également été testés dans cette étude.

Seulement une dizaine de secondes sont nécessaires à l'obtention d'une épaisseur de dépôt raisonnable (<500 μm). Pour maintenir les billes à la surface du substrat, même en l'absence du champ, il est nécessaire de retirer celui-ci de la suspension avant de couper le courant du générateur. Ceci permet en quelque sorte de fixer les billes à la surface de l'électrode. Le substrat doit ensuite sécher pendant 24 heures avant de pouvoir être immergé dans le bain d'électrodépôt.

4.2.2 Résultats

L'observation à l'échelle microscopique des assemblages de billes de PS effectués par dépôt électrophorétique montre une organisation aléatoire des billes (Fig. 53 C). L'épaisseur du dépôt varie également sur la surface du substrat à recouvrir. En effet, on peut observer sur la photographie de la Figure 53 A) les lignes du champ électrique suivant lesquelles les billes se sont accumulées. Le cliché MEB de la Figure 53 B) montre la coupe transverse d'un dépôt de ce type et met en évidence l'amplitude des variations d'épaisseur due à ce phénomène. Des fissures sont également présentes au sein de ces assemblages de billes. Elles sont de même type que pour les cristaux générés sous évaporation, occasionnées par le séchage des dernières traces du solvant recouvrant les billes et piégées au moment du retrait dans l'assemblage de celles-ci.

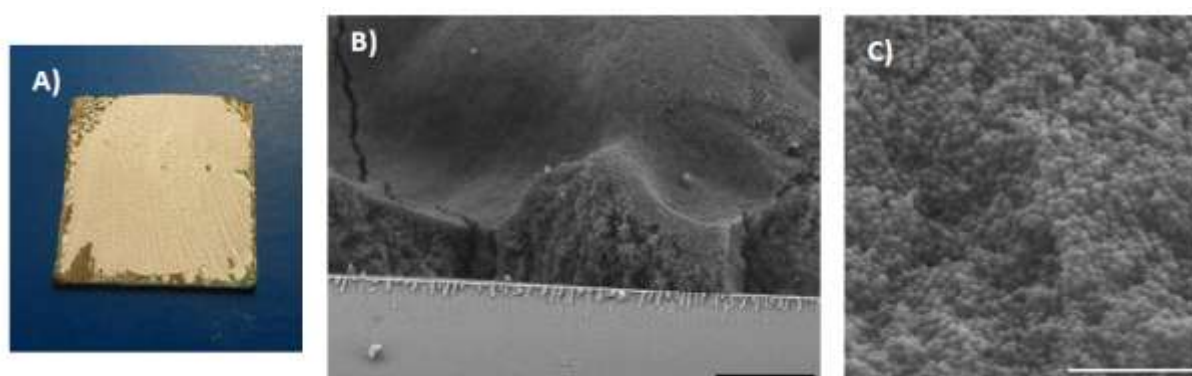


Figure 53 A) Photographie d'un échantillon recouvert d'un dépôt électrophorétique de billes : les inhomogénéités du dépôt révèlent les lignes du champ électrique appliqué lors du procédé. Observation MEB d'un dépôt électrophorétique : B) de billes de PS de 500 nm, (échelle: 5 μm) C) de billes de PS de 280 nm (échelle: 50 μm). $E(V)=20 \text{ V.cm}^{-1}$ appliqué pendant 40 secondes

L'arrangement désorganisé des billes ne permet pas aux chronoampérogrammes obtenus lors de l'électrodépôt d'afficher des oscillations. De plus, à cause du caractère isolant de la couche de billes, l'amplitude du courant enregistré est très faible. Il est donc difficile dans ces conditions de déterminer la hauteur du dépôt dans le template de billes.

L'or électrodéposé dans ces structures désordonnées montre donc de façon prévisible un arrangement aléatoire de pores qui ne sont pas systématiquement interconnectés. De plus on constate que l'or ne croît pas de façon homogène dans cet arrangement de billes (Fig. 54).

En jouant sur les paramètres tels que l'intensité du champ électrique, le temps de dépôt, le changement d'orientation du substrat par rapport aux lignes de champs lors de la procédure (par exemple à mi-parcours de la procédure le substrat est tourné à 90° de sa position initiale), on tente d'améliorer l'aspect du dépôt. Par ailleurs l'application du potentiel aux électrodes a aussi été effectuée sous forme de créneaux. Les intervalles de temps entre chaque palier de potentiel peuvent servir de temps de relaxation permettant d'homogénéiser le dépôt et réduire les variations d'épaisseur dues aux lignes de champ. Toutefois aucune amélioration notable concernant

l'homogénéisation de l'épaisseur et l'organisation du dépôt n'est constatée dans les assemblages de billes obtenus lors des tentatives d'optimisation du procédé.

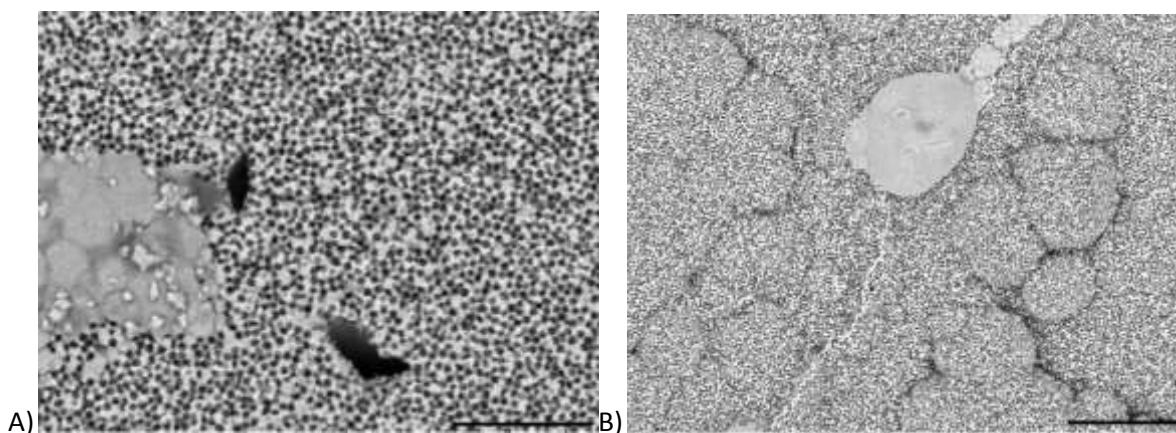


Figure 54 Observations MEB d'une couche d'or macroporeux obtenue par électrodépôt dans un dépôt électrophorétique de billes de PS de 320 nm. (échelle : A) 5 μm B) 10 μm)

4.2.3 Réparation de fissures par dépôt électrophorétique

Comme les craquelures dans les cristaux colloïdaux semblent inévitables, on peut envisager une éventuelle réparation de celles-ci. Un cristal colloïdal, appelé cristal primaire, obtenu par évaporation verticale combinée à du « dip-drawing » est soumis à une dépôt électrophorétique de billes. On suppose que le champ électrique ressenti par les billes destinées à être électrodéposées est plus fort au niveau des défauts car il est dans ces zones moins « écranté » par le dépôt du cristal primaire. Par conséquent, on émet l'hypothèse suivante : le dépôt électrophorétique de billes, dit cristal secondaire, se produira préférentiellement dans les imperfections du cristal primaire, comblant ainsi les fissures, et les zones où l'épaisseur est plus fine.

On sélectionne un substrat recouvert d'un cristal colloïdal obtenu à partir d'une suspension de billes de PS de 500 nm de diamètre. Les billes destinées à combler les défauts de ce substrat initial sont de taille inférieure, 320 nm, dans le but de leur permettre un accès plus aisé au fond de fissures. Cela permet aussi de différencier les deux types de dépôt et de pouvoir distinguer de façon claire si le dépôt électrophorétique comble efficacement les brèches du cristal défectueux. Le champ électrique est de 10 V.cm^{-1} et est appliqué pendant 5 secondes.

Le cliché MEB de la Figure 55 montre une fissure formée dans un cristal primaire. On observe que les billes électrophorétiquement déposées recouvrent les parois de cette brèche, validant de cette façon que les billes de la suspension soumises au champ électrique ont été attirées au niveau du défaut.

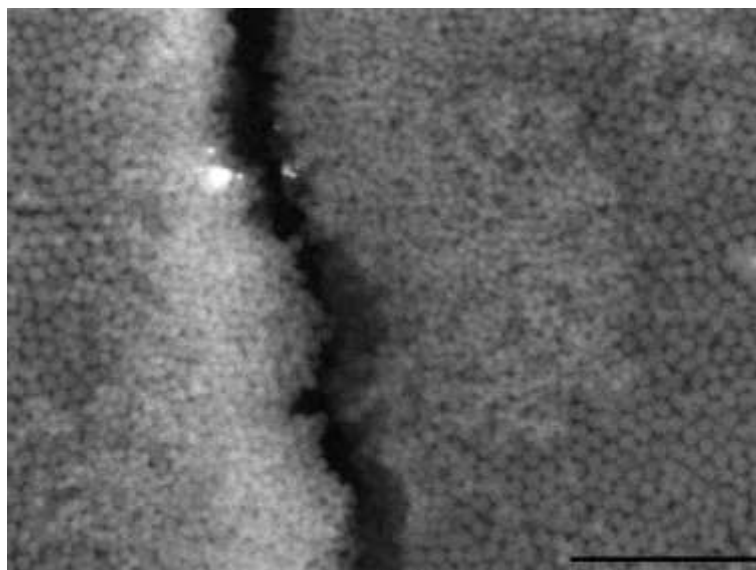


Figure 55 Cliché MEB de dépôt électrophorétique de billes de PS de 280nm, dans un cristal primaire de bille de PS de 500 nm, $E(V)=10 \text{ V.cm}^{-1}$ pendant 5 secondes (échelle: 5µm)

Suite à l'électrodépôt d'or dans les échantillons « traités » par le dépôt électrophorétique, on évalue l'efficacité du colmatage des craquelures grâce à l'observation des clichés MEB de ces substrats (Fig. 56). Le temps d'électrodépôt du métal est relativement court (environ 250 secondes) car il s'agit d'observer l'aspect du dépôt en bas du cristal primaire et constater de cette façon si le cristal secondaire a atteint le fond de ses craquelures. On remarque alors qu'au niveau des fissures, c'est-à-dire entre deux zones poreuses générées par le cristal primaire, que l'on reconnaît facilement à l'organisation ordonnée en structure compacte de pores de plus grande taille, se trouve le dépôt de cristal secondaire, reconnaissable à la taille inférieure des pores et à leur organisation désordonnée.

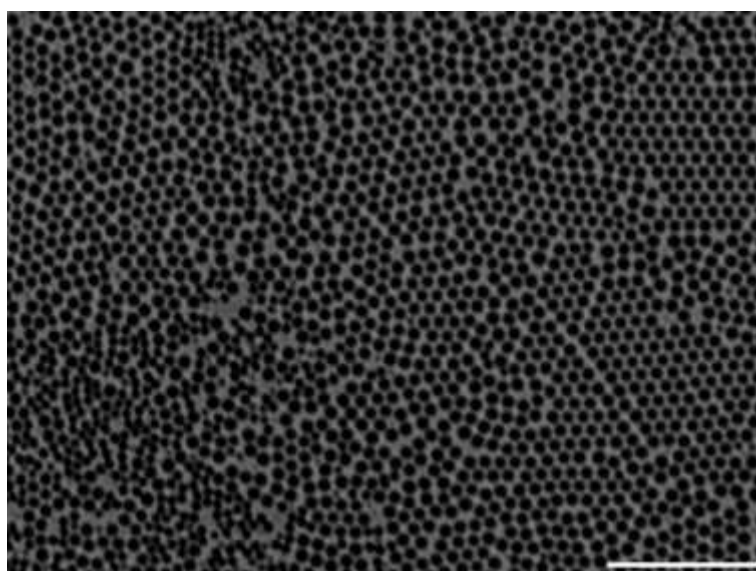


Figure 56 Observation MEB d'une couche d'or macroporeux obtenue à partir d'un cristal primaire (taille des billes 500 nm) corrigé par un cristal secondaire (taille des billes 280 nm) élaboré par déposition électrophorétique. (échelle : 5µm)

Le dépôt électrophorétique de billes conduit à la création de couches désordonnées des particules colloïdales qui, lorsqu'elles servent de template à la création d'or poreux, ne permettent pas de suivre par ampérométrie la croissance de l'or. Malgré les différentes tentatives poursuivies dans le but d'optimiser l'arrangement des particules colloïdales déposées, la réalisation d'opales inverses semble impossible par cette méthode. Toutefois le dépôt électrophorétique de billes peut être utilisé pour « réparer » un cristal colloïdal primaire, en comblant ses défauts tels que les craquelures qui sillonnent sa structure. Les électrodes macroporeuses conçues suivant ce procédé ne présentent pas une porosité optimale dans le sens où la totalité de leurs pores ne sont pas interconnectés entre eux, notamment au niveau des pores générés par les cristaux secondaires. En revanche elles constituent une alternative de meilleure qualité aux électrodes conçues à partir des techniques d'évaporation uniquement, dans le sens où leur structure poreuse n'est pas interrompue par des nervures d'or compact.

4.3 Cristaux colloïdaux élaborés par la technique de Langmuir-Blodgett

Afin d'obtenir un cristal colloïdal avec le minimum de défauts structuraux et d'une épaisseur contrôlée, il est possible d'avoir recours à la technique de Langmuir-Blodgett. Comme expliqué dans la partie 3.2.7, ce procédé permet de pré-organiser les particules colloïdales sous forme d'un film dit de Langmuir à l'interface air-eau. Cet assemblage bidimensionnel de particules est ensuite transféré à la surface d'un substrat à chaque fois que celui-ci est plongé au travers du film puis retiré. Ainsi le nombre de couches constituant l'opale artificielle est déterminé par le nombre d'immersions et de retraits qu'a effectué le substrat au travers du film. L'inconvénient que présente cette technique par rapport à celles précédemment expérimentées est qu'elle requiert un dispositif spécifique, volumineux et onéreux.

4.3.1 Description du dispositif

L'appareillage utilisé dans ce travail est une cuve de Langmuir fournie par la société NIMA TECHNOLOGY®. Les différents éléments que la cuve comprend sont présentés dans la figure ci-dessous. La cuve est un bassin de deux litres environ recouverte d'une feuille de Teflon. Deux barrières mobiles, également recouvertes de Teflon, permettent de compresser les éléments épandus à la surface de l'eau de la cuve et par conséquent de faire varier la pression de surface, mesurée par la balance de Wilhelmy, jusqu'à atteindre une consigne de pression pouvant être fixée à $0,1 \text{ mN.m}^{-1}$ près. L'échantillon est maintenu par un bras articulé effectuant les plongées et les retraits verticaux du substrat au travers du film. Les vitesses de déplacement des barrières, ainsi que du bras mécanique sont contrôlées via un logiciel.

Sur la photographie de la Figure 57, on remarque les barrières responsables de la compression (1), les balances de Wilhelmy (2) mesurant la pression de surface, ainsi que le bras mécanique (3) manipulant le substrat (4).

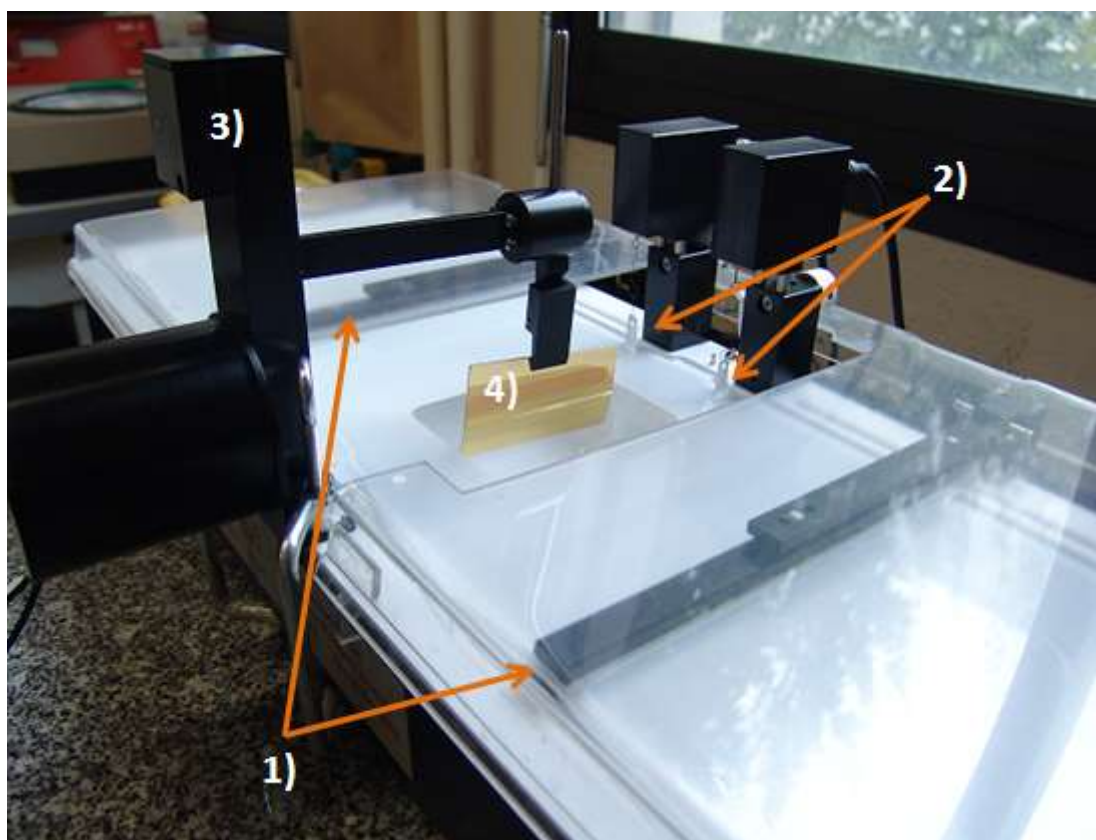


Figure 57 Cuve de Langmuir utilisée pour la fabrication de cristaux colloïdaux

Le logiciel NIMA TECHNOLOGY® permet de définir et de contrôler la vitesse de compression des barrières et la pression finale de surface que doit présenter le film de particules. Il permet également de suivre l'évolution de la pression surfacique du film en fonction de la surface du film en traçant la courbe de compression, $\Pi=f(A)$.

4.3.2 Procédure expérimentale

La procédure de traitements préliminaires de la suspension colloïdale permettant un épandage efficace est présentée dans les annexes 1.

- **Épandage et compression**

L'épandage de cette suspension est ensuite réalisé avec précaution à la surface de l'eau distillée remplissant la cuve de Langmuir. Il s'agit lors de cette étape de ne pas dépasser une pression de surface de plus de 1 mN.m^{-1} .

Afin de permettre à la totalité du chloroforme de s'évaporer, l'épandage est laissé au repos pendant une vingtaine de minutes environ. La pression de surface doit alors indiquer à nouveau une pression nulle, comme avant l'étape d'épandage des particules. Ceci indique qu'à ce stade les billes de silice forment une phase gazeuse bidimensionnelle (voir chapitre 3.2.7). L'isotherme de compression est tracée point par point en faisant varier la consigne de pression de 0.1 mN.m^{-1} en 0.1 mN.m^{-1} . Lors de l'atteinte d'une aire critique, on observe que la pression de surface augmente très rapidement, ceci indique que le film de Langmuir est formé et que toutes les particules sont en contact les unes avec les autres. Par ailleurs, il est possible de calculer l'aire totale du film de Langmuir formé à l'interface air-eau si on connaît le diamètre des particules de la suspension ainsi que leur concentration dans le volume prélevé, ceci est détaillé dans la partie 2 des annexes.

Dans la figure ci-dessous est représentée une courbe de compression obtenue à partir d'une suspension colloïdale de billes de 600 nm épandue à la surface de la cuve de Langmuir. De droite à gauche, et comme attendu, on remarque que plus l'aire de l'épandage diminue, donc plus les barrières compriment le film, plus la tension surfacique augmente. Une fois que la pression atteint la valeur de contrôle, dans ce cas 7 mN.m^{-1} , le substrat peut être passé au travers du film et retiré pour que le transfert de billes s'effectue. A chaque fois que le substrat traverse le film, les déstabilisations que ceci occasionne génèrent des petites variations de tension surfacique, facilement repérables sur le graphe par les brèves oscillations des valeurs en ordonnées. Plus le film est instable, plus les oscillations seront marquées. Dans le cas de la courbe ci-dessous, on peut relever que sept couches de billes ont été transférées sur le substrat.

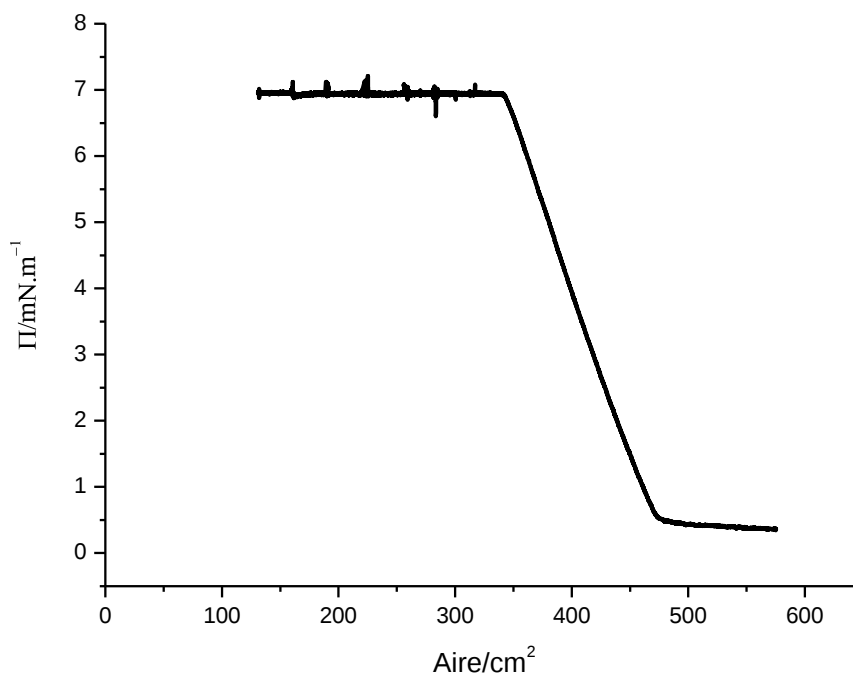


Figure 58 Courbe de compression pour un film de Langmuir de billes de silice de 600 nm. Le transfert s'effectue à 7 mN.m^{-1} .

- **Manipulation du substrat**

Comme il a été précédemment démontré que le transfert de film de Langmuir constitué de silice colloïdale se produisait préférentiellement sur des substrats hydrophiles [12]. Les substrats de verre recouverts d'une fine couche d'or sont traités à la cystéamine suivant le même procédé que celui énoncé dans la partie 4.1. Il semblerait que le mouillage du substrat par la sous-phase soit un critère nécessaire au dépôt de particules. On suppose que dans la zone du ménisque formé entre la sous-phase et le substrat se produisent des phénomènes conjugués de capillarité et d'évaporation rassemblant les conditions favorables au dépôt de particules.

Les différents paramètres du transfert du substrat influencent également la qualité du dépôt. En effet suivant les vitesses d'immersion et d'émersion, la qualité du cristal formé varie. Grâce au dispositif mis en place, les vitesses de descente et de remontée du substrat peuvent être choisies indépendamment. La vitesse d'immersion du substrat devant être suffisamment élevée pour ne pas entraîner un relargage à l'interface des billes précédemment déposées, elle est fixée à 10 cm.min^{-1} . En revanche la vitesse de retrait doit être lente de façon à permettre au transfert de s'effectuer. Pour ce faire, une vitesse de 0.1 cm.min^{-1} semble être optimale.

4.3.3 Résultats

Dans un premier temps, les substrats d'or recouverts d'une seule couche de billes transférée à partir du film de Langmuir, montrent à l'œil nu une homogénéité appréciable du dépôt ainsi que des irisations, caractéristiques d'un réseau de particules parfaitement ordonnées. La photographie ci-dessous capture les différentes teintes de la lumière diffractée par ce cristal colloïdal.

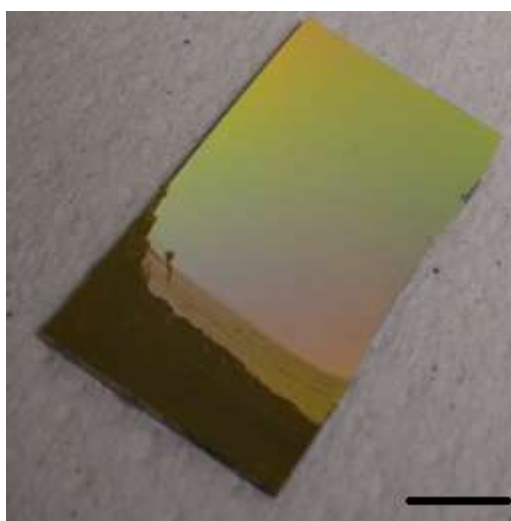


Figure 59 Photographie d'un cristal colloïdal obtenu par la technique de LB à partir de billes de silice de 1200 nm. Les couleurs irisées sont obtenues par diffraction de la lumière par le réseau ordonné des billes (échelle : 0,5 cm).

Afin de valider l'assemblage de billes hautement organisées obtenu par la technique de LB, l'arrangement des particules est observé au MEB (Fig. 60). En effet, on constate que la majorité des zones du cristal vue de dessus sont organisées en structure compacte et peu de zones présentent un arrangement aléatoire. Toutefois, il existe des défauts de joint de grain entre les zones cristallines ainsi que des lacunes.

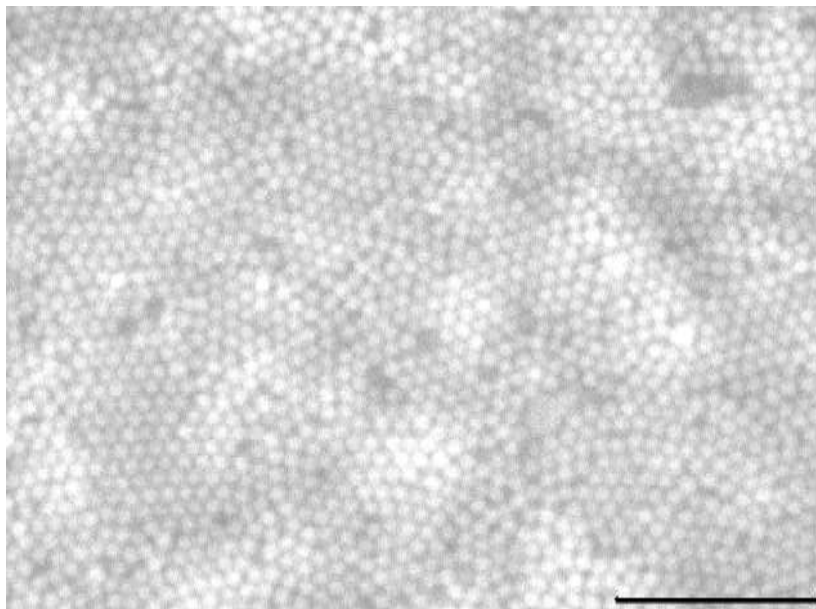


Figure 60 Observation MEB d'un cristal colloïdal obtenu par LB à partir de billes de silice de 440 nm (échelle : 5µm)

Le dépôt d'un nombre N de couches peut être obtenu par la répétition de N transferts d'une couche provenant du film de Langmuir. Même s'il est possible d'aller plus loin, nous n'avons pas, au cours de cette étude, excédé un nombre de 10 couches. Nous n'avons d'ailleurs pas testé d'électrode dont l'épaisseur excède 9 demi-couches car cette valeur a été jugée suffisante pour démontrer le concept d'augmentation du signal avec l'épaisseur de l'électrode. Au-delà le temps de réalisation des substrats devient trop conséquent. Comme illustré dans la Figure 61, la vue transverse des films de LB assemblés à la surface de substrats de verre recouvert d'or révèle un arrangement régulier des billes pour toutes les couches transférées. Sur ce cliché, les défauts que l'on peut remarquer sont produits lors de la coupe du substrat.

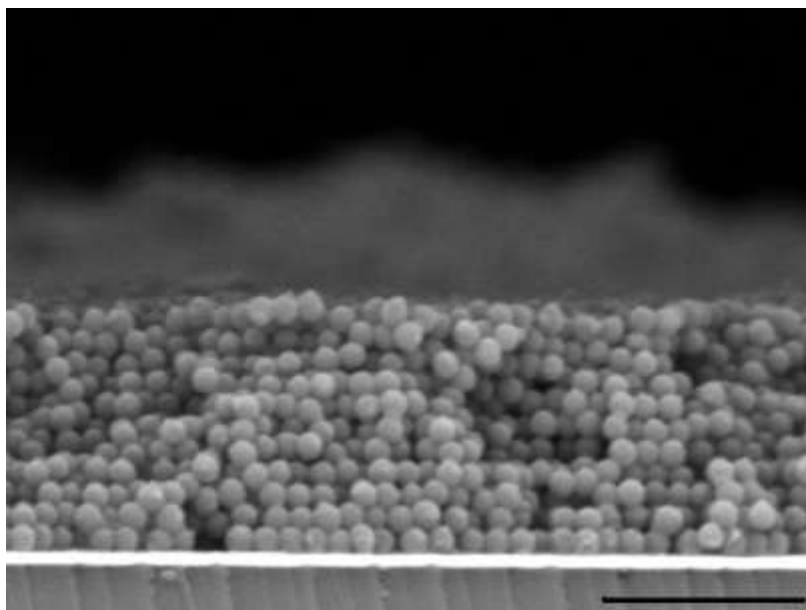


Figure 61 Cliché MEB d'une coupe transverse d'un cristal colloïdal obtenu par LB constitué de 11 couches de billes de silice de 600 nm de diamètre (échelle : 5μm)

L'électrodépôt d'or dans les réseaux de billes formés par la technique de LB permet de suivre l'évolution de la hauteur du dépôt grâce aux oscillations du courant de réduction. L'origine de celles-ci, résidant dans l'arrangement extrêmement ordonné des billes du template, a été exposée dans la partie 3.3.1.5 de ce rapport. Dans ces conditions, il devient alors aisé de contrôler l'épaisseur du dépôt métallique ainsi que l'arrêt de celui-ci à mi-hauteur d'une couche de billes afin que la structure poreuse soit ouverte. Pour assurer ce dernier point, il est nécessaire d'arrêter l'électrodépôt lorsque le courant atteint un minimum. La figure présentée ci-dessous présente les courants faradiques enregistrés au cours de dépôts d'or obtenus par la réduction des ions de sulfite d'or AuSO_3^{2-} dans des cristaux colloïdaux créés par la méthode LB. Ces courbes montrent que des structures de 3, 5, 7 et 9 demi-couches de pores ont été réalisées avec une grande précision.

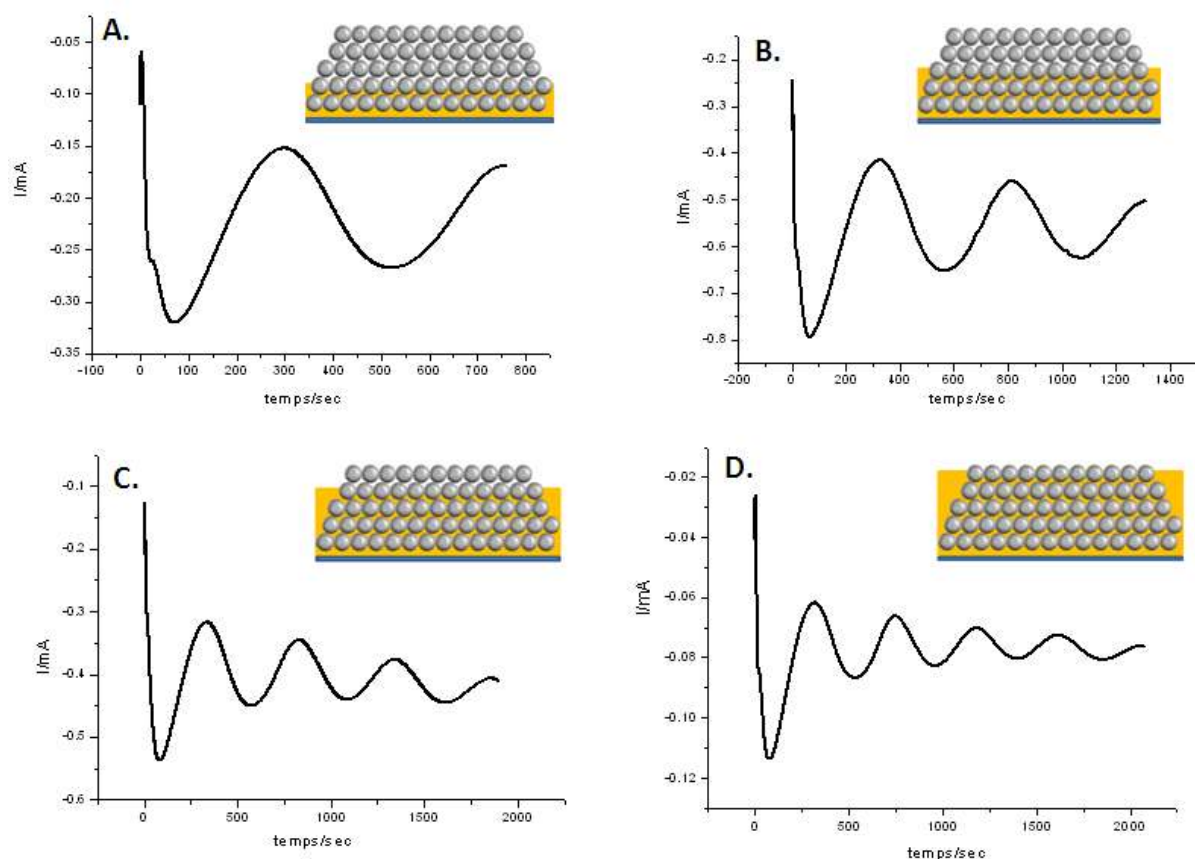


Figure 62 Evolution du courant lors de l'électrodépôt de l'or dans des templates obtenus par LB. On observe autant de demi-périodes d'oscillation que l'on forme de demi-couches d'or poreux dans les espaces vides définis par le cristal. Le graphe A est obtenu pour l'électrodépôt de 3/2 couches, B pour 5, C pour 7 et D pour 9.

L'arrangement hautement ordonné des billes du cristal se retrouve dans la structure inverse de l'électrode poreuse, obtenue après dissolution des particules de silice dans le HF. En effet, les pores des substrats ainsi développés montrent une réelle organisation en zone pseudo-hexagonale parsemée de seulement quelques lacunes, qui constituent des défauts mineurs. Le cliché de la Figure 63 A) montre l'organisation d'une demi-couche de pores élaborée à partir de billes constituant le template de 440 nm de diamètre. Le cliché B) présente la surface d'un dépôt d'or de 5 demi-couches. La présence de points noirs remarquables dans les pores de cette structure témoigne de la présence des interconnexions qui permettent aux différentes couches de pores d'être en contact les unes avec les autres.

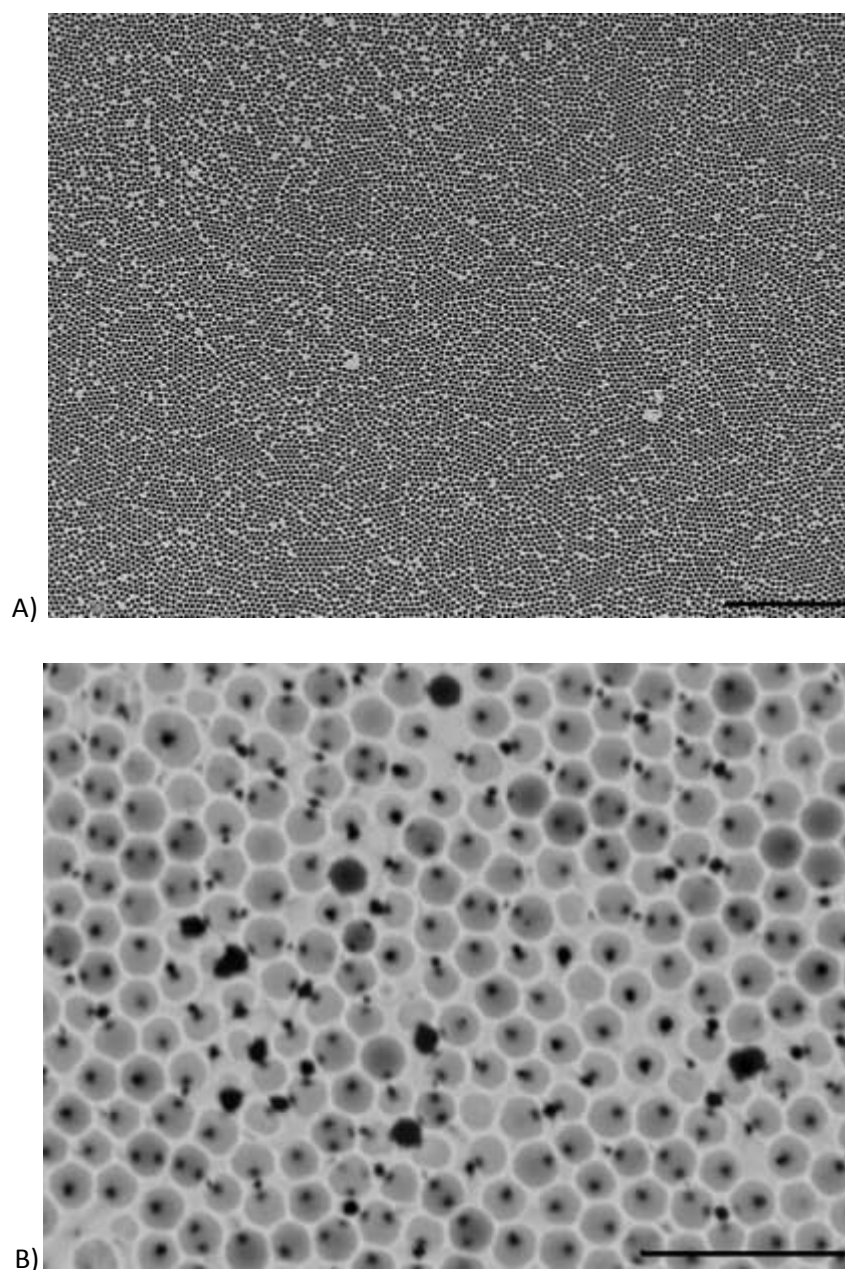


Figure 63 (A) Observation MEB d'une demi-couche d'or poreux générée à partir d'un cristal colloïdal de billes de silice de 1200 nm (échelle : 25 μm), (B) de deux demi-couches de pores de 1200 nm obtenues par LB (échelles : 5 μm)

L'avantage incontournable de l'utilisation de templates de billes fabriqués à partir de film de Langmuir, est l'absence totale de fissures dans l'assemblage final de particules colloïdales. Les surfaces poreuses exposées dans la figure ci-dessus permettent d'illustrer l'obtention d'électrodes exemptes de ce type de défauts.

Les coupes transverses des couches minces d'or macroporeux obtenues par cette méthode permettent d'appréhender la qualité et la régularité de cette structure suivant son épaisseur (Fig. 64). Cela permet de valider non seulement les interconnexions verticales entre les pores mais aussi celles qui existent au niveau latéral.

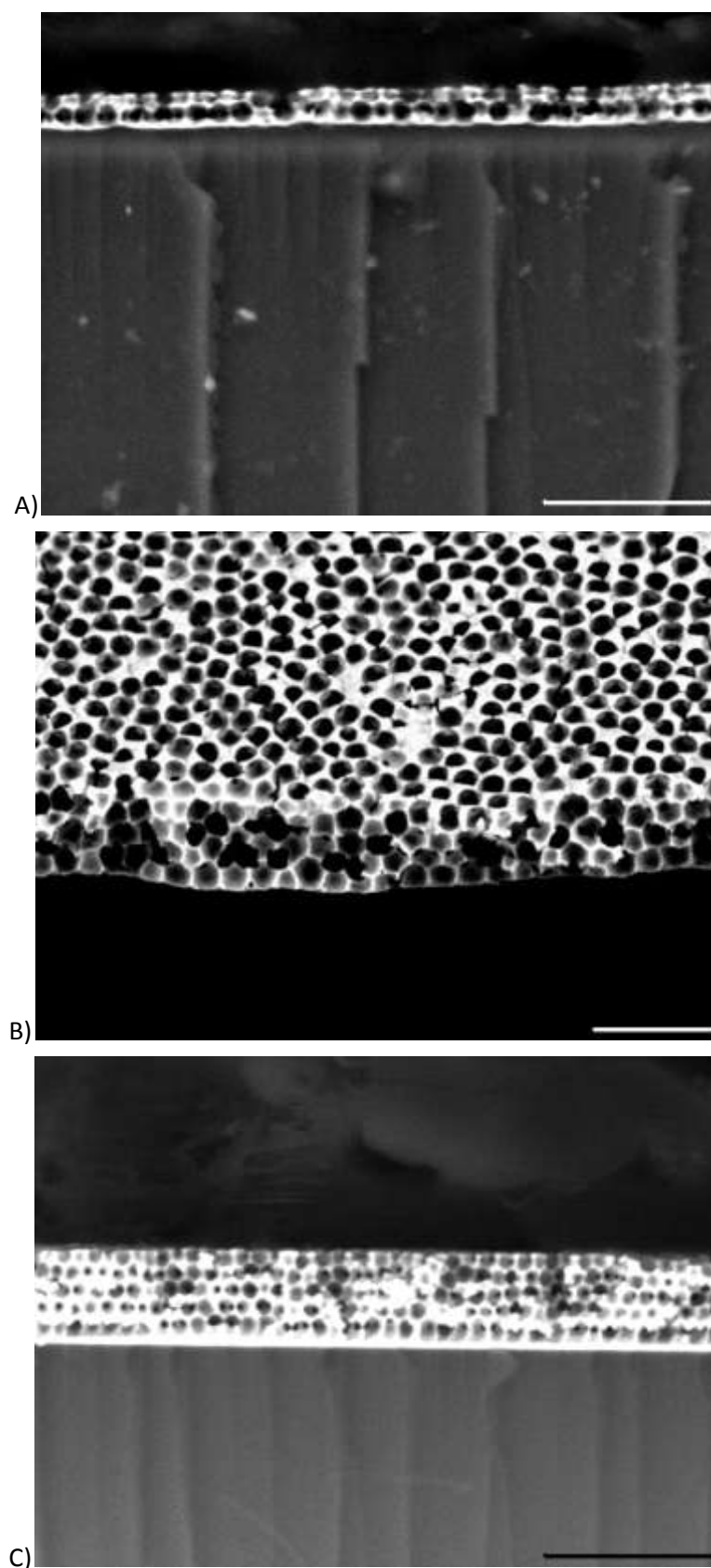


Figure 64 : Coupes transverses des électrodes macroporeuses dont le diamètre des pores est de 1200 nm : A) 3/2 couches, B) 7 et C) 9 (échelles : A) et B) 5 μ m, C) 15 μ m)

Nous venons de montrer que la méthode de LB permet de créer de façon contrôlée des électrodes macroporeuses présentant des structures ordonnées. Les premiers essais ont été effectués sur une surface proche du cm^2 . Une fois que la qualité des électrodes a été validée à cette échelle, des électrodes présentant la taille requise pour être utilisées dans le réacteur pilote ont été développées. Les photographies de la Figure 65 montrent que des cristaux colloïdaux d'une taille d'environ 40 cm^2 ont pu être obtenus grâce au dispositif de Langmuir Blodgett. A partir de ceux-ci, la fabrication des électrodes macroporeuses de grande surface est facilement réalisable (Fig. 66).

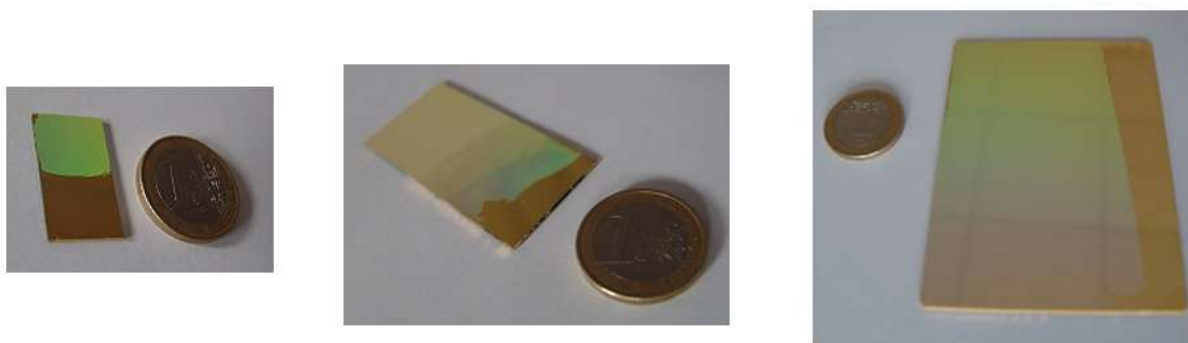


Figure 65 Photographies de cristaux colloïdaux transférés sur des substrats de tailles différentes. De gauche à droite : substrat de 3 cm^2 environ, de $12,5 \text{ cm}^2$ et de 48 cm^2 .



Figure 66 Photographies d'une électrode poreuse de 36 cm^2 faite à partir d'un cristal colloïdal assemblé par LB.

4.3.4 Conclusion

Pour conclure, il existe différentes techniques permettant la réalisation de cristaux colloïdaux. La plupart ont démontré leur efficacité pour des surfaces de l'ordre de la dizaine voire de la centaine de μm^2 , ce qui restreint leur utilisation pour les applications nécessitant une conception à l'échelle du cm^2 . Dans le cadre de l'étude présentée dans ce rapport, il s'agit de développer une électrode poreuse utilisable dans le dispositif final d'application : un prototype du réacteur électrochimique conçu à l'échelle pilote. Il apparaît donc nécessaire de pouvoir élaborer le cristal colloïdal, template sacrificiel nécessaire à la conception de l'électrode macroporeuse, à l'échelle du pilote, et d'en contrôler les caractéristiques en termes d'aspect, d'épaisseur et de qualité. La technique de Langmuir Blodgett, bien que nécessitant un dispositif très spécifique, nous a permis d'obtenir de tels résultats. Par conséquent, toutes les électrodes utilisées lors des expériences de bio-catalyse électrochimique dont il est question dans les chapitres suivants ont été réalisées avec cette méthode.

Références Bibliographiques

- (1) Vlasov, Y. A.; Astratov, V. N.; Baryshev, A. V.; Kaplyanskii, A. A.; Karimov, O. Z.; Limonov, M. F. *Physical Review E* **2000**, *61*, 5784.
- (2) Vlasov, Y. A.; Bo, X.-Z.; Sturm, J. C.; Norris, D. J. *Nature* **2001**, *414*, 289.
- (3) Piret, F.; Su, B. L. *Chemical Physics Letters* **2008**, *457*, 376.
- (4) Li, H.-L.; Marlow, F. *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 1803-1810.
- (5) Jiang, P.; Bertone, J. F.; Hwang, K. S.; Colvin, V. L. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 2132-2140.
- (6) Wong, S.; Kitaev, V.; Ozin, G. A. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 15589-15598.
- (7) Yoldi, M.; Arcos, C.; Paulke, B.-R.; Sirera, R.; González-Viñas, W.; Görnitz, E. *Materials Science and Engineering: C* **2008**, *28*, 1038.
- (8) Pérez, N.; Hüls, A.; Puente, D.; González-Viñas, W.; Castaño, E.; Olaizola, S. M. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *126*, 86.
- (9) Ni, H.; Du, Y.; Ma, G.; Nagai, M.; Omi, S. *Macromolecules* **2001**, *34*, 6577.
- (10) Grieseböck, B.; Egen, M.; Zentel, R. *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 4023.
- (11) Miguez, H.; Tetreault, N.; Hatton, B.; Yang, S. M.; Perovic, D.; Ozin, G. A. *Chemical Communications* **2002**, 2736.
- (12) Reculosa, S., thèse Université Bordeaux I 2004.

Chapitre 5

Immobilisation de biomolécules à la surface d'électrodes macroporeuses : études préliminaires

5 Immobilisation de biomolécules à la surface d'électrodes macroporeuses : études préliminaires

5.1 Caractérisation des électrodes macroporeuses

Afin d'utiliser au mieux les électrodes macroporeuses et de les employer le plus efficacement possible dans les applications pour lesquelles elles sont destinées, il est nécessaire de parfaitement évaluer leur propriété. Ainsi qu'il a été précédemment souligné dans ce rapport, l'intérêt de travailler avec des électrodes macroporeuses réside dans la mise à disposition d'une aire de surface active maximisée par rapport à une surface géométrique donnée. Il est donc important de pouvoir quantifier de façon précise l'aire de cette surface active afin de pouvoir évaluer la contribution électrocatalytique spécifique à chaque électrode. La caractérisation électrochimique par voltammétrie cyclique dans l'acide sulfurique se trouve être une méthode simple et efficace permettant la détermination de ce paramètre de façon rigoureuse.

Les électrodes d'or poreux sont placées dans de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 0,5 M. Pour effectuer la voltammétrie cyclique, elles sont reliées, de même que l'électrode de référence (Ag/AgCl) (RE) et la contre-électrode (CE) à un potentiostat. Les balayages de potentiels sont conduits de 0 à 1,5 V vs Ag/AgCl avec une vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} . Plusieurs voltammogrammes cycliques (ou cyclovoltammogramme (CV)) sont présentés dans la Figure 67. Leur allure commune montre que dans un premier temps, lorsque l'on augmente « linéairement » le potentiel, on observe un faible courant, qui peut être expliqué par l'étape de chargement de la double couche électrolytique. A partir d'un potentiel proche de 1 V, l'or commence à s'oxyder et forme à sa surface une couche d'oxyde d'or, ce qui se repère sur la figure par une augmentation prononcée du courant. Passé un potentiel supérieur à 1.4 V, toute la surface d'or étant recouverte par la couche d'oxyde, le processus d'oxydation est inhibé, d'où la diminution du courant jusqu'au potentiel de retour, de 1.5 V. A partir de celui-ci, le potentiel est balayé en sens inverse, permettant alors à l'or sous forme d'oxyde de se réduire. Le phénomène de réduction se traduit par la présence d'un pic d'intensité négative à 0.9 V. L'intégration de ce pic est directement proportionnelle à la charge mise en jeu pour réduire la totalité de la surface oxydée, donc, en d'autres termes, cette intégration est proportionnelle à la surface électroactive fournie par l'électrode [1]. D'après Woods *et al*, la densité de charge théorique pour la réduction complète d'une telle couche d'oxyde s'élève à $386 \mu\text{C/cm}^2$ [2]. Ainsi la connaissance de la densité de charge mise en jeu au cours de la réduction donne accès à l'évaluation précise de l'aire de la surface active de l'électrode. D'après ces considérations, il apparaît donc possible de tracer la relation linéaire liant à la fois le nombre de couches de pores à l'aire de la surface active, mais aussi à la densité de charge mise en jeu lors de la réduction [3].

C'est donc à l'aide de cette méthode que l'on caractérise l'aire de la surface active des différentes électrodes macroporeuses fabriquées et utilisées dans cette étude. Sur la figure ci-dessous, on constate que plus l'électrode présente de demi-couches de pores, plus l'intensité du pic de réduction est importante et donc, par conséquent, plus l'aire de la surface active qu'elle met à disposition est conséquente.

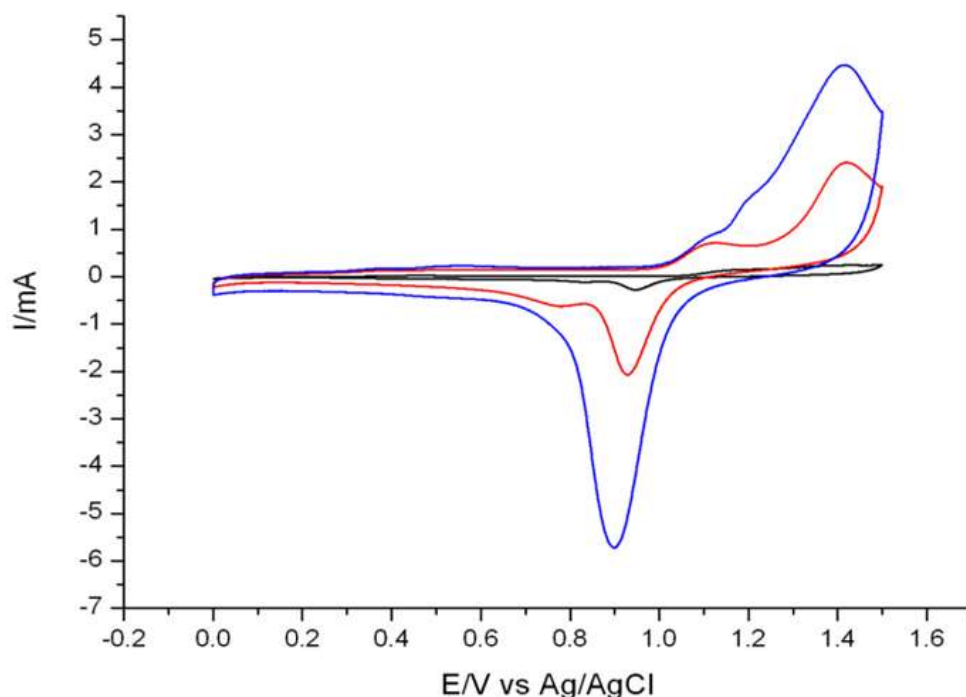


FIGURE 67 VOLTAMMOGRAMMES CYCLIQUES D'ÉLECTRODES D'OR POREUSES DANS 0,5 M H_2SO_4 . TAILLE DES PORES : 440 NM. EN NOIR : ÉLECTRODE PLANE, EN ROUGE : ÉLECTRODE DE 3/2 COUCHES, EN BLEU : ÉLECTRODE DE 9/2 COUCHES. $v=100 \text{ MV.S}^{-1}$

D'après la Figure 67, si on compare l'augmentation de l'aire de la surface active entre une électrode plane et une électrode de 9/2 couches, c'est-à-dire 4 couches et demie, on constate qu'elle est d'un facteur d'environ 16,9. Grâce à des considérations géométriques, il est possible d'exprimer ce facteur f d'augmentation de surface suivant la formule suivante, en fonction du nombre de couche de pores noté n [3] :

$$f = \frac{A_{\text{macroporeuse}}}{A_{\text{plane}}}$$

Le facteur f ne dépend que du nombre de couches, pas de la taille des pores. D'après les calculs pour une électrode de 9/2 couches, on trouve une valeur de f de 16,31, proche de ce qui a été mesuré expérimentalement.

Par ailleurs, il est important de noter que si on considère des électrodes macroporeuses présentant différentes tailles de pore, pour des épaisseurs égales, la taille des pores influencera l'aire de la surface active. En effet plus les pores sont petits et plus la surface active obtenue sera grande [3].

Une expérience simple permettant de mettre en valeur l'augmentation du courant résultant de l'accroissement de la surface active de l'électrode, est la réduction de l'eau oxygénée sur des électrodes macroporeuses présentant différentes épaisseurs. Tout d'abord, pour souligner ce constat, il est nécessaire d'avoir à faire à une réaction d'oxydo-réduction lente. En effet, cela alloue le temps nécessaire aux molécules pour diffuser dans l'intégralité de la structure de l'électrode et pouvoir de ce fait, interagir avec celle-ci. Dans le cas contraire, pour des réactions redox trop rapides, les espèces ne réagiraient que sur les couches supérieures de pores de l'électrode sans avoir le temps de diffuser dans la totalité de son volume. La réaction de réduction de l'eau oxygénée répond à ce critère de cinétique lente et permet donc d'observer que plus l'électrode possède de demi-couches de pores, plus l'intensité du courant faradique de réduction de H_2O_2 en eau est importante (Fig. 68).

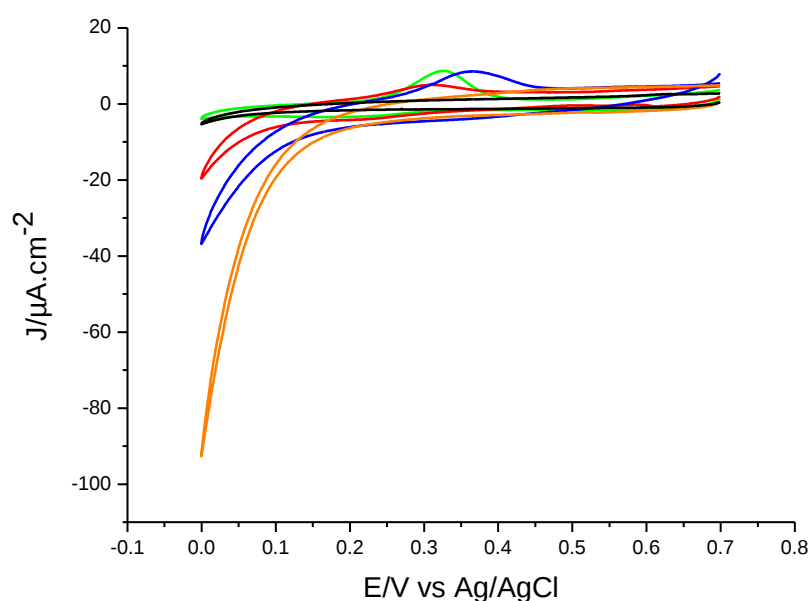


Figure 68 Comparaison de la réduction de H_2O_2 (10 mM dans 0,5 M H_2SO_4) sur des électrodes de différentes épaisseurs : électrode plane (noir), 1/2 couche (vert), 3/2 couches (rouge), 5/2 couches (bleu) 9/2 couches (orange). $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

La relation linéaire entre le courant de réduction prélevé à 0 V et l'épaisseur de l'électrode est présentée dans le graphe suivant :

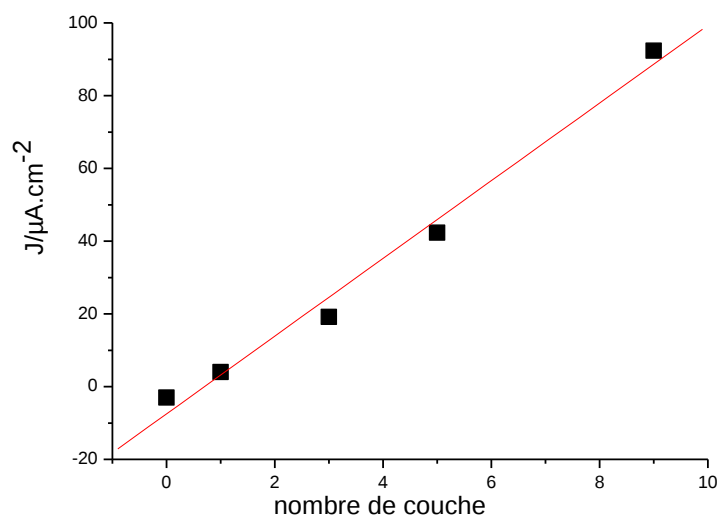


Figure 69 Densité de courant de réduction de H_2O_2 (10 mM dans 0,5 M H_2SO_4) relevée à 0 V en fonction du nombre de couches de l'électrode macroporeuse pour laquelle le signal est enregistré.

On peut en conclure que l'utilisation d'électrodes poreuses pour les réactions lentes est donc un outil efficace permettant d'augmenter les taux de conversion électrochimique.

Il existe une autre méthode de caractérisation de la morphologie de la structure macroporeuse. La technologie FIB (Focused Ion Beam) intégrée dans un microscope à balayage électronique, permet d'obtenir des tranches des électrodes macroporeuses, grâce à la réalisation de coupes transverses effectuées dans l'échantillon par un faisceau convergent d'ions Ga. Les observations MEB, prises à 52° de la coupe après formation de la tranche, peuvent par la suite être complétées par des clichés de microscopie TEM. La zone de l'échantillon à prélever doit être au préalable platinisée pour canaliser le faisceau d'ions et ne pas engendrer une fonte de l'échantillon.

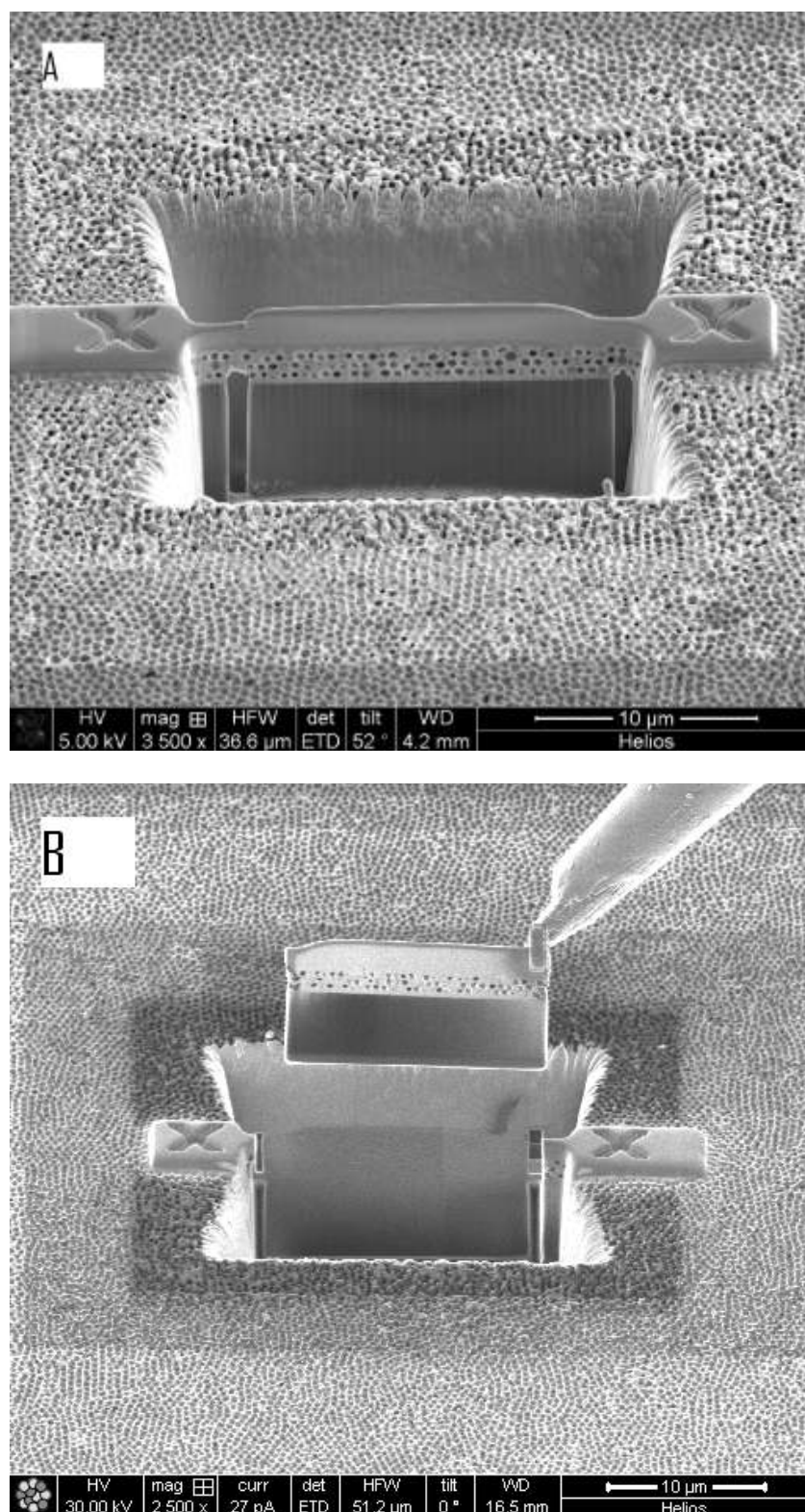


Figure 70 Observation MEB de la coupe transverse venant d'être réalisée par FIB dans une électrode poreuse de 7/2 couches de pores de 600 nm de diamètre A), prélèvement de cette tranche destinée à être observée par TEM B).

Comme le montre la Figure 70, la coupe réalisée par FIB permet de caractériser ou de confirmer la morphologie de l'électrode. Par exemple dans cette figure, il est aisément observable que la structure de l'électrode est constituée de 7/2 couches de pore. La dimension non-uniforme des pores

s'explique par le fait que la coupe ne peut se réaliser à la même latitude pour toutes les cavités sphériques constituant l'échantillon, sachant que l'assemblage des billes du template ne présente pas une organisation compacte parfaitement uniforme sur la totalité de la structure.

Grâce au traitement des images obtenues à partir de 75 coupes successives d'un même échantillon, séparées chacune d'une distance de 50 nm, il est possible de reconstruire à partir des clichés MEB de celles-ci la structure tridimensionnelle de celui-ci, ou à l'inverse de ses cavités (Fig.71). Les clichés suivants montrent quelques coupes successives effectuées par le FIB et observées simultanément au MEB :

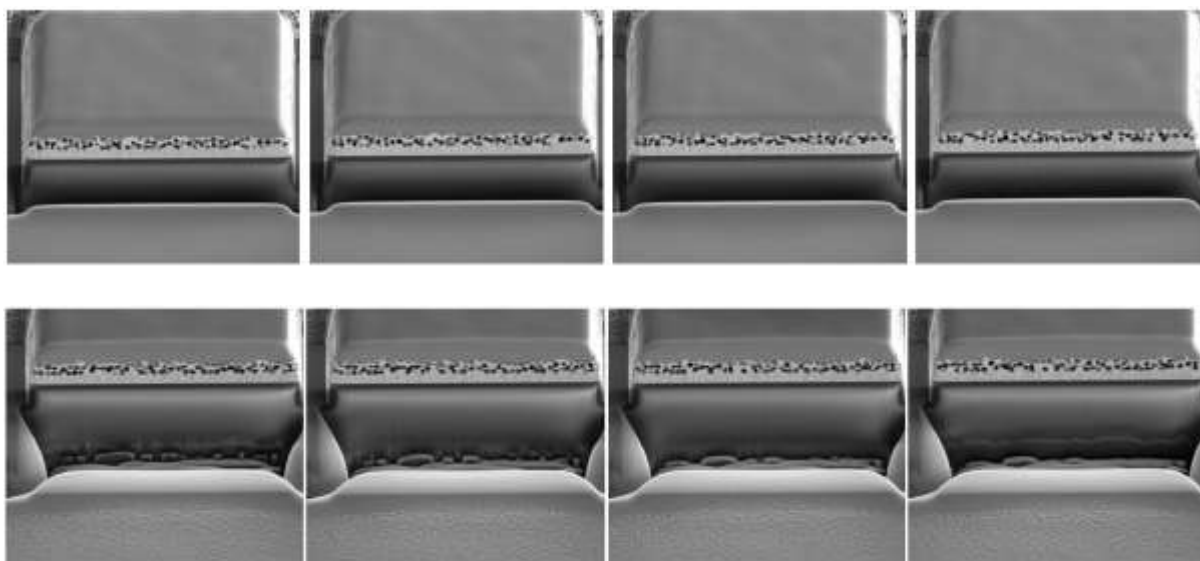


Figure 71 Clichés MEB de coupes successives effectuées par FIB sur un échantillon macroporeux recouvert d'or. Les clichés de ces coupes sont destinés à être retraités afin d'obtenir la reconstruction tridimensionnelle de la structure du matériau d'électrode.

Dans le cadre du projet qui est ici exposé, et ainsi que nous l'avons explicité précédemment, il est question dans un premier temps d'augmenter au maximum l'aire de la surface active de l'électrode de travail du réacteur afin d'intensifier les réactions électrochimiques se produisant dans le dispositif. Disposer d'une grande surface active permet de maximiser les taux de conversion électrochimique donc d'atteindre l'objectif final qui est de développer un dispositif fonctionnant avec des rendements compétitifs. Dans ces conditions, on peut être tenté de raisonner de la façon suivante : afin de répondre à ces exigences, on conçoit une électrode macroporeuse la plus épaisse possible, avec des pores de la plus petite taille possible. Toutefois, ces considérations sont erronées dans la mesure où elles ne prennent pas en compte le comportement du système bioélectrocatalytique à immobiliser dans un premier temps et à faire fonctionner dans un deuxième temps, à l'intérieur même de cette structure poreuse.

Par conséquent il est impossible d'optimiser la structure de l'électrode poreuse, indépendamment de l'ensemble du système électrocatalytique. Ainsi les performances de la structure métallique macroporeuse, de la couche d'immobilisation des constituants électrocatalytiques et des

biomolécules redox encapsulées, sont abordées de façon globale en considérant systématiquement les performances fournies par l'ensemble du dispositif électrocatalytique.

La partie suivante de ce rapport concerne l'étude et l'optimisation de la structure résultant de la combinaison de l'électrode macroporeuse avec une couche de silice ultra-mince électrogénérée, pour l'encapsulation et l'activation de biomolécules redox simples.

5.2 Etude de l'encapsulation de l'hémoglobine dans des couches de silice ultra-minces

Depuis qu'il a été mis en évidence que les matériaux formés par voie sol-gel peuvent servir à l'encapsulation de biomolécules [4] telles que les enzymes et les anticorps, la recherche dans le domaine des biomatériaux obtenus par ce type de procédé s'est fortement intensifiée. Le principe du procédé sol-gel a précédemment été présenté dans le chapitre 3. La démonstration prouvant que les propriétés spectroscopiques et l'activité biologique des biomolécules étaient conservées lors de l'encapsulation est relativement récente [5]. De plus les couches de silice formées par voie sol-gel représentent des intérêts évidents puisqu'elles peuvent être synthétisées avec une large gamme de fonctions organiques, ce qui leur permet d'accommoder leur propriétés à leur application, comme par exemple en modifiant leur caractère hydrophile ou hydrophobe [6,7]. Ces matériaux peuvent être utilisés pour retenir des complexes métalliques de structure similaire aux médiateurs par la création de liaison covalente, ou par des interactions de type électrostatique ou encore par adsorption [8]. Les molécules sont alors piégées dans la structure mésoporeuse de la silice et font partie de la structure du matériau. Le recours à des matériaux de silice produits par voie sol-gel permet aussi d'immobiliser des biomolécules retenues dans leur structure mésoporeuse. Cette méthode d'immobilisation de protéines se distingue par le fait que l'encapsulation n'altère ni la structure chimique ni la conformation de la biomolécule. Cette approche permet également d'isoler et de stabiliser des biomolécules d'un milieu chimique et thermique agressif. De plus, le réseau mésoporeux du gel de silice permet aux ions et aux molécules de petite taille d'accéder facilement aux biomolécules immobilisées. Habituellement les films de silice obtenus par voie sol-gel se forment lors d'une étape de polycondensation qui succède à une étape d'hydrolyse des précurseurs de silice. Cette polycondensation peut se produire par évaporation, par dip-coating ou par spin-coating. Lorsque le sol contient des biomolécules, la matrice de silice se forme autour de celles-ci, ce qui conduit à la formation de la couche biocomposite obtenue par un procédé de chimie douce. Toutefois ces procédures ne permettent pas de contrôler l'épaisseur du matériau déposé et ne peuvent engendrer un recouvrement homogène de la surface interne d'un matériau poreux car elles remplissent et bouchent complètement les cavités. Une méthode reportée récemment propose la possibilité d'encapsuler des biomolécules telles que l'hémoglobine ou une enzyme, la glucose oxydase, dans un gel de silice électro-généré à la surface d'électrodes. Ce procédé alternatif permet un contrôle précis

de l'épaisseur formée car l'étape de polycondensation du précurseur de silice est déclenchée et maintenue par l'application d'un potentiel approprié à la surface de l'électrode afin de générer des ions hydroxydes, catalyseurs de cette étape. Si des biomolécules sont présentes dans le sol initial, leur confinement à la surface de l'électrode dans la couche ultra-fine formée permettra des échanges électrochimiques directs [9].

Dans ce chapitre nous allons montrer qu'il est possible de déposer des couches ultra-minces de silice sur la surface interne des électrodes macroporeuses de façon homogène et sans en bloquer les interconnexions. Des expériences d'encapsulation d'une biomolécule rédox simple, à savoir l'hémoglobine, ont été menées en étroite collaboration avec nos partenaires à l'Université de Nancy, afin d'évaluer son activité dans un tel système d'immobilisation.

5.2.1 Détails expérimentaux

En plus des électrodes macroporeuses, les substrats de verre recouvert d'or ainsi que des résonateurs en cristal de quartz recouvert d'or (P-QA-A9M-Au, BioLogic) ont été utilisés. Avant utilisation, ces deux derniers types de support ont été soigneusement lavés dans des solutions de 30%-H₂O₂/96%-H₂SO₄ (1:5 vol/vol) pendant 20 min, puis soigneusement rincés à l'eau distillée. Les films de sol-gel sont électrogénérés à -1,3 V selon des périodes de temps que l'on fera varier. Ces films sont obtenus à partir d'un sol de départ contenant les précurseurs de silice. Il est composé d'un mélange de 20 mL d'éthanol, de 20 mL d'une solution de 0.1 M NaNO₃ et de 240 µL d'une solution de 0.1 M de HCl dans lequel on rajoute du tétraéthoxysilane (TEOS) pour obtenir des concentrations de 7 à 340 mM. De l'hémoglobine a été ajoutée au sol de départ dans des concentrations allant de 20 à 40 µM. Après l'étape d'électrodépôt, l'électrode est retirée de la solution, rincée à l'eau et placée sous vide à température ambiante. Les mesures de voltammétrie cyclique sont effectuées en tampon phosphate (0,05 M) à pH neutre.

5.2.2 Résultats et discussion

- **Etude du dépôt de silice sur électrode plane**

Afin de produire des couches ultra-minces de silice de façon contrôlée et reproductible, des études fondamentales sur les films de silice ont été effectuées chez nos collaborateurs à Nancy. Des films de silice sont donc d'abord déposés sur des électrodes planes puis caractérisés. Ils sont obtenus en immergeant l'électrode dans un sol de précurseur de silice hydrolysé (pH 3) et en appliquant un potentiel cathodique. En effet, pour des potentiels négatifs, des ions hydroxydes sont produits à la surface de l'électrode, capables de catalyser la polycondensation des précurseurs de silice (TEOS).

Des travaux décrits dans la littérature [¹⁰], montrent que l'on peut contrôler l'épaisseur du film en ajustant le potentiel et le temps d'électrogénération. Par ailleurs, en jouant sur la concentration du sol de départ en TEOS, il est également possible de faire varier l'épaisseur du dépôt jusqu'à des couches très fines.

Pour assurer l'obtention de films ultra-minces de silice (<100 nm), il a été décidé d'étudier les effets de la concentration en TEOS dans le sol initial, ceci permettant en premier lieu d'impacter la cinétique de polycondensation. Les résultats obtenus par microbalance à cristal de quartz électrochimique (suivant l'appellation anglaise « electrochemical quartz cristal microbalance » (EQCM)) ont montré que les taux de dépôt sont effectivement plus bas lorsqu'on manipule des sols peu concentrés en TEOS, c'est-à-dire inférieurs à 10 mM (Fig.72 A)). La même figure révèle qu'à l'opposé, pour des concentrations en précurseurs élevées, typiquement supérieures à 100 mM, les taux de dépôt sont plus importants, entraînant une formation de silice très rapide.

La Figure 72 B) met en valeur ces résultats de façon quantitative : elle permet de suivre les variations de l'épaisseur de la couche de silice électrogénérée en fonction du temps de dépôt pour trois sols présentant des concentrations en TEOS différentes. Les valeurs qui y sont rapportées sont les moyennes obtenues à partir de 15 mesures AFM effectuées sur 3 rayures distinctes d'un film pour obtenir des valeurs aussi fiables et précises que possible. Pour obtenir la valeur de l'épaisseur de la couche de silice, on soustrait à la valeur de la profondeur de la rayure celle obtenue sur un substrat rayé recouvert d'or seulement, (voir Fig. 72 C). Des films dont l'épaisseur augmente quasiment linéairement avec le temps de dépôt, compris entre 20 et 200 secondes, peuvent être obtenus à partir d'un sol de TEOS de concentration 13.6 mM (voir courbe (a)). Pour des sols un peu plus concentrés, à 75 mM (voir courbe (b)), élaborer une couche mince de silice devient plus délicat et n'est possible que pour des temps de dépôt très courts. Au-delà de ceux-ci, l'épaisseur dépasse très rapidement un micron, ce qui s'explique par la précipitation en masse d'agrégats de silice. Ceci est confirmé par les observations microscopiques et se trouve en accord avec ce qui a été précédemment décrit dans la littérature concernant le dépôt de matériaux similaires [¹¹]. Les résultats obtenus avec un sol très concentré à 340 mM de TEOS (cf courbe (c)), sont d'autant plus mauvais que non seulement les dépôts sont très épais, mais ils révèlent également suite aux observations microscopiques une grande hétérogénéité de la couche de silice, qui présente de nombreuses craquelures.

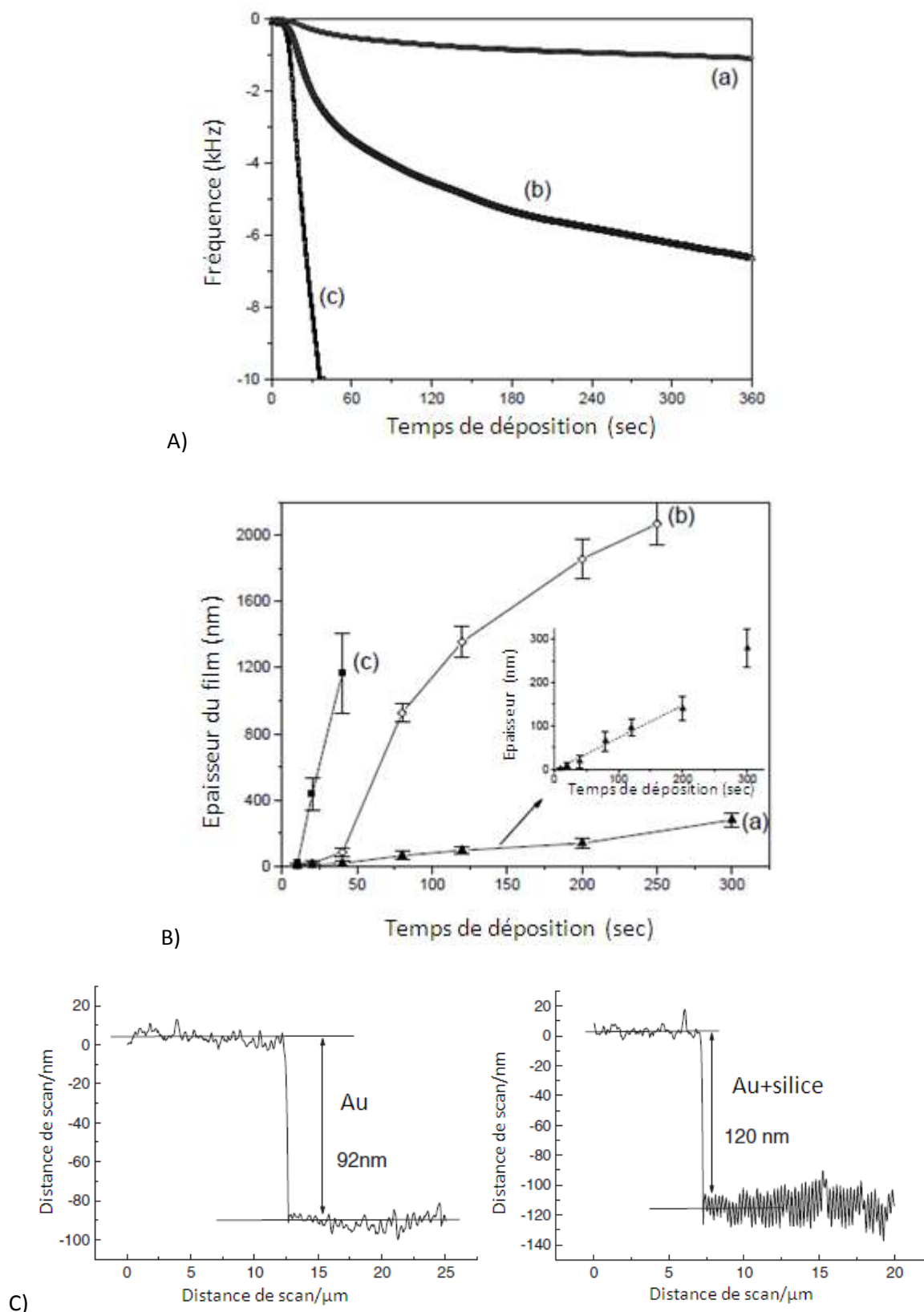


Figure 72: A) Courbes de la fréquence en fonction du temps tracées par EQCM sur des électrodes d'or dans des solutions de TEOS à (a) 13.6, (b) 75, (c) 340 mM, pour des potentiels allant de 0 à -1,3 V. (B) Tracé des variations de l'épaisseur des films de silice correspondant à ces différentes concentrations, suivant différents temps d'électrodéposition, déterminées par les mesures des profils AFM présentés en (C), où la profondeur des rayures peut être mesurée.

La morphologie des couches minces préparées à partir de 13,6 mM de TEOS a été examinée par AFM (Fig. 73 A)), afin de valider d'une part l'absence de craquelures dans les films résultant et d'autre part le recouvrement uniforme des supports.

Par ailleurs, il est important d'évaluer la rugosité de ces couches. La Figure 72 C permet dans un premier temps de constater que cette rugosité ne dépasse pas l'épaisseur du film. Les images AFM présentées dans la Figure 72, permettent d'évaluer la morphologie des films, suggèrent que le mécanisme de formation du film s'opère dans un premier temps par nucléation en différents points, puis se poursuit par la croissance de ceux-ci jusqu'à former des « nodules » de plus en plus importants suivant que l'épaisseur du film augmente.

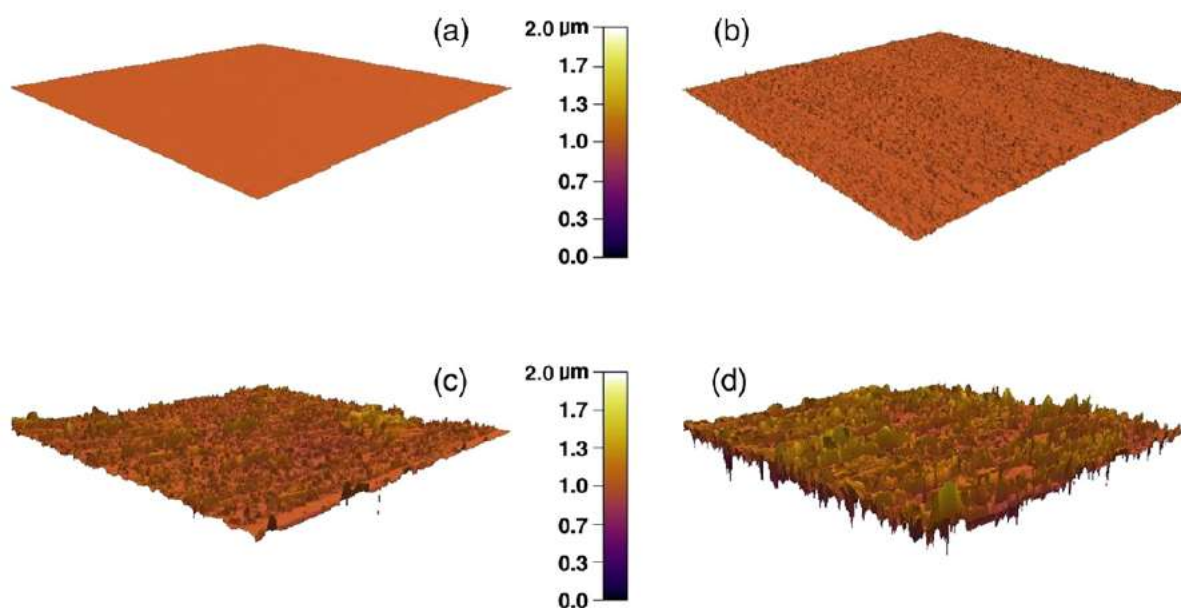


Figure 73 Clichés AFM (20*20 µm) de : (a) or non modifié, (b-d) films de silice électrogénérés pendant (b) 60, (c) 90, (d) 150 s à partir de sol de 13,6 mM de TEOS.

Afin de s'assurer que les films de silice formés, destinés à l'encapsulation des biomolécules catalytiques, soient perméables aux substrats de celles-ci, des tests de voltammétrie cyclique ont été effectués pour tester dans un premier temps leur perméabilité face à des molécules redox extérieures.

Les électrodes modifiées par des couches minces de silice sont plongées dans une solution tampon contenant des espèces moléculaires redox, telles que $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ou $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (5mM) (Fig. 74). La réponse des électrodes modifiées par des films de silice au $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ est très similaire à celle d'une électrode nue, ce qui suggère une faible résistance au transport de masse. Toutefois, plus les films sont épais, plus la cinétique des réactions redox est lente. Une tendance similaire s'observe pour le système redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ bien que la diminution du signal électrochimique de cette sonde soit plus marquée à cause de la répulsion électrostatique de la surface de silice négativement chargée. En effet, la solution de NaNO_3 présente un pH proche de 7 alors que le point de charge nulle de la silice

est reporté comme étant compris entre 2 et 3. A partir de 2 min les temps de dépôt deviennent trop importants, car dans ces conditions, la silice, trop épaisse, bloque le transport de masse, ce qui résulte en des intensités de courant trop faibles.

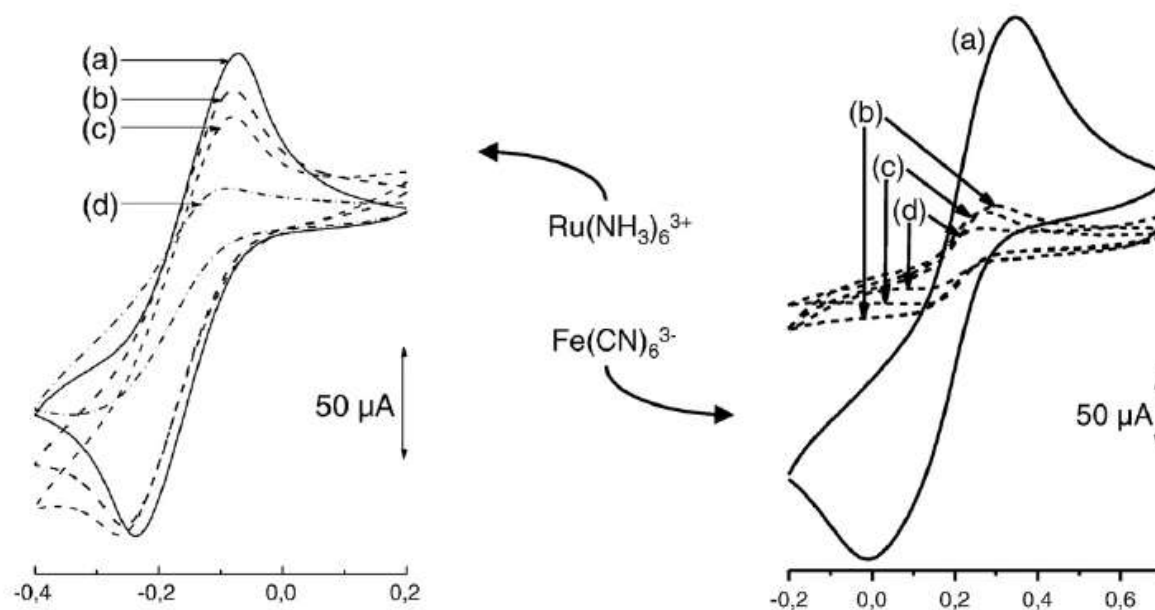


Figure 74 Voltammogrammes cycliques de solutions de 5mM de $\text{Ru(NH}_3)_6^{3+/2+}$ ou de $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ (dilués dans une solution de 0.1 M NaNO_3) sur une électrode d'or nue (a) ou recouverte d'une couche mince de silice électrogénérée pendant (b) 60, (c) 90, (d) 150 s à partir de sol de 13.6 mM de TEOS (pour une surface d'électrode de 0.25 cm^2 , avec comme référence Ag/AgCl). $v=100 \text{ mV.s}^{-1}$

Pour conclure, suivant ces travaux effectués par nos partenaires, des concentrations faibles en TEOS et des temps d'électrodépôt courts seront favorables à l'élaboration de couches de silice pouvant encapsuler le matériel électrocatalytique dans les pores de nos électrodes macroporeuses.

- **Encapsulation de l'hémoglobine dans les électrodes poreuses**

Afin de déterminer l'efficacité des films de silice ultra-minces pour l'encapsulation de matériel électro-enzymatique, l'immobilisation d'une biomolécule redox simple, à savoir l'hémoglobine (Hb), est dans un premier temps étudiée. Cette protéine possède quatre sous-unités, chacune associée à un groupement prosthétique appelé hème, lui-même constitué d'un ion de fer complexé par une porphyrine. C'est la présence des ions de fer sous forme ferrique (Fe^{3+}) qui confère à cette molécule des propriétés rédox par la réduction réversible de ceux-ci sous forme ferreuse (Fe^{2+}). Ainsi ces molécules vont jouer le rôle de sonde rédox permettant d'évaluer leur présence dans la structure macroporeuse de l'électrode grâce à la mesure de l'intensité de leur signal électrochimique.

Dans cette étude, on va s'intéresser à l'optimisation du dépôt de silice dans les cavités des électrodes. Ainsi pour commencer, on va chercher à déterminer le temps d'électrogénération le plus adéquat permettant d'obtenir le dépôt le plus homogène recouvrant l'intégralité de la structure

macroporeuse de l'électrode. D'après les études préliminaires effectuées sur des surfaces planes, la formation de couches ultra-minces de silice optimales, c'est-à-dire relativement peu rugueuses, homogènes, et perméables, est favorisée par un sol de TEOS de concentration 13.6 mM. Des temps d'électrodépôt faibles s'imposent également. Des conditions similaires sont donc respectées pour l'étude du comportement de ces couches ultra-minces lorsqu'elles sont électrodéposées à la surface d'électrodes macroporeuses,

Afin d'assurer la complète pénétration du sol dans ces substrats, ceux-ci sont immergés dans le sol hydrolysé 15 min avant le départ de l'électrodéposition. Si cette étape n'est pas respectée, le dépôt ne recouvre pas de façon homogène les différentes couches de pores que présente l'électrode. Différents temps d'électrogénération, 10, 30 et 60 secondes ont donc été appliqués pour modifier des électrodes de 3 demi-couches de pores de 440 nm de diamètre. Dans le but d'obtenir les résultats les plus précis, la voltammétrie cyclique est combinée à des mesures FIB.

Sur le graphe de la Figure 75, on remarque que les signaux électrochimiques de l'Hb, encapsulée à la surface de la structure poreuse des différentes électrodes, sont plus prononcés dans le cas d'un substrat modifié par une couche de silice polycondensée pendant 30 secondes. Pour cette électrode il est donc plus facile de repérer le signal de réduction du Fe^{3+} à partir d'un potentiel de -0,12 V et d'oxydation du Fe^{2+} à partir de -0,28 V environ. Le graphe obtenu pour une électrode recouverte d'une couche de silice générée pendant 10 s suggère un courant purement capacitif, ce qui indique que trop peu de silice a été déposée dans ce cas pour immobiliser suffisamment d'Hb à la surface du substrat. Quant à l'électrode modifiée par la couche générée pendant 60 s, la très faible intensité des pics de réduction et d'oxydation du fer de l'Hb tend à montrer que dans le cas de films de silice plus épais, l'activité électrochimique de l'Hb est plus difficile à réaliser. Une hypothèse est que cette catégorie de film ne permet pas de conserver les interconnexions ouvertes.

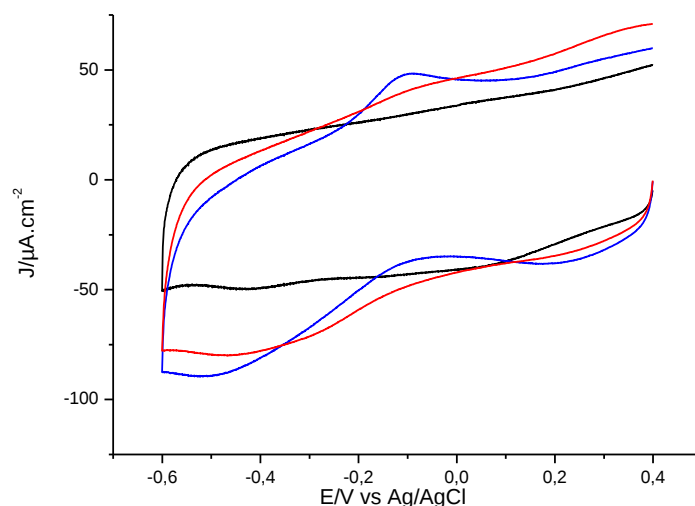


Figure 75 Voltamogrammes cycliques réalisés à partir de trois électrodes de 3 demi-couche de pores ($\varnothing$: 440 nm), modifiées par une couche de silice encapsulant de l'Hb, électrogénérée pendant 10 sec (noir), 30 sec (bleu) et 60 sec (rouge). 50 mM PBS pH=6,5 $v=100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Les images FIB confirment les précédentes suppositions. Il est ainsi observé sur les clichés suivants, que 10 s de polycondensation ne semblent pas suffisantes pour générer un film de silice assez épais. Par ailleurs, 30 s semblent convenir pour recouvrir l'intégralité de la surface d'un pore de façon homogène. Enfin, 60 s génèrent des couches d'épaisseur variables et pouvant boucher les interconnexions, comme le montre la différence de contraste au niveau de l'interconnection observable dans le dernier cliché de la Figure 76. On peut en conclure qu'un temps d'électrogénération proche de 30 s sera adapté pour le recouvrement de l'intérieur des pores des électrodes macroporeuses par une couche de silice électrodéposée.

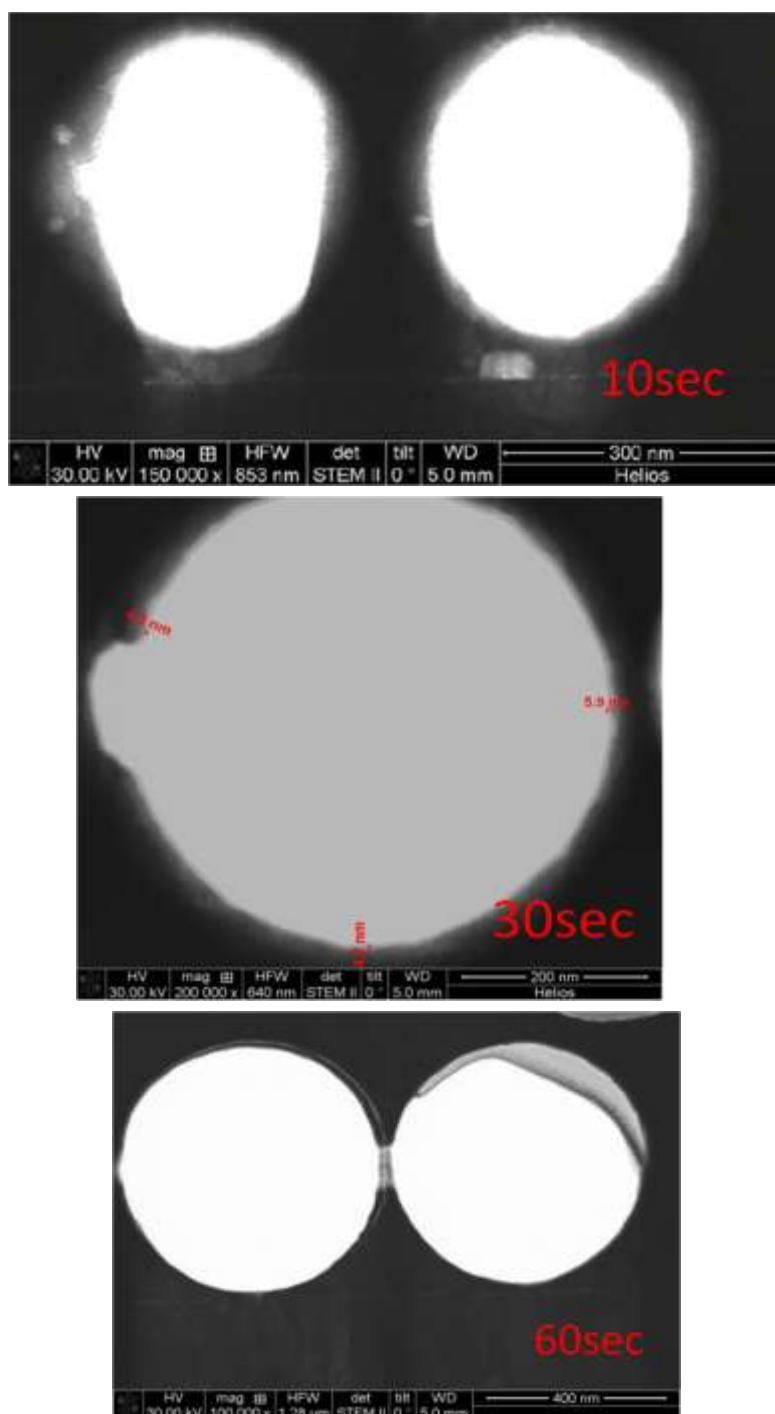


Figure 76 Clichés MEB de trois électrodes de 3 demi-couches de pores ($\varnothing$: 440 nm), modifiées par une couche de silice encapsulant de l'Hb, électrogénérée pendant 10 s, 30 s et 60 s.

Une reconstitution tridimensionnelle de l'intérieur des pores d'une électrode macroporeuse recouverte d'un film de silice électrogénérée pendant 60 s a pu être obtenue par traitement des images MEB des coupes FIB de cet échantillon. Toutefois, on constate que la reconstitution ne permet pas de distinguer la silice des espaces vides cohabitant dans les cavités des électrodes, ce qui ne nous permet pas de conclure avec cette méthode sur la qualité et l'homogénéité de la couche de silice (Fig. 77 A). L'image suivante en revanche est le résultat de la reconstitution de la structure d'une électrode macroporeuse recouverte de silice électrodéposée également pendant 60 s. On

observe sur ce cliché que les cavités sont conservées après la modification de l'électrode par la silice. Il est toutefois difficile d'évaluer précisément l'état des interconnexions dans ce type de représentation.

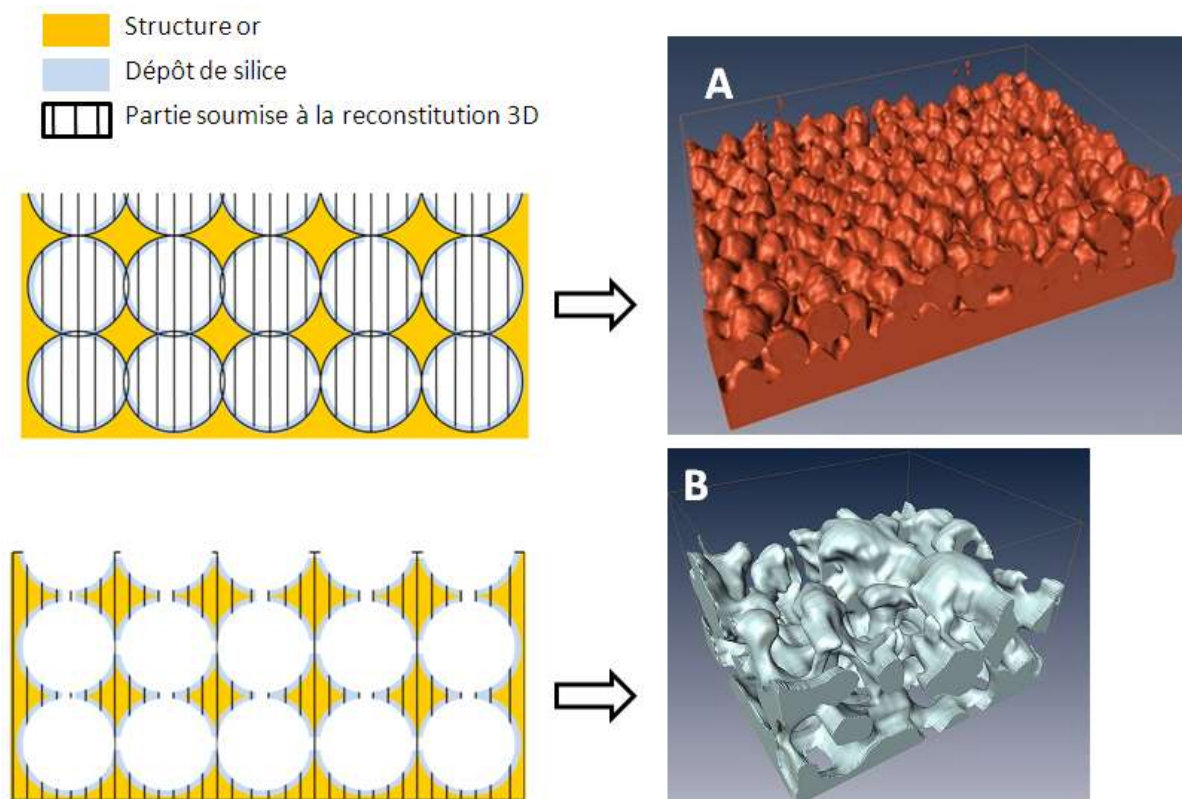


Figure 77 Reconstitution tridimensionnelle A) de l'intérieur des cavités des pores d'une électrode macroporeuse recouverte d'un film de silice électrogénéré (apparaît coloré sur l'image l'espace vide des cavités et leur matériau de recouvrement), B) de la structure macroporeuse d'une électrode recouverte d'une couche de silice électrogénérée.

Une électrode d'une épaisseur de 9/2 couches est modifiée par une fine couche de silice afin de pouvoir observer grâce au FIB et au MEB si le dépôt se produit jusque dans les couches inférieures d'une électrode plus épaisse. L'observation d'une tranche de cette électrode montre non seulement que la silice a été efficacement électrodéposée dans toutes les couches de pores de l'électrode, mais aussi qu'elle recouvre de façon homogène leur surface interne sans pour autant en remplir complètement leur volume et boucher les interconnexions.

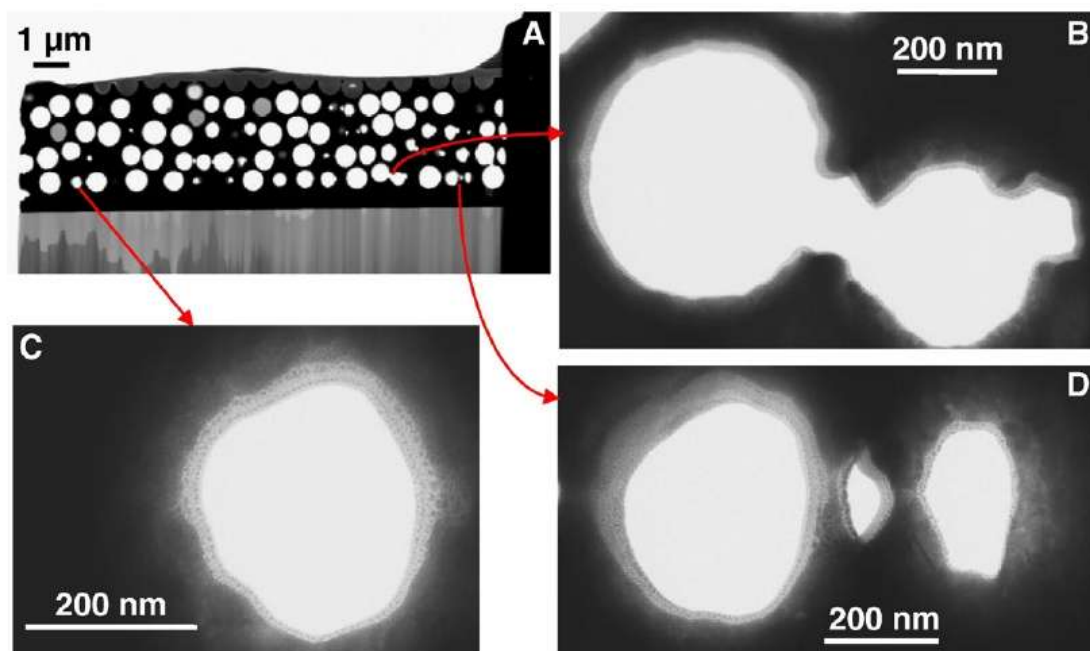


Figure 78 Clichés MEB de la coupe (A) d'une électrode d'or macroporeuse de 9/2 couches dont les pores sont décorés d'une couche ultra-mince de silice électrogénérée (20s) à partir d'un sol de TEOS à 13.6 mM. (B-D) clichés haute résolution.

Ces clichés justifient le recours à la procédure électrochimique de polycondensation du sol. En effet, comme expliqué précédemment, l'application du potentiel négatif génère des ions OH^- à la surface de l'électrode, catalysant de façon localisée la polycondensation dans la zone précise de production de l'élément catalyseur. Les études MEB combinées aux techniques FIB, ont donc permis la confirmation que cette méthode de dépôt pouvait conduire à un recouvrement homogène des cavités des électrodes macroporeuses.

- **Etude de la conservation de l'activité catalytique d'une biomolécule rédox immobilisée**

Trois catégories d'électrodes, présentant différentes tailles de pores (295, 600 et 1200 nm) sont testées afin de déterminer s'il existe une taille permettant l'élaboration d'une électrode optimale. Le recours à des électrodes de pores de petite taille (295 nm) permet de réaliser des électrodes qui maximisent l'aire de la surface active comparé à d'autres électrodes d'épaisseur égale, mais possédant des pores de plus grande taille. Les électrodes présentant des pores de plus grandes tailles (600, 1200nm) assurent en revanche des interconnexions entre les cavités de plus grande dimension. L'objectif recherché est de pouvoir évaluer le comportement du système composé de l'électrode macroporeuse et de la couche de silice immobilisant la biomolécule rédox suivant l'intensité du phénomène catalytique que ce système est capable de générer. La Figure 79 montre les signaux électrochimiques de l'Hb quand elle est encapsulée sur la surface interne des structures poreuses d'électrodes de 1, 3 et 5 demi-couches présentant les trois tailles de pores mentionnées ci-dessus. L'électrodépôt a été effectuée pendant 30 s à -1,3 V. Les balayages de potentiel sont enregistrés après que le milieu réactionnel est complètement désoxygéné par un flux d'argon, appliqué pendant 10 min environ.

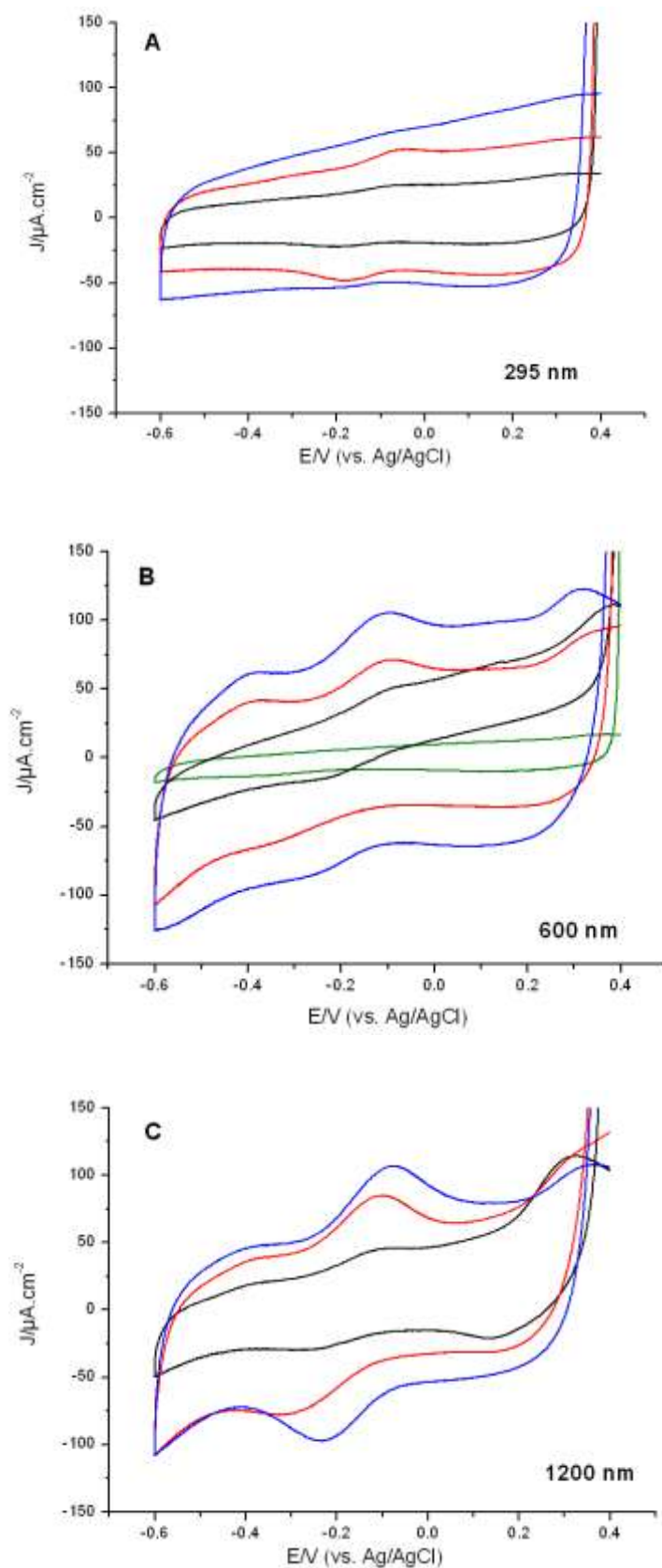


Figure 79 Voltammogrammes cycliques obtenus par immobilisation de l'Hb dans des couches de silice déposées dans des électrodes macroporeuses présentant des tailles de pores de 295 (A), 600 (B) et 1200 nm (C). Chaque catégorie d'électrode présente différentes épaisseurs : électrode plane (vert), 1/2 couche de pores (noir), 3/2 couches de pores (rouge), 5/2 couches de pores (bleu). 50 mM PBS pH=6,5 $v=100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Tout d'abord, plus l'électrode présente un nombre élevé de demi-couches, plus les densités de courant enregistrées sont élevées. Cela comprend l'augmentation du courant capacitif, mais aussi du courant faradique produit par le processus rédox de l'Hb. Grâce aux mesures FIB, l'électrodépôt de la silice dans les différentes demi-couches de pores de l'électrode a déjà été prouvé. Ces nouveaux résultats confirment alors l'immobilisation de la biomolécule à la surface de l'intégralité de la structure poreuse. Ainsi plus l'électrode est épaisse, plus la quantité de l'espèce redox biologique immobilisée est importante, d'où l'intensité des pics de réduction et d'oxydation croissante enregistrée avec l'augmentation du nombre de demi-couches. D'autre part, pour les mêmes nombres de demi-couches, les électrodes présentant des diamètres de pores de 295 nm affichent des densités de courant plus faibles que les électrodes ayant des tailles de pores supérieures. Ces observations suggèrent que le dépôt de silice contenant l'Hb est moins important dans cette catégorie d'électrodes. Par ailleurs, pour une série de substrats de même taille de pore mais d'épaisseurs différentes, le signal rédox de l'Hb est plus difficilement observable pour les structures épaisses, ce qui suggère que la qualité du recouvrement par la silice s'altère avec l'épaisseur de l'électrode. Ceci peut s'expliquer soit parce que le sol de TEOS n'a pu pénétrer dans l'intégralité de la structure à cause d'interconnexions trop étroites, soit parce que le film de silice électrogénéré bouche les interconnexions, ce qui empêche une partie de l'Hb de réagir.

Entre les électrodes de 600 et 1200 nm de taille de pores, pour un nombre de demi-couches identiques, les densités de courant sont similaires. Ceci rejoint ce qui a été précédemment expliqué dans la partie 1 de ce chapitre, à savoir que l'augmentation de la surface active d'une électrode poreuse ne dépend pas du diamètre des pores qui la composent, mais du nombre de couches (ou demi-couches) qui déterminent son épaisseur. Toutefois l'augmentation de courant entre une électrode à 3 demi-couches et une à 5 est plus prononcée lorsque le diamètre des pores est de 600 nm, comparé à 1200 nm. Une hypothèse pouvant expliquer cette constatation est que la pénétration du sol est plus difficile à effectuer sur l'électrode de 1200 nm sachant que celui-ci doit s'infiltrer dans une profondeur totale de 2669,64 nm comparée à 1334,8 nm pour l'électrode de pores de 600 nm de diamètre (voir formule relative à l'épaisseur du cristal colloïdal présenté dans le chapitre 3). Par la suite, nous avons choisi de travailler avec des électrodes de 600 nm de taille de pores, ce qui semble être un bon compromis entre une taille de pore suffisamment petite pour avoir une augmentation de surface plus importante (à épaisseur égale), et suffisamment grande pour permettre des interconnexions de diamètre assez large.

Enfin, pour chaque catégorie d'électrodes poreuses, quel que soit le diamètre de ses pores, l'intensité de la réaction redox n'augmente pas linéairement avec l'aire de la surface active. Plusieurs explications peuvent éclaircir ce phénomène. L'hypothèse d'une trop grande viscosité du sol empêchant celui-ci de pénétrer uniformément dans toutes les couches de pores peut être envisagée. On suppose encore une fois qu'une partie des interconnexions peut se bloquer et de ce fait, entraver l'activation électrochimique de toutes les molécules d'Hb. Enfin, il est important de considérer qu'au potentiel où se déroule l'électrodéposition (-1,3 V), une quantité non négligeable

de H_2 est produite et peut endommager l'électrodépôt ou même empêcher sa formation. Il est également possible qu'une partie du gaz soit retenue à l'intérieur de la couche poreuse et rende cette zone non-électroactive, c'est-à-dire, qu'elle n'est plus disponible pour participer à la réaction d'oxydoréduction de l'Hb.

Malgré ces limitations, l'activité catalytique de la molécule d'Hb envers l'eau oxygénée est étudiée, dans le cas particulier où cette biomolécule redox est immobilisée dans la matrice mésoporeuse de silice. L'Hb est en effet capable de catalyser, en solution, la réduction de l' H_2O_2 en H_2O . Des phénomènes similaires peuvent être observés avec l'oxygène, dont la réduction, comme pour l'eau oxygénée, peut être catalysée par l'Hb. Comme manipuler un gaz peut s'avérer plus délicat en termes d'évaluation des quantités injectées dans le système, le choix de l'étude de la réduction l' H_2O_2 s'est donc imposé pour des raisons pratiques. Comme le montre le graphe suivant, l'ajout de H_2O_2 dans le milieu réactionnel de l'électrode de 3/2 couches de pores (ϕ_{pore} : 600 nm) modifiée par une couche de silice contenant de l'Hb, entraîne une réduction catalytique : le pic d'oxydation propre à l'Hb disparaît au profit d'un courant de réduction qui augmente avec l'ajout d' H_2O_2 . On note qu'entre l'instant où l' H_2O_2 a été ajoutée et celui où la courbe est enregistrée, 20 min d'attente doivent être respectées afin de permettre à l'eau oxygénée de diffuser dans les différentes couches de l'électrode ainsi que dans le film de silice. On en conclut que l'activité catalytique de la molécule est préservée lorsque celle-ci est immobilisée dans un film de silice à l'intérieur d'une électrode poreuse.

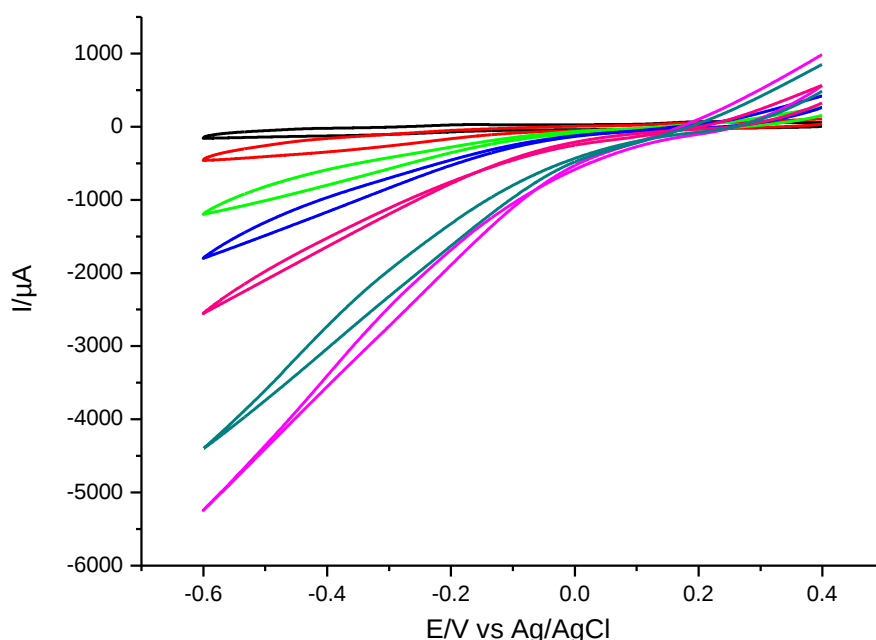


Figure 80 Catalyse de la réduction de H_2O_2 par Hb immobilisée dans une couche de silice ultra-mince recouvrant une électrode de 3/2 couches de pores de 600 nm de diamètre. (du noir au violet : 0mM H_2O_2 ajouté, 0,98 mM, 4,71 mM, 8,9 mM, 17,6 mM, 50,6 mM, 88,1 mM). 50 mM PBS pH=6,5 $v=100 \text{ mV.s}^{-1}$.

La Figure 81 A) indique que le facteur d'amplification du signal électrocatalytique caractéristique de l'Hb entre une électrode de 3/2 couches et une de 9/2 ($\phi_{\text{pore}} : 600 \text{ nm}$) atteint une valeur proche de 7. En revanche, l'intensité des courants de réduction (prélevé à -0.4 V) de l' H_2O_2 catalysée par l'Hb immobilisée sur ces mêmes électrodes, diffère au maximum d'un facteur de 3,4, pour les fortes concentrations de H_2O_2 ajouté (Fig.81 B)). La possibilité que l'eau oxygénée n'ait pas pu accéder à l'intégralité des molécules d'Hb à l'origine des signaux présentés sur la Figure 81 A) peut expliquer cette différence de facteur d'amplification.

Pour les faibles concentrations en H_2O_2 ($< 1 \text{ mM}$), le phénomène limitant la réaction est la diffusion de l'analyte vers la surface interne de l'électrode. Par conséquent, dans ces conditions, l'amplitude du courant enregistré dépendra principalement de la surface géométrique de l'électrode. L'impact de l'augmentation de la surface active sur l'intensité de la réaction ne s'observe donc que pour des concentrations plus élevées. Ainsi, le recours aux électrodes macroporeuses est justifié dans cette mesure où, pour des concentrations suffisantes, le signal électrocatalytique est amplifié lorsque le système est activé sur une électrode présentant un nombre plus important de couches de pores.

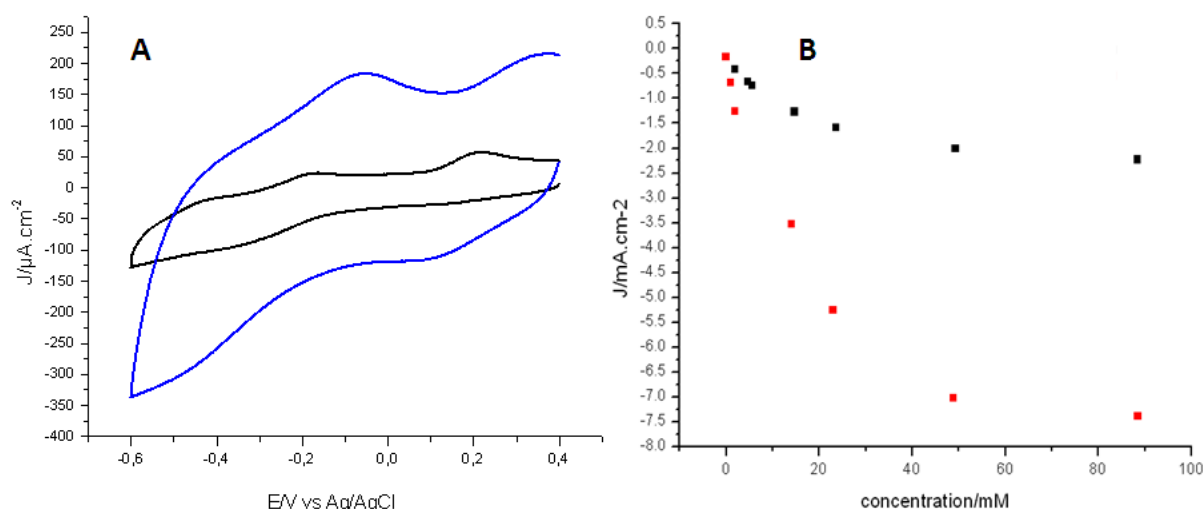


Figure 81 A) Voltammogrammes cycliques obtenus par immobilisation de l'Hb dans des couches de silice déposées dans des électrodes macroporeuses présentant des tailles de pores de 600 nm. Chaque catégorie d'électrode présente différentes épaisseurs : 3/2 couche de pore (noir), 9/2 couches de pores (bleu). B) densité de courant des pics de réduction de H_2O_2 catalysé par l'Hb pris à -0.4 V en fonction des différentes concentrations de H_2O_2 ajoutées pour une électrode de 3HL (noir) et de 9HL (rouge). $50 \text{ mM PBS pH}=6,5 \text{ v}=100 \text{ mV.s}^{-1}$.

5.2.3 Conclusion

Ce travail a démontré l'efficacité des films ultra-minces de silice pour recouvrir les structures métalliques des électrodes macroporeuses en tapissant de façon homogène l'intérieur de leurs pores. Les couches minces de silice obtenues par voie sol-gel et polycondensées par électrogénération permettent également d'encapsuler des biomolécules redox simples à la surface d'électrodes macroporeuses, tout en préservant leur activité catalytique. Dans les chapitres suivants, cette voie d'immobilisation va être étudiée et optimisée pour retenir à la surface des électrodes macroporeuses le système électroenzymatique plus complexe, destiné à réaliser la bioélectrosynthèse du réacteur.

Références Bibliographiques

- (1) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Chemistry: Fundamentals and Applications*. 2 ed.; Wiley: New York, 2001.
- (2) Woods, R. *Electroanalytical Chemistry: A series of Advances*; Marcel Dekker: New York, 1980; Vol. 9.
- (3) Szamocki, R., Université de Bordeaux 1, Universität des Saarlandes, Synthèse contrôlée d'électrodes macroporeuses pour des applications électrocatalytiques 2006.
- (4) Avnir, D.; Lev, O.; Livage, J. *Journal of Materials Chemistry* **2006**, 16, 1013.
- (5) Besanger, T.; Brennan, J. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2006**, 40, 209.
- (6) Reetz, M. T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, 49, 527.
- (7) Wang, B.; Zhang, J.; Dong, S. *Biosensors and Bioelectronics* **2000**, 15, 397.
- (8) Tfouni, E.; Doro, F. G.; Gomes, A. J.; Silva, R. S. d.; Metzker, G.; Benini, P. G. Z.; Franco, D. W. *Coordination Chemistry Reviews*, **2010**, 254, 355.
- (9) Nadzhafova, O.; Etienne, M.; Walcarius, A. *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, 1189.
- (10) Sibottier, E.; Sayen, S.; Gaboriaud, F.; Walcarius, A. *Langmuir* **2006**, 22, 8366.
- (11) Shacham, R.; Avnir, D.; Mandler, D. *Advanced Materials* **1999**, 11, 384.

Chapitre 6

Système bio-électrocatalytique encapsulé dans des couches minces de silice

6 Système bio-électrocatalytique encapsulé dans des couches minces de silice

La réaction électrochimique produite par le réacteur est catalysée par une protéine rédox de la famille des déshydrogénases. Ici on choisit d'étudier l'activité de la D-sorbitol déshydrogénase (DSDH) comme enzyme modèle, capable d'oxyder le D-sorbitol en D-fructose lorsqu'elle se trouve immobilisée à la surface de l'électrode de travail du réacteur. Il s'agit donc dans un premier temps de définir chaque élément du système catalytique susceptible d'optimiser son activité. Dans un deuxième temps, l'immobilisation complète de ce système sera mise en place pour que chacun des constituants de la chaîne électrocatalytique soit également retenu à la surface de l'électrode. L'optimisation de la production de fructose réalisée par ce système étant la clef de voute du fonctionnement du réacteur, une stratégie d'amélioration des intensités de courant catalytique sera déployée.

6.1 Electrocatalyse du cofacteur NADH/NAD⁺

La régénération du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NADH/NAD⁺) à la surface des électrodes est un point clef du développement du bioréacteur. On rappelle que le transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme, catalyseur biologique de la réaction effectuée au sein du réacteur, est difficilement réalisable. Tout d'abord, la biomolécule est susceptible de subir une dénaturation à l'intérieur de la couche diffuse. Ensuite, la distance entre la surface de l'électrode et le site actif de l'enzyme, isolé à cause de la gangue protéique de la biomolécule, ne facilite pas les échanges électroniques. Par conséquent, d'importants surpotentiels sont nécessaires à l'exécution de telles réactions, ce qui maximise l'occurrence de réactions secondaires. Pour diminuer ces surpotentiels et préserver les enzymes, le recours à des catalyseurs moléculaires appelés médiateurs rédox est adopté. Ces molécules assurent le transfert d'électron entre enzyme ou coenzyme et électrode grâce à leur rôle de navette d'électrons. Dans cette étude nous nous intéresserons essentiellement à la médiation établie entre cofacteur et électrode.

Comme précisé précédemment, les synthèses que l'on vise à effectuer dans le réacteur, reposant sur des réactions de réduction et d'oxydation, peuvent être catalysées par des déshydrogénases. Ceci requiert la régénération du NADH ou du NAD⁺ suivant qu'une ou l'autre des réactions d'oxydoréduction se produit. Les schémas représentatifs des deux fonctionnements réactionnels possibles réalisés par ce dispositif enzymatique sont représentés dans la Figure 82..

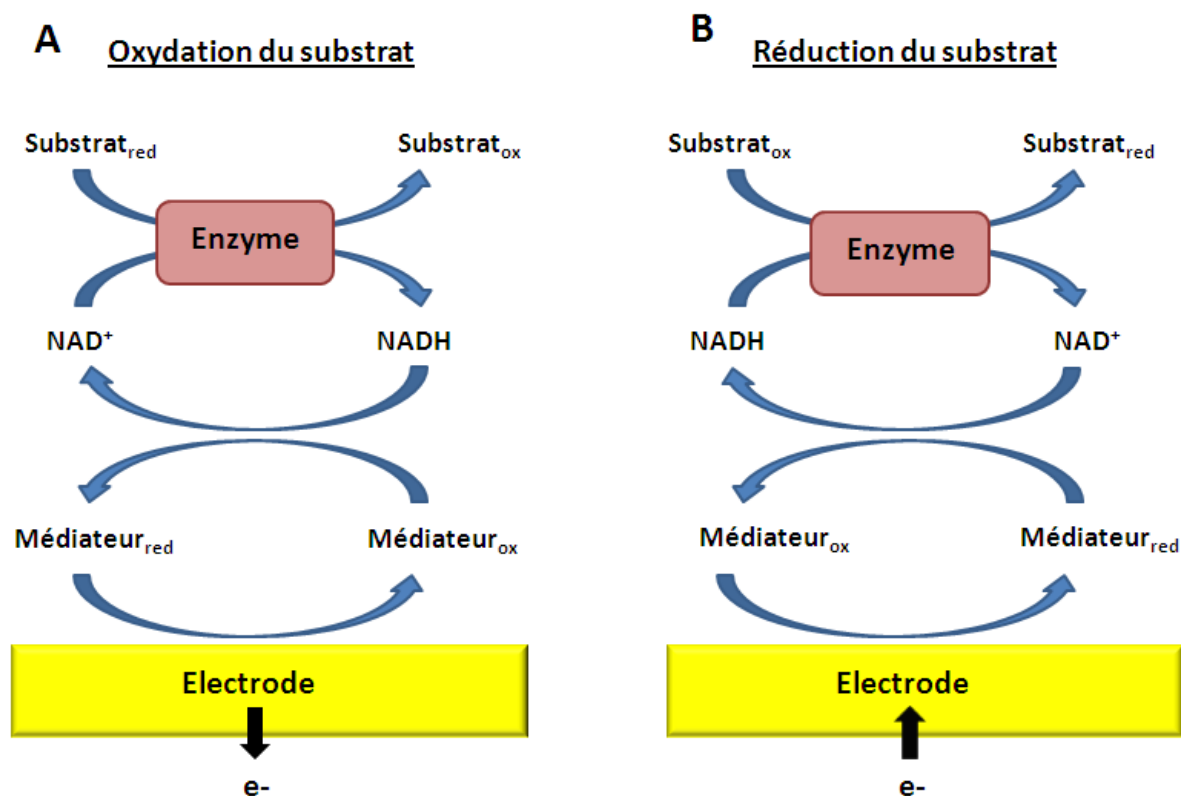


Figure 82 Schémas représentatifs des dispositifs enzymatiques pour la réalisation de réactions d'oxydation (A) et de réduction (B) de substrat.

NADH est oxydé à des potentiels positifs importants ($\sim +0,8$ V), tout comme le NAD^+ est réduit à des potentiels négatifs élevés ($\sim -1,2$ V) [1,2]. De nombreux efforts de recherche se sont concentrés sur la diminution des potentiels d'oxydation et ont permis de définir plusieurs médiateurs efficaces [3,4]. En revanche la littérature fait état de beaucoup moins de travaux présentant des médiateurs capables de catalyser la réduction du NAD^+ . Comme nous étudions les deux catégories de réactions rédox, le premier paragraphe de ce chapitre est dédié à la recherche de médiateurs pouvant catalyser la réduction du NAD^+ .

6.1.1 Réduction catalysée du NAD^+

Dans cette partie, on cherche à mettre en place des réactions de réduction électro-catalytique réalisées par la D-sorbitol déshydrogénase (DSDH) (E.C : 1.1.99.21) qui est l'enzyme destinée à être étudiée dans ces travaux, en tant qu'« enzyme modèle ». Or, pour que cette enzyme puisse effectuer une réaction de réduction, il est préférable qu'elle soit placée dans un milieu réactionnel tamponné à pH neutre voire légèrement acide (entre 6 et 7.2) [5]. D'après les schémas de la Figure 82, on constate que si la réaction en jeu est une réduction, alors le cofacteur NAD^+ doit être réduit via le médiateur à l'électrode. Le voltammogramme cyclique présenté dans la Figure 83 permet de repérer les potentiels de réduction du NAD^+ sur une électrode d'or dans les conditions expérimentales de pH favorables à l'activité de la DSDH:

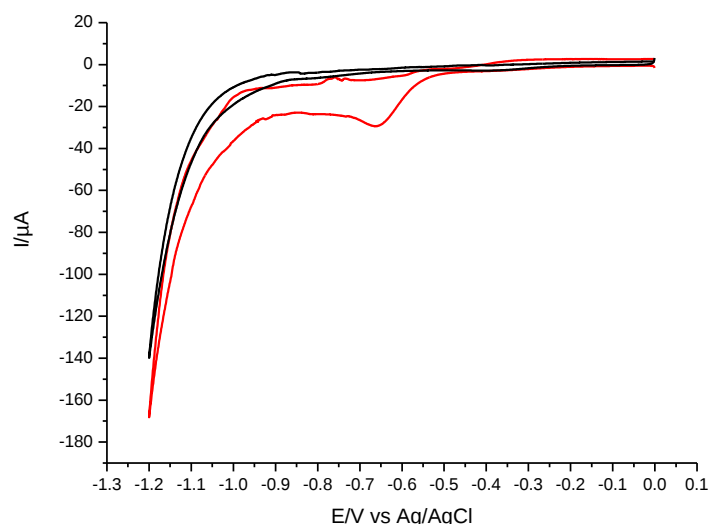


Figure 83 Voltammogramme cyclique de la réduction de 1mM de NAD^+ (rouge) sur une électrode d'or, voltammogramme cyclique de référence de l'or dans le tampon (noir). 20 mM tampon phosphate pH=7 $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$

On observe que dans ces conditions la réduction du NAD^+ est possible vers -0,6 V. Un médiateur pouvant prétendre à la réduction catalysée de ce cofacteur devra donc présenter idéalement un potentiel standard ($E^\circ(\text{V})$ vs. Ag/AgCl) supérieur à cette valeur. Il devra également être capable de pouvoir échanger un proton H^+ afin de permettre la réduction de NAD^+ en NADH. D'après la littérature, il existe plusieurs médiateurs répondant à ce critère de potentiel, mais peu sont décrits comme étant capables de catalyser la réduction du NAD^+ . Un travail de recherche d'un éventuel candidat s'est donc imposé. Les différents médiateurs que nous avons testés pour effectuer la réduction de 1 mM de NAD^+ , dans une solution de tampon phosphate (20 mM) à pH 7 selon une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} , sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Médiateur	$E^\circ(\text{V})$ vs Ag/AgCl	Références
bleu de méthylène	-0,187	6,7
safranine O	-0,5	8
5'5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque acid)	0	9
Rouge d'alizarine	-0,54	10,11
Azure C	-0,220	12
Complexe de Rhodium	-0,72	13
Complexes d'Osmium	-0,64, -0,38	14

Tableau 1 Médiateurs utilisés pour la réduction catalytique de NAD^+

Les seuls médiateurs révélant un signal de réduction catalytique du NAD^+ sont les complexes d'Os $[\text{Os}(\text{1-méthylimidazole})_2(\text{N,N'-diméthyl-1,1'-biimidazole})_2]^{2+/3+}$ et $[\text{Os(III)}(\text{N,N'-diméthyl-2,2'-biimidazole})_2(\text{Cl})_2]^{2+/3+}$ que nous avons synthétisés en collaboration avec l'équipe de N. Mano du laboratoire CRPP (voir annexes A 3) et un complexe de rhodium synthétisé par nos collaborateurs de

l'Université d'Ankara, le $[\text{Rh}(\text{dichloro } 4,4'\text{-diméthylebipyridine})^{3+/2+}(\text{III})]$. Ces catalyses se révèlent être toutefois relativement faibles, voir figure suivante :

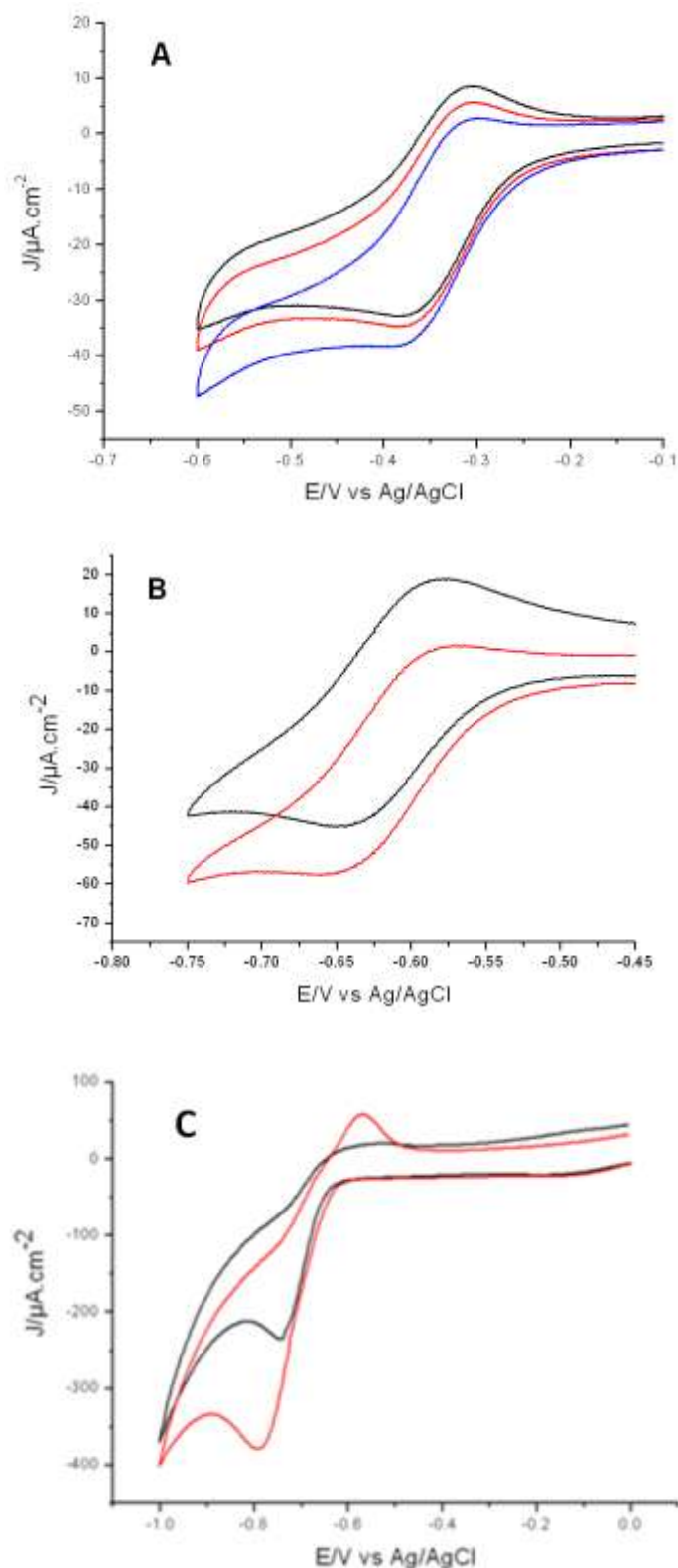


Figure 84 Voltammogrammes cycliques du complexe d'osmium $[\text{Os}(\text{1-méthylimidazole})_2(\text{N,N'-diméthyl-1,1'-biimidazole})_2]^{2+/3+}$ (A), $[\text{Os}(\text{III})(\text{N,N'-diméthyl-2,2'-biimidazole})_2(\text{Cl})_2]^{2+/3+}$ (B) et de rhodium (C) avant (noir) et après addition de 1 mM NAD^+ (rouge), de 2,5 mM NAD^+ (bleu). 20mM tampon phosphate pH=7 $v=10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dans le but d'intensifier les échanges électroniques entre médiateur et cofacteur, une seconde enzyme, la diaphorase (DI) (EC 1.6.5.2), également appelée NADPH déshydrogénase, peut être ajoutée à la chaîne catalytique (Fig.85). Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



Le nouveau dispositif catalytique y faisant appel peut donc être schématisé de la façon suivante :

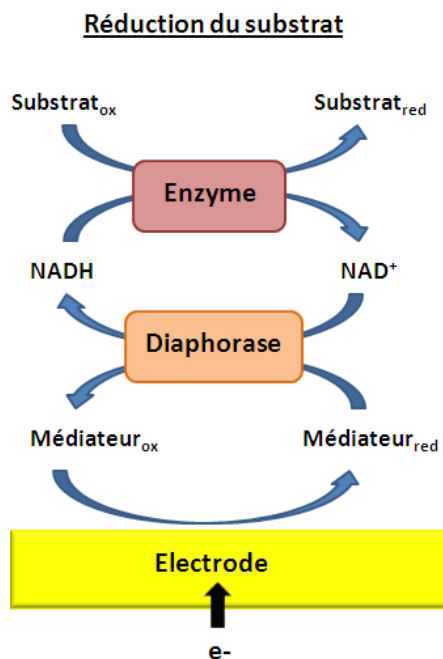


Figure 85 Schéma représentatif du dispositif enzymatique pour la réalisation de réactions d'oxydation (A) et de réduction (B) de substrat par un système bi-enzymatique.

L'utilisation de la DI pour catalyser la réduction ou l'oxydation du cofacteur a été décrite dans la littérature, où elle est combinée avec différents médiateurs tels que le méthyle viologène [15,16], le rouge d'alizarine [11], des flavines, des quinones [17,18], ou des complexes métalliques [19].

La comparaison de la Figure 86 A) et B) montre que la catalyse du NAD^+ par le rouge d'Alizarine (RA) est plus intense lorsque la DI est ajoutée au système. Dans le cas du RA seul (Fig. 86 A)), il apparaît difficile de déterminer s'il s'agit effectivement de la réduction catalytique de NAD^+ par le RA. En effet, le voltammogramme rouge ne présente pas la forme caractéristique de réduction catalytique, dans la mesure où la diminution de l'intensité du pic d'oxydation ne s'accompagne pas de l'augmentation de celle du pic de réduction, qui demeure très proche de celle du signal du médiateur seul. En revanche, la Figure 86 B) révèle la catalyse du cofacteur par la DI : l'ajout de NAD^+ entraîne effectivement dans ce cas l'augmentation de l'intensité du pic de réduction avec l'ajout de substrat. Ces premiers constats permettent de confirmer le rôle catalytique de l'enzyme envers les transferts d'électrons entre médiateur et cofacteur. La communication électrochimique au sein de cette boucle catalytique composée du médiateur, de la DI et du cofacteur, et constituant la première partie de la chaîne catalytique finale (Fig. 85) a donc été validée.

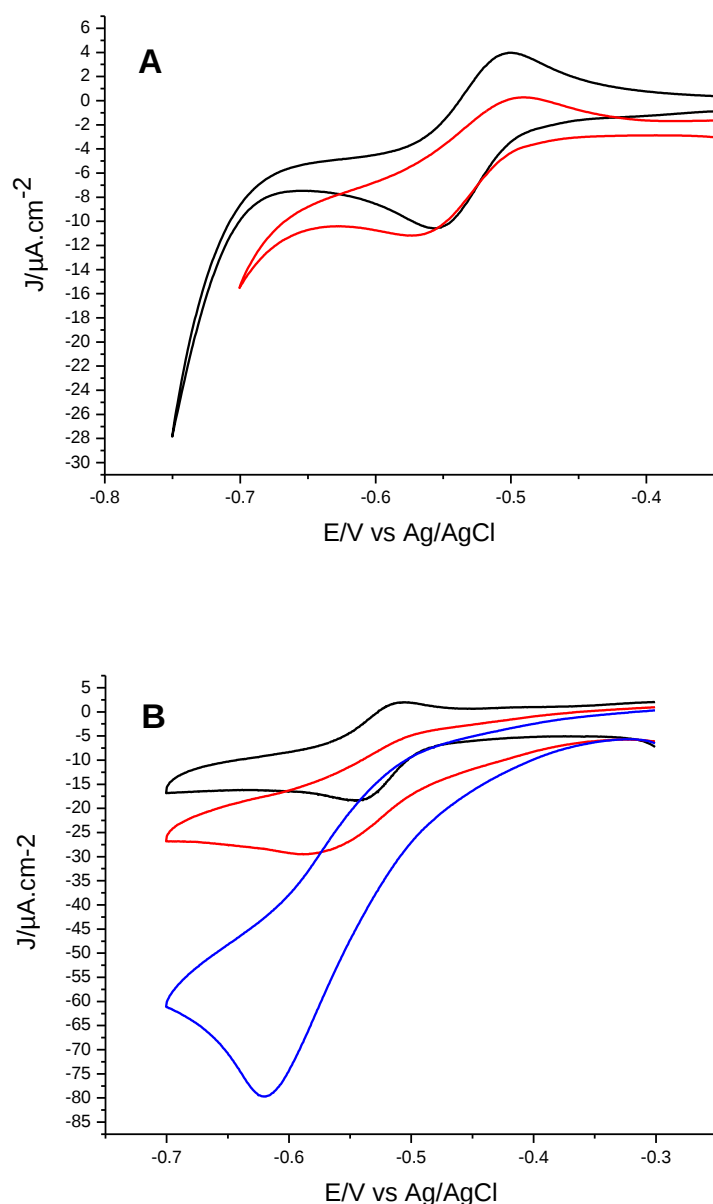


Figure 86 Voltammogrammes cycliques (A) du RA (noir), ajout de 1 mM NAD^+ (rouge), (B) du RA (noir), ajout de 1 mM NAD^+ et 0.2 mg/mL DI (rouge), ajout de 5 mM NAD^+ (bleu). 20 mM Phosphate pH=7 $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Le même type d'expérience a été effectué avec l'emploi du complexe d'osmium, $[\text{Os(III)}(\text{N,N'}\text{-dimethyl-2,2'-biimidazole})_2(\text{Cl})_2]^{2+/3+}$ à la place du RA. Pour cette espèce moléculaire rédox, l'addition de la DI améliore également le transfert d'électrons, car les densités de courant enregistrées pour la réduction de 1 mM de NAD^+ sont plus élevées en présence de cette enzyme (Fig. 87) que sans (Fig. 84 B). Un autre avantage observé en présence de la DI est le décalage des potentiels de réduction vers des valeurs positives. En effet, pour le RA on observe une évolution de +0.15 V et pour le complexe $[\text{Os(III)}(\text{N,N'}\text{-dimethyl-2,2'-biimidazole})_2(\text{Cl})_2]^{2+/3+}$ d'environ +0.2 V. Si on considère l'application du bioréacteur, il est important de favoriser la diminution des surpotentiels de réaction. En effet, cette

démarche permettra d'alimenter le dispositif avec des tensions moins élevées, ce qui assurera une économie d'énergie et une meilleure sélectivité.

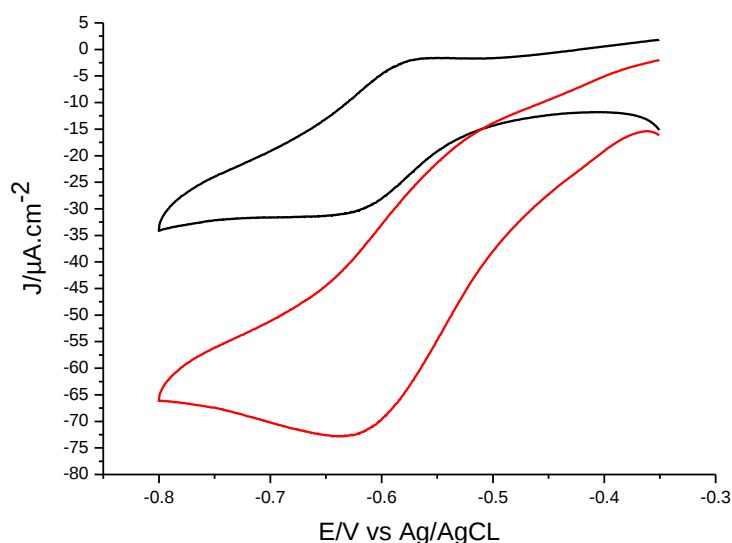


Figure 87 Voltammogrammes cycliques du complexe d'Os (noir), ajout de 1 mM NAD^+ et de 0.2 mg/mL DI (rouge). 20 mM tampon Phosphate pH=7 $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$.

Un des inconvénients majeurs de ces deux systèmes est que, à cause des domaines de potentiels où se situe leur potentiel standard, ils révèlent une forte sensibilité à l'oxygène. En effet, même si pour chaque mesure le milieu réactionnel est soigneusement dégazé à l'argon, les signaux catalytiques des deux médiateurs seuls révèlent déjà un phénomène de catalyse étant donné que ces cyclovoltammogrammes sont principalement inscrits pour des courants négatifs. De plus les signaux catalytiques enregistrés pour ce type de système bioélectrocatalytique présentent une reproductibilité et une stabilité limitée.

Lorsque le système catalytique est complété par l'ajout d'une déshydrogénase (DSDH, lactate déshydrogénase ou galactitol déshydrogénase) et du substrat à réduire correspondant (fructose, pyruvate, mandélate), les signaux enregistrés ne permettent pas de déterminer si la catalyse du substrat est opérationnelle. En effet, l'augmentation de la quantité de substrat en solution n'engendre pas une intensification du signal catalytique de réduction. Afin d'étudier une chaîne catalytique complète, son immobilisation, ainsi que l'optimisation de son activité, les parties suivantes seront dédiées à l'observation et l'étude de réactions d'oxydation et plus particulièrement de l'oxydation du D-sorbitol en fructose par la DSDH.

6.1.2 Oxydation catalysée du NADH

Contrairement à la réduction, l'oxydation du cofacteur NADH pose moins de difficultés dans le sens où il existe dans la littérature pléthore de médiateurs pouvant réaliser cette réaction à des potentiels variés. Nous avons choisi de travailler dans un premier temps avec le ferrocène diméthanol (Fc) car d'une part son potentiel standard permet de réduire le surpotentiel d'oxydation du NADH de 600 mV environ (Fig. 88 et 89) et d'autre part, sa charge neutre permet une diffusion relativement libre de cette entité au travers de la couche de silice [11].

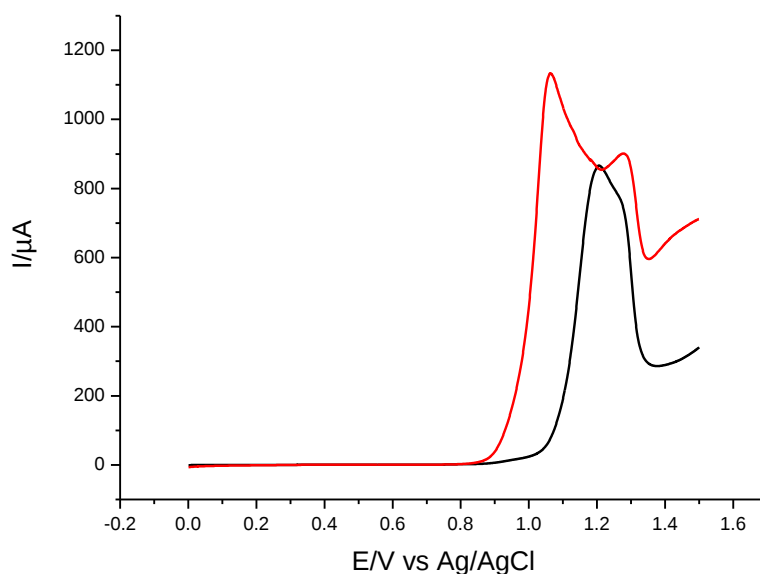


Figure 88 courbes intensité vs potentiel de l'oxydation de 1mM de NADH (rouge) sur une électrode d'or, voltammogramme de référence de l'or dans le tampon (noir). 100 mM tampon TRIS pH=9 $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$

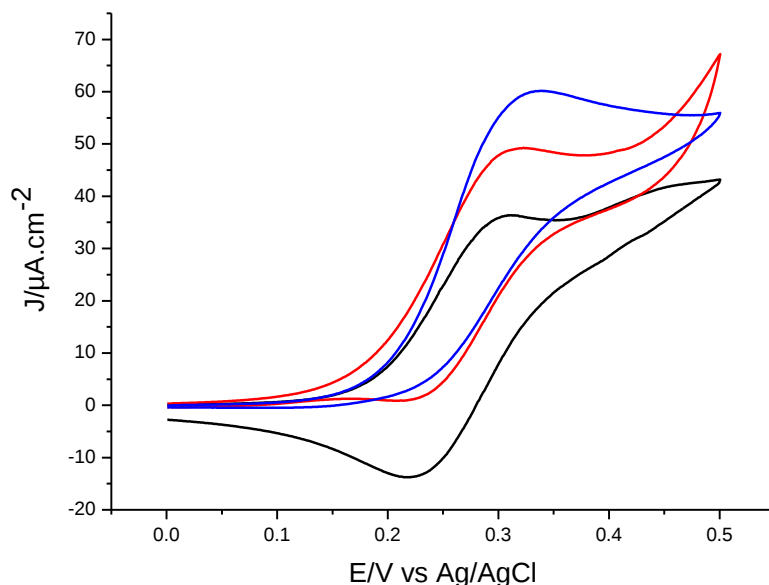


Figure 89 Voltammogrammes cycliques du Fc (noir), ajout de 1mM de NADH (rouge), ajout de 0.83 mg/mL de DI en solution (bleu). 100 mM TRIS pH=9, $v=10\text{ mV.s}^{-1}$.

La Figure 89 valide non seulement l'oxydation du NADH catalysée par le Fc mais aussi l'amélioration de l'intensité de cette catalyse grâce à l'ajout de la DI. En effet en présence de cette protéine rédox, la densité du courant d'oxydation s'avère être multipliée par un facteur de 1.25.

Dans la littérature, des systèmes bi-enzymatiques combinant l'action de la DI à l'activité d'une autre enzyme, telle que la lactate déshydrogénase [11] ou la formate déshydrogénase [20], ont démontré leur fonctionnement en solution. Dans les parties suivantes, nous allons chercher à faire fonctionner le système bi-enzymatique composé de la DI et de la DSDH. Ce système constitue donc la chaîne catalytique mise en place, étudiée et optimisée pour définir un modèle de dispositif électrocatalytique efficace pour le développement du bioréacteur. Pour pouvoir utiliser ce système dans le réacteur sous flux, il est nécessaire d'assurer l'immobilisation complète de celui-ci. Ainsi des voies de rétention des deux enzymes, du médiateur et du cofacteur doivent être définies afin de maintenir tout le matériel électrocatalytique à la surface de l'électrode de travail.

Les dépôts sol-gel électroassistés ont été utilisés comme méthode de bioencapsulation de la glucose oxydase [21,22]. Cette enzyme est connue pour pouvoir supporter des conditions difficiles lors de l'étape d'immobilisation [23], toutefois, la conservation de l'activité et de la stabilité d'autres enzymes telle que la DSDH reste à étudier, sachant que l'environnement résultant de l'immobilisation de l'enzyme peut conduire à sa désactivation. En effet, l'hydrolyse des groupes éthoxy présents sur le précurseur de silice utilisé, le TEOS, conduit à la production d'une quantité non-négligeable d'éthanol potentiellement nuisible pour la protéine rédox. Différentes stratégies ont été adoptées, comme le remplacement des éthoxy par des groupes méthoxy [24], ou l'addition d'additifs dans le film [25]. Par ailleurs, il est important de souligner qu'une stratégie universelle ne peut être suivie

pour toutes les enzymes étant donné qu'elles diffèrent en structure, en charge et présentent des sensibilités variables à leur environnement extérieur.

Les parties suivantes de ce chapitre sont donc consacrées à la réalisation d'une couche de silice électrogénérée pouvant encapsuler de façon efficace le système bi-enzymatique particulier constitué de la DI et de la DSDH.

6.2 Encapsulation d'un système bi-enzymatique dans une couche composite électrogénérée

Nous avons précédemment reporté la stratégie d'immobilisation de biomolécules simples, en prenant l'exemple de l'hémoglobine, dans un film mince de silice, formé à la surface de l'électrode de travail par un dépôt électro-assisté. Il s'agit à présent de déterminer en premier lieu si cette méthode peut s'appliquer à l'immobilisation commune des deux enzymes constituant le système électrocatalytique envisagé précédemment.

6.2.1 Immobilisation par une couche mixte silice/polyélectrolyte

D'après les travaux de nos collaborateurs, Wang *et al*, il a été démontré que l'activité de la DSDH immobilisée dans une couche électrogénérée de silice, était améliorée par l'ajout d'un polyélectrolyte dans la couche encapsulante de silice [26]. Les expériences qu'ils décrivent ont été réalisées sur des électrodes planes de carbone vitreux, et montrent que si la DSDH est maintenue dans une couche de silice pure, en présence de NADH et de D-sorbitol dissous en solution, alors aucun signal électrochimique n'est détectable. En revanche, si un polyélectrolyte positivement chargé est présent dans la matrice d'encapsulation, alors l'enzyme montre une réponse catalytique plus intense et plus rapide.

Ceci s'explique par la charge négative portée par la DSDH d'une part et par la couche de silice d'autre part, générant en conséquence des interactions répulsives entre les deux éléments. En effet, le pH du sol, utilisé pour l'encapsulation de l'enzyme, est compris entre 5 et 7. Dans ces conditions, le film de silice présente des charges négatives à sa surface à cause de la déprotonation des fonctions silanols (comme mentionné précédemment dans le chapitre 5, le point de charge nulle de la silice est reporté entre 2 et 3) [27]. Or le point isoélectrique de la DSDH se situe à 4,3, ce qui implique qu'elle soit elle aussi, dans ces conditions de pH, négativement chargée [28]. Ainsi afin de limiter des interactions non favorables entre la matrice de silice et la protéine, plusieurs polyélectrolytes chargés positivement ont été testés. Entre le poly(diméthylallylammonium chlorure)) (PDMA), le poly(allylamine) (PAA) et le poly(éthylène imine) (PEI), les meilleurs résultats semblent être obtenus en présence du PDMA. En

outre, le réseau interpénétré de silice et de PDDA fournit non seulement un environnement approprié à l'encapsulation de la DSDH, mais crée aussi une structure d'immobilisation plus ouverte sur le milieu réactionnel que celle de la silice pure, facilitant de ce fait l'accessibilité des espèces en solution à l'intérieur du film biocomposite. Les effets de l'ajout de ce polymère dans le film de silice, tels que la sensibilité de l'électrode obtenue ainsi que sa stabilité dans le temps ont été également discutés dans leurs travaux.

L'incorporation du polyélectrolyte cationique dans la couche de silice est donc une stratégie à adopter pour immobiliser efficacement le système électrocatalytique modèle destiné à opérer dans le réacteur. Il s'agit donc de tester cette méthode d'encapsulation pour le système bi-enzymatique, à la surface des électrodes d'or macroporeuses. Cette méthode devra permettre l'encapsulation d'une quantité suffisante de ces deux enzymes pour avoir une électrosynthèse de fructose satisfaisante. Le contrôle du recouvrement de la structure poreuse par la couche mixte silice/PDDA devra également être évalué. L'homogénéité du dépôt ainsi que le maintien d'une diffusion efficace des substrats dans celui-ci sont aussi à contrôler. Les premiers résultats présentés dans la partie suivante sont obtenus sur carbone vitreux, avant d'être transposés aux électrodes d'or macroporeuses. Les facteurs influençant la réponse de l'électrode ont été étudiés, ainsi que sa stabilité dans le temps.

6.2.2 Détails expérimentaux

La solution de D-sorbitol déshydrogénase (DSDH, 10 mg/mL, 100 Units/mg)) a été fournie par nos collaborateurs de Saarbrücken par une surproduction de la protéine marquée His(6) dans *Escherichia coli* BL21GOLD(DE3) et purifiée par la suite sur une colonne Histrap. Elle est fournie dissoute dans une solution de tampon TRIS 20 mM pH=7. La diaphorase est commercialement disponible et fournie sous forme lyophilisée (1020 Unit.mg⁻¹).

Avant toute utilisation, les électrodes de carbone vitreux sont polies, rincées et placées sous ultrasons quelques minutes afin d'éliminer toutes traces d'impureté à leur surface. Les électrodes macroporeuses, quant à elles, sont rincées à l'éthanol puis à l'eau et enfin séchées à l'air comprimé.

Les électrodes, de carbone vitreux ou d'or, sont recouvertes d'une couche de silice bio-composite préparée par électrogénération. Le sol est préparé à partir de TEOS, d'eau et d'HCl aqueux (0.01M), qui sont mélangés pendant 12 h afin de permettre à l'étape d'hydrolyse de se produire, puis dilué dans de l'eau distillée par un facteur 3. Ensuite la DSDH et le PDDA sont ajoutés au sol hydrolysé (pH3). Le mélange final est introduit dans la cellule électrochimique et le dépôt est opérée à -1,3 V pendant 60 s. Ensuite les électrodes sont rincées dans de l'eau distillée et conservées minimum 2 h au réfrigérateur à 4°C afin de préserver les enzymes et de permettre à la couche encapsulante de se désoxygéner. Avant chaque mesure, les électrodes sont rincées au tampon TRIS (100 mM pH=9).

6.2.3 Résultats et discussion

- **Expériences préliminaires d'optimisation de la composition du sol**

Afin d'établir la faisabilité d'un film de silice électrodéposé pour l'encapsulation de la DSDH et de la DI, nous avons collaboré avec le laboratoire LCPME de Nancy où a été réalisée une série de tests préliminaires sur des électrodes planes de carbone vitreux. Ces travaux d'optimisation succèdent à ceux présentés dans la partie 6.2.1 de ce chapitre, concernant le choix d'un additif incorporé dans la silice permettant d'améliorer l'activité de la DSDH. Les expériences suivantes ont tout d'abord confirmé l'activité de la DSDH, indépendamment de celle de la DI, lorsqu'elle est encapsulée dans un film de silice électrodéposé à -1,3 V à partir d'un sol hydrolysé pendant 60 s. Nos collaborateurs ont en effet pu enregistrer le signal catalytique produit par l'oxydation du D-sorbitol par de la DSDH immobilisée dans un film de silice/PDDA, lorsque le cofacteur est en solution. Dans ce cas le signal détecté est celui de l'oxydation électrochimique du NADH, directement détecté à la surface de l'électrode, qui est produit par la DSDH immobilisée, alors qu'elle oxyde le D-sorbitol. L'augmentation de ce signal avec l'ajout de D-sorbitol confirme qu'il s'agit bien du phénomène catalytique recherché. Des expériences de contrôle ont permis de confirmer ces résultats : l'ajout de D-sorbitol sur une électrode modifiée par de la silice sans DSDH et en présence de NAD⁺ ne génère aucun signal, pas plus que l'ajout du même substrat sur une électrode en présence du sol non polycondensé contenant la DSDH et du NAD⁺.

L'optimisation de la réponse de l'électrode à l'ajout de D-sorbitol nécessite une amélioration de la composition du sol. Ainsi, les concentrations en DSDH, en PDDA, et en TEOS ont été étudiées et leur influence sur la réponse électrochimique du film biocomposite a été évaluée.

D'après la Figure 90 A, il apparaît que la quantité de protéine introduite dans le sol influence fortement la réponse de l'électrode à l'ajout de 6 mM de D-sorbitol : pour des concentrations allant de 0,3 à 2,5 mg.cm⁻³, la réponse s'intensifie avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Passé 3,3 mg.cm⁻³, l'intensité se stabilise. Des concentrations plus importantes en protéines ont tendance à entraîner une gélification rapide du sol (à cause de la protéine ou du tampon de sa suspension). La concentration en PDDA impacte également l'intensité de la catalyse enregistrée (Fig.90 B). Pour des concentrations comprises entre 0 et 1,8 %_{solide}, aucun signal n'est enregistré, en revanche à partir de cette concentration et jusqu'à 6,7 %_{solide}, la réponse électrochimique enregistrée augmente avec la concentration en polyélectrolyte. Des concentrations en PDDA supérieures à 6,7 %_{solide}, déstabilisent les sols dans lesquels elles sont incorporées, car, encore une fois, ceci entraîne une gélification du sol avant l'application du potentiel d'hydrolyse de l'eau.

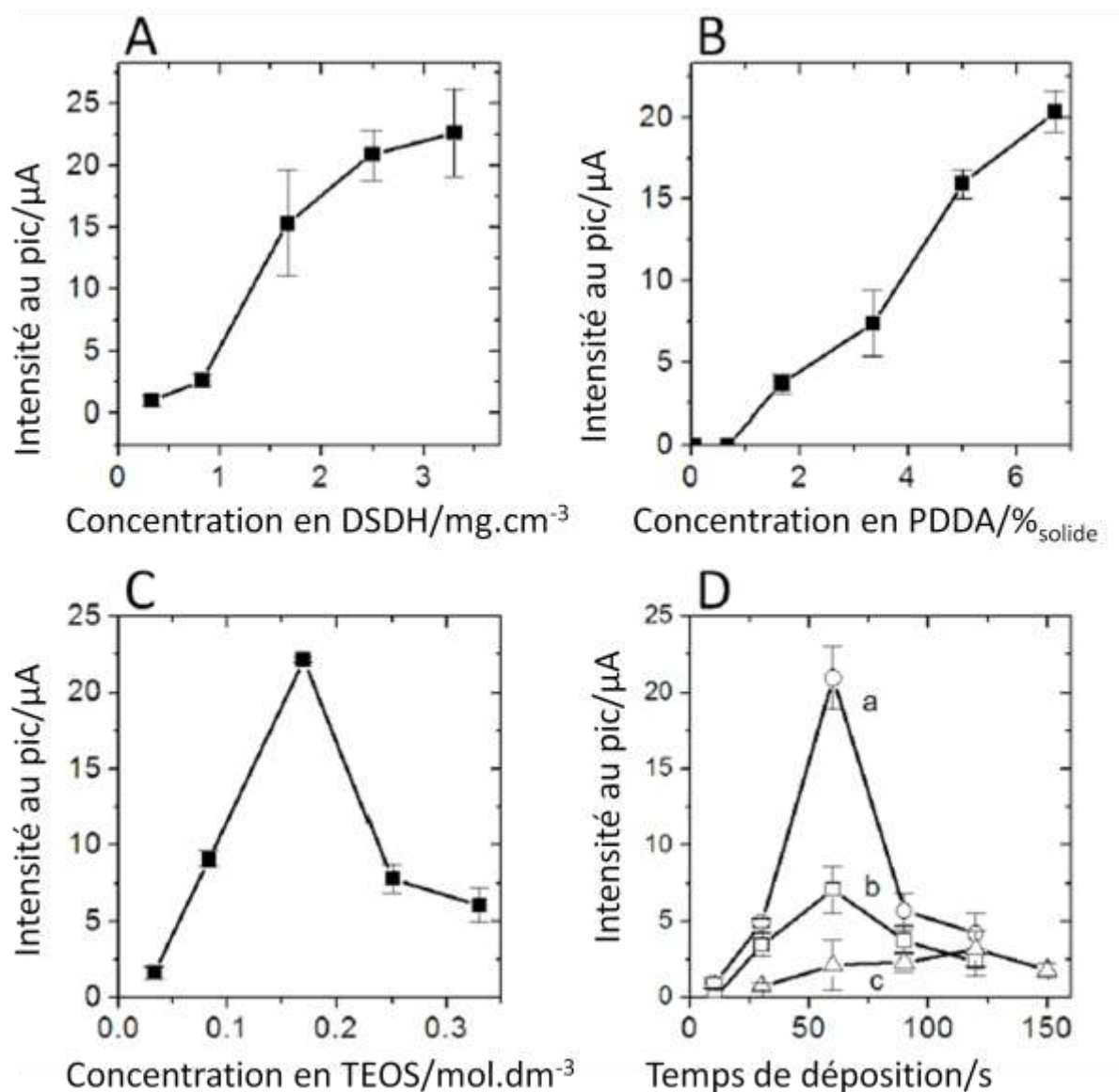


Figure 90 Influence de la concentration en DSDH (A), en PDPA (B), en TEOS (C), et du temps de dépôt du film de silice (D) sur l'intensité du pic de courant d'oxydation enregistrée sur les cyclovoltammogrammes et prélevée à (0.3 V vs Ag/AgCl) obtenus à partir des électrodes de carbone vitreux modifiées par le film biocomposite de silice contenant de la DSDH. L'électrodépôt du film a été effectué à -1,3 V pendant 60 s, (A) à partir d'un sol de 0,17 M de TEOS, 6,7 %_{solide} de PDPA, et des concentrations de DSDH allant de 0,33 à 3,3 mg.cm⁻³, (B) à partir d'un sol contenant 0,17 M de TEOS, 3,3 mg.cm⁻³ de DSDH, et des pourcentages massiques de PDPA allant de 0 à 6,7 %_{solide}, (C) à partir d'un sol de 3,3 mg.cm⁻³ de DSDH, de 6,7 %_{solide} de PDPA et de différentes concentrations en TEOS. (D) L'électrodépôt du film a été effectué pour différents temps de dépôt à -1,3 V, à partir d'un sol de silice à 0,17 M de TEOS, 3,3 mg.cm⁻³ de DSDH et différents pourcentages solides de PDPA. 1 mM NAD⁺, 6 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS buffer, pH=9, $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$ [29].

L'influence de la concentration en TEOS suit une tendance différente, puisque l'on observe que de 0 à 0,17 M de TEOS, le courant augmente, puis, passé cette concentration, il diminue (Fig. 90 C). Pour des concentrations trop faibles en TEOS, le taux de dépôt n'est pas assez élevé pour produire des films encapsulant suffisamment de DSDH. D'un autre côté, des concentrations trop importantes peuvent conduire à des films de silice trop denses, qui ne permettent pas, par la suite, un transport de matière optimal. Le temps d'électrogénération du film est aussi un paramètre important de la

déposition. La Figure 90 D montre l'effet de l'influence du temps de dépôt sur l'intensité du pic d'oxydation pour différents sols contenant (a) 1, 67, (b) 3,35 et (c) 6,7 %_{solide} de PDDA. Pour des concentrations élevées en électrolyte, les temps de dépôt optimaux se situent vers 60 s (courbe a et b). Pour la concentration plus faible (courbe c), le temps optimal est relevé à 120 s. On suppose que plus le temps d'électrogénération du film est important et plus la quantité de protéine immobilisée est importante, ce qui se traduit par l'augmentation du signal catalytique avec l'augmentation de l'épaisseur du film. Toutefois dans un deuxième temps, à partir d'une épaisseur critique obtenue pour un temps de dépôt d'environ 60 s l'intensité du signal va décroître. Ce phénomène s'explique par l'épaisseur trop importante de la couche de silice, qui ne permet pas d'établir un transport de matière optimal.

- **Comparaison de l'activité de l'enzyme dans un film et en solution**

La figure suivante permet d'évaluer les variations de la réponse électrochimique d'une électrode modifiée par un film de silice contenant de la DSDH, en fonction de la quantité de D-sorbitol ajoutée. Les mesures ont été effectuées pendant une heure, durée pendant laquelle la réponse électrochimique de l'électrode est stable. On observe que l'intensité du pic d'oxydation du substrat augmente avec la concentration de ce dernier, jusqu'à une concentration de 10 mM à partir de laquelle le courant se stabilise. A partir de cette courbe peut être déterminée une constante de Michaelis-Menten apparente K_m' , car l'enzyme n'est pas présente dans ce cas en solution. K_m' atteint une valeur de 3 mM, plus faible que celle reportée pour le même système lorsqu'il est placé en solution ($K_m = 6,5$ mM) [5]. Il peut ainsi être conclu que l'immobilisation de la DSDH dans le film de silice optimisé permet non seulement le maintien de l'activité de celle-ci mais apporte aussi une légère amélioration de son fonctionnement grâce au maintien d'un environnement favorable qu'il procure.

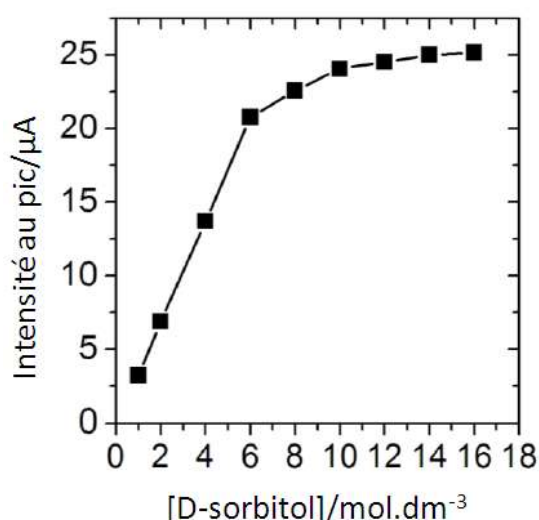


Figure 91 Intensité du pic de courant de réponse des cyclovoltammogrammes (prélevé à 0.3 V vs Ag/AgCl) en fonction de la concentration de D-sorbitol ajoutée pour des électrodes de carbone vitreux modifiées par des films de silice contenant de la DSDH. La silice est obtenue à partir d'un sol de 0,17 M de TEOS, 6,7 %_{solide} de PDDA électrodéposé à -1,3 V pendant 60 sec. 1 mM NAD⁺, 100 mM TRIS pH=9. $v=50$ mV.s⁻¹ [29].

D'après la littérature, le pH influence l'activité de la DSDH, comme pour la majorité des enzymes [5]. La figure suivante montre l'influence de la réponse électrochimique au D-sorbitol d'une électrode modifiée avec le film biocomposite de silice contenant la DSDH. Il apparaît que l'activité de cette enzyme envers l'oxydation du substrat semble optimale à un pH de 9. Ces résultats sont très similaires de ceux obtenus lorsque la DSDH est en solution, ce qui souligne une nouvelle fois, que l'encapsulation de cette enzyme dans le film de silice/PDDA ne modifie pas son fonctionnement.

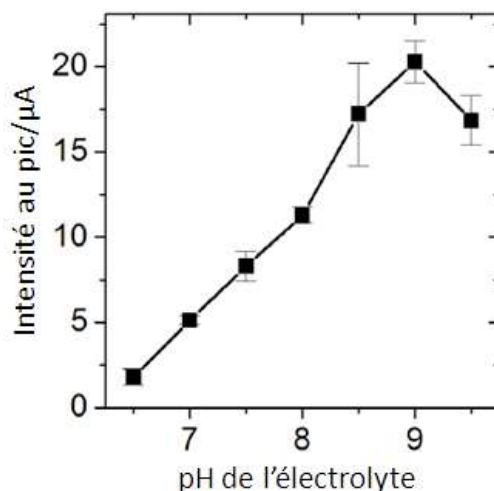


Figure 92 Evolution de l'intensité du pic de courant d'oxydation du D-sorbitol (mesurée à 0.3 V vs Ag/AgCl) en fonction de pH du milieu réactionnel. La silice est obtenue à partir d'un sol de 3,3 mg/mL de DSDH, de 0,17 M de TEOS, 6,7 %_{solide} de PDDA électrodéposé à -1,3 V pendant 60 sec. 6 mM D-sorbitol, 1 mM NAD⁺, 100mM TRIS. $v=50 \text{ mV.s}^{-1}$ [29].

• Perméabilité du film au médiateur choisi

L'emploi du médiateur Fc permet de réduire le surpotentiel d'oxydation du NADH. Il s'agit à présent de vérifier que celui-ci puisse communiquer avec les espèces biocatalytiques immobilisées dans le film de silice, c'est pourquoi la perméabilité de la couche mixte silice/PDDA à cette espèce moléculaire rédox est testée et reportée dans la Figure 93. On observe que pour des films de silice minces, électrogénérés pendant des temps courts (10, 30, 60 s), le signal électrochimique du médiateur se révèle avec la présence du pic d'oxydation à 0.32 V et celui de réduction à 0.22 V, ce qui n'est pas le cas pour le film électrogénéré pendant 120 s. Par ailleurs, plus le film devient épais et plus celui génère un signal de « background » important, produisant une augmentation de courant à partir de 0.35 V environ et susceptible de noyer le signal électrochimique du médiateur. L'allure de la courbe obtenue à partir de l'électrode recouverte de la couche électrogénérée pendant 120 s montre une faible intensité du signal de « background » mesurée ce qui suggère que ce dépôt, trop épais, isole la surface du substrat. D'après ces mesures, on peut conclure que des temps d'électrogénération compris entre 10 et 60 s permettront de générer des couches de silices ayant des perméabilités suffisantes pour que le médiateur puisse diffuser jusqu'à la surface d'électrode.

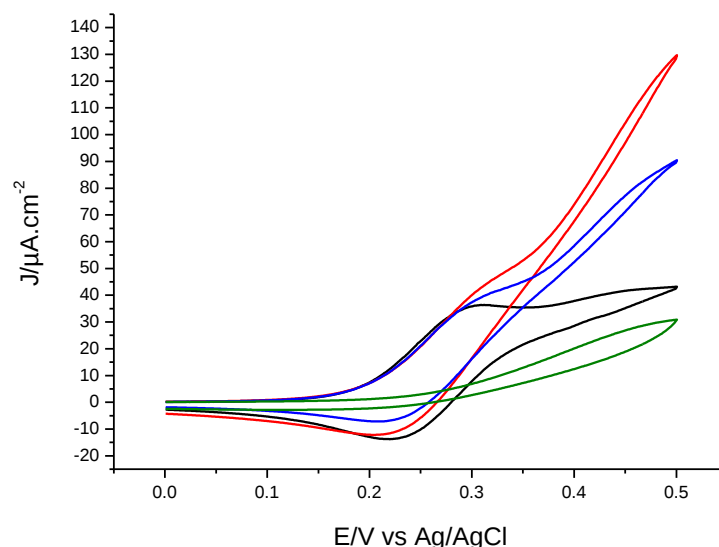


Figure 93 Voltammogrammes cycliques de solutions de 0.3 mM de Fc (dilués dans une solution de 0.1 M TRIS pH=9) sur une électrode d'or recouverte d'une couche mince de silice électrogénérée pendant 10 s (noir), 30 s (bleu), 60 s (rouge) et 120 s (vert) à partir de sol de 0.5 mM de TEOS. $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

- **Co-immobilisation de la DSDH et de la DI**

Comme l'insertion de la DI dans la chaîne électrocatalytique permet d'améliorer le transfert d'électron entre médiateur et cofacteur, sa co-immobilisation avec la DSDH dans la couche de silice doit être effectuée.

Dans un premier temps, l'activité de la DI est étudiée, indépendamment de celle de la DSDH. La figure suivante montre la réponse électrocatalytique d'un film de silice/PDDA, contenant de la DI uniquement, suite à l'addition de NADH, le médiateur Fc étant en solution. En l'absence du cofacteur, seul le signal réversible du Fc est observable. Par la suite l'addition de 1 mM NADH induit une forte modification de la réponse électrochimique : en effet, le courant anodique augmente d'un facteur 2 alors que le courant cathodique disparaît. L'expérience a été conduite à pH 9, condition optimale pour que la DSDH puisse catalyser une oxydation. D'après les résultats présentés ci-dessous, ces conditions expérimentales se révèlent également favorables à l'activité catalytique de la DI envers l'oxydation du cofacteur.

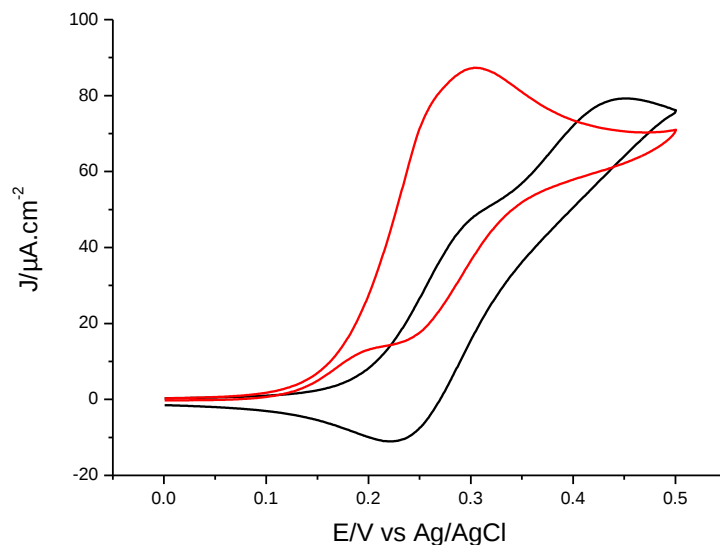


Figure 94 Voltammogrammes cycliques montrant la réponse à l'addition de 1 mM de NADH d'un film de silice contenant la DI (rouge), par rapport au signal de référence du Fc (noir). 100 mM TRIS pH=9. $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$

Ensuite, la co-immobilisation des deux enzymes a été testée. Le protocole pour l'élaboration du film d'encapsulation est relativement simple : les deux protéines sont mélangées ensemble dans le sol hydrolysé et sont simultanément immobilisées dans le film lors de l'étape d'électrogénération. Les nouvelles proportions des différents composants du sol sont les suivantes : 0,17 M TEOS, 5 %_{solide} PDDA, 5 mg/mL DSDH, et 0,83 mg/mL DI. La concentration en PDDA est diminuée pour limiter la gélification du sol avant l'électrodépôt. En revanche celle de la DSDH est augmentée pour rééquilibrer la déstabilisation induite par la diminution de la quantité de PDDA dans l'environnement de l'enzyme. La figure suivante présente la réponse électrochimique du film composite bi-enzymatique suite à l'addition de D-sorbitol en solution. Dans cette expérience il est important de noter que le cofacteur oxydée NAD^+ est également libre en solution. L'oxydation du D-sorbitol entraîne la production de NADH à l'intérieur du film. Celui-ci réagit avec la diaphorase et le Fc régénéré électrochimiquement pour produire le NAD^+ . En outre cette figure montre que la co-immobilisation de la DSDH et de la DI n'altère pas l'activité de ces deux enzymes. Le cofacteur NADH peut diffuser d'un centre actif à l'autre et permettre de cette façon une bio-électrocatalyse efficace. Par ailleurs, la forme de la courbe de catalyse indique que ce système est soumis à des limitations de type diffusionnelles. En effet, la diminution de l'intensité du courant passé le potentiel d'oxydation du médiateur (0.35 V), souligne que le médiateur n'arrive pas suffisamment vite à l'électrode. Il est fort probable que ce phénomène soit dû à la couche de silice/ PDDA au travers de laquelle le substrat, le cofacteur et le médiateur doivent diffuser afin de pouvoir participer au phénomène de catalyse. Pour conclure, ces expériences démontrent que les films minces de silice s'avèrent être des voies d'encapsulation efficaces, même pour des systèmes enzymatiques complexes.

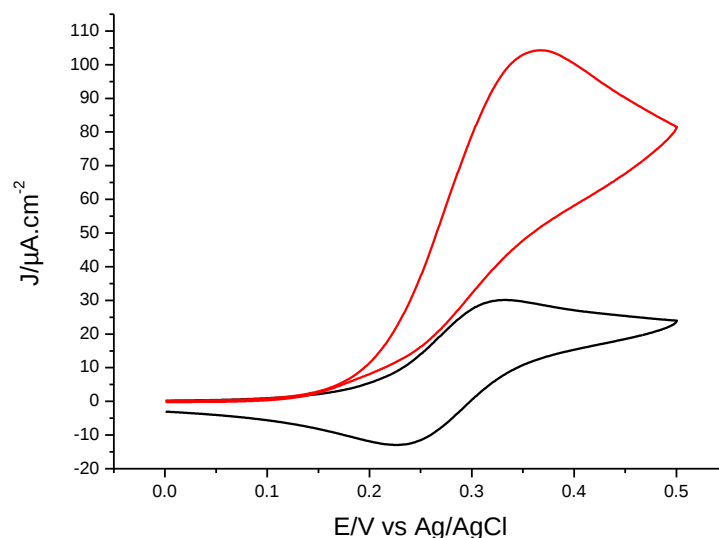


Figure 95 Voltammogrammes cycliques obtenus pour l'oxydation de 8mM de D-sorbitol par le système bi-enzymatique DSDH/DI encapsulé dans une couche de silice/PDDA (rouge), signal de référence du médiateur Fc (noir). 100 mM TRIS pH=9, $v=10\text{mV.s}^{-1}$.

- **Encapsulation du système bi-enzymatique dans les électrodes macroporeuses**

Comme mis en valeur précédemment dans le chapitre 5, l'intérêt de déposer les couches minces de silice par électrodéposition permet de recouvrir de façon homogène l'intérieur des pores que présentent les électrodes macroporeuses élaborées pour le réacteur, sans en boucher les interconnexions. Ceci permet en outre d'augmenter la réponse électrochimique par rapport à celle obtenue sur des électrodes planes. La nouvelle composition optimale du film de silice bio-composite (0,17 M TEOS, 5 %_{solide} PDDA, 5 mg/mL de DSDH, 0.83 mg/mL) contenant les deux enzymes doit être testée dans les électrodes poreuses d'or afin de valider dans ces nouvelles conditions, le concept d'amélioration du signal lorsque l'on passe d'une interface, entre électrode et milieu extérieur, bidimensionnelle à une interface tridimensionnelle.

Les Figures 96 A et B présentent les résultats obtenus lorsque le système bioélectrocatalytique est encapsulé sur la structure d'électrodes poreuses de 1 et 5/2 couches de pores de 600 nm, par le procédé d'électrogénération instauré par l'application de -1,3 V pendant 60 s. On rappelle que l'activité bioélectrocatalytique est produite par le système bi-enzymatique composé de la DSDH et de la DI, le cofacteur NAD^+ et le Fc étant libres en solution. L'ajout de D-sorbitol dans le milieu réactionnel entraîne la réponse catalytique du système, typique de l'oxydation du substrat : le pic anodique du signal électrochimique du médiateur augmente avec l'ajout du D-sorbitol, alors que le pic cathodique disparaît. Toutefois, même si les deux électrodes possèdent des épaisseurs différentes et donc des aires de surfaces actives distinctes, l'intensité du signal enregistrée est la même pour les deux électrodes. Le phénomène de saturation observé sur l'électrode de 5/2 couches

peut avoir plusieurs explications. Tout d'abord le fait que l'intensité enregistrée pour une électrode de 1 et 5 demi couches soit la même indique que le dépôt ne s'est produit pour l'électrode de 5/2 couches que sur la couche supérieure de celle-ci. Le sol de silice contenant le PDDA et les enzymes possède en effet une viscosité supérieure à celle d'un sol contenant seulement les précurseurs de silice, et ceci en particulier à cause de l'ajout du polyélectrolyte, qui présente à lui seul une viscosité très élevée. Cette caractéristique du nouveau sol peut l'empêcher de pénétrer dans l'intégralité de la structure de l'électrode macroporeuse.

Les courbes de la Figure 96 B dévoilent l'apparition d'un pic vers 0.15 V. D'après la littérature, leur présence peut être attribuée à une concentration en NADH trop faible à proximité de la DI, pour que sa consommation ne soit pas négligeable. Dans ces conditions, la cinétique de réaction est contrôlée par le transport du cofacteur [³⁰]. L'augmentation de la concentration de NAD⁺ en solution n'entraînant pas la disparition de ce pic, on en déduit que les limitations diffusionnelles dues à la matrice d'immobilisation des enzymes sont responsables de ce phénomène.

Afin de faciliter la pénétration du sol de silice/PDDA contenant les deux enzymes, des électrodes présentant des tailles de pores deux fois supérieures aux précédentes ont été testées. Ceci permet en l'occurrence de multiplier par deux la taille des interconnexions, qui passent de 60 nm à 120 (Fig. 96 C). La comparaison des résultats obtenus pour deux électrodes de 5/2 couches de 600 et 1200 nm montre que le signal enregistré est plus intense pour l'électrode présentant la plus grande taille de pores. Comme il s'avère qu'à nombre de couche comparable, les électrodes présentent la même augmentation de l'intensité de leur signal, on en déduit que l'intensité du signal est plus élevée pour l'électrode de pores de 1200 nm car le dépôt de silice a pu pénétrer dans au moins une partie des couches inférieures. Toutefois comme l'ajout de D-sorbitol révèle un signal qui sature en intensité dès une concentration en D-sorbitol de 1 mM (comparé à 4 mM lorsque la catalyse est effectuée sur une électrode d'une demi-couche), on en conclut que le système doit subir de plus amples optimisations. Même si les expériences précédentes réalisées sur des électrodes planes ont montré que nous travaillons suivant la concentration optimale de PDDA, on a cherché à établir s'il pouvait exister un compromis entre un sol moins concentré en polyélectrolyte et par là même moins visqueux, mais pouvant éventuellement mieux pénétrer dans la structure poreuse afin de fournir des signaux électrochimiques plus intenses. Malheureusement les résultats ont montré que toute diminution de la quantité de PDDA résultait en des catalyses d'intensité plus faible (Fig.96 C).

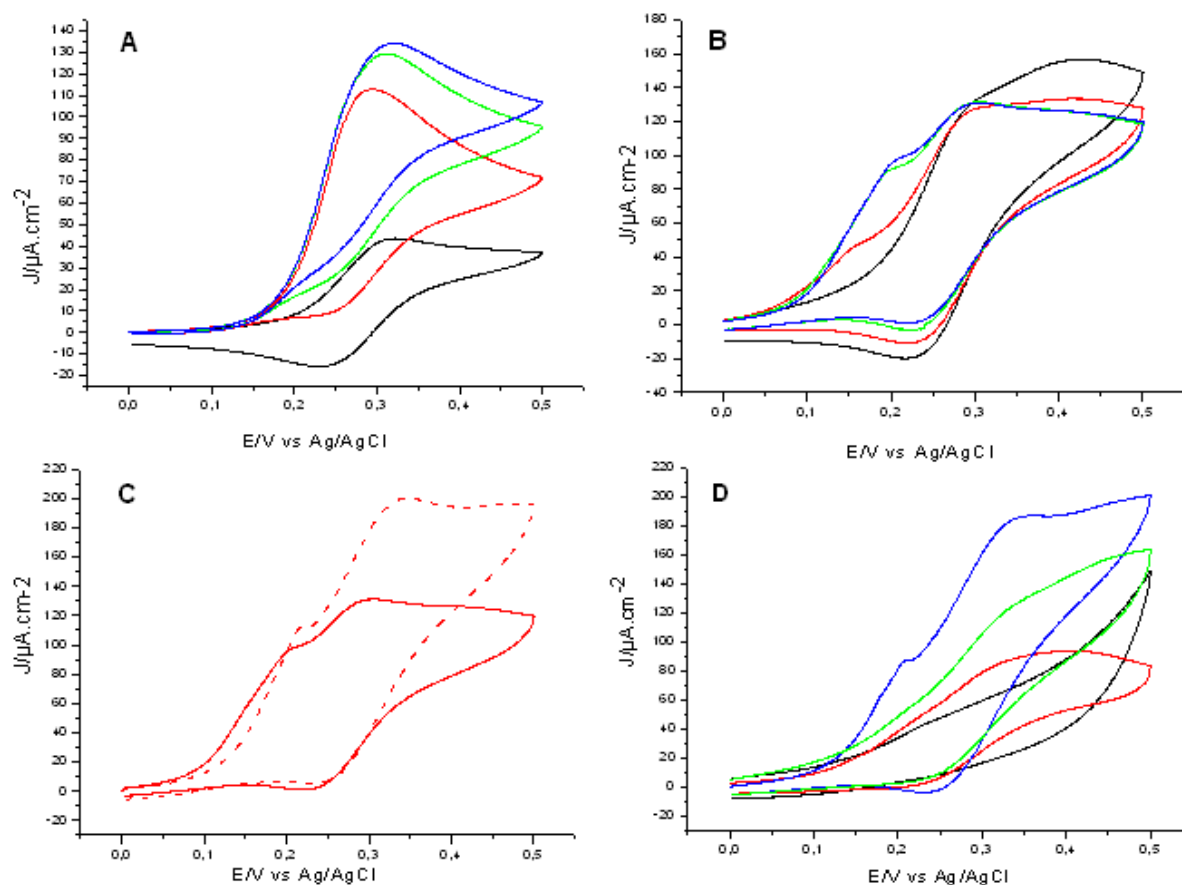


Figure 96 Voltammogrammes cycliques sur électrodes macroporeuses (A : 1/2 couche de pore de 600 nm, B : 5/2 couches de pores de 600 nm) de l'oxydation du D-sorbitol par le système DSDH/DI : signal rédox du Fc (Noir), ajout de 1 mM D-sorbitol (rouge), de 2 mM D-sorbitol (Vert) et de 3 mM D-sorbitol (bleu) . (C) ajout de 1 mM D-sorbitol sur une électrode de 5/2 couches de pores de 600nm (trait plein) et de 1200 nm (trait pointillé), (D) ajout de 1 mM D-sorbitol sur une électrode de 5/2 couches de pores de 1200 nm, dont les couches de silice contiennent 5 %_{solide} de PDPA (bleu), 3.73 %_{solide} (vert), 2.5 %_{solide} (rouge), 0 %_{solide} (noir). 1 mM NAD⁺, 0,3 mM Fc, 100 mM TRIs pH=9 v=10 mV.s⁻¹

Une autre hypothèse est que le temps d'électrogénération est trop important, ce qui entraîne des couches de silice/PDPA trop épaisses, empêchant de cette manière une diffusion efficace des différentes espèces, à savoir le Fc, le NAD⁺ et le D-sorbitol. L'impact du temps d'électrogénération sur la réponse électrochimique d'une électrode de 5/2 couches, modifiée par le film de silice biocomposite, à l'ajout de D-sorbitol a donc été examiné et les résultats sont présentés dans la Figure 97 A) :

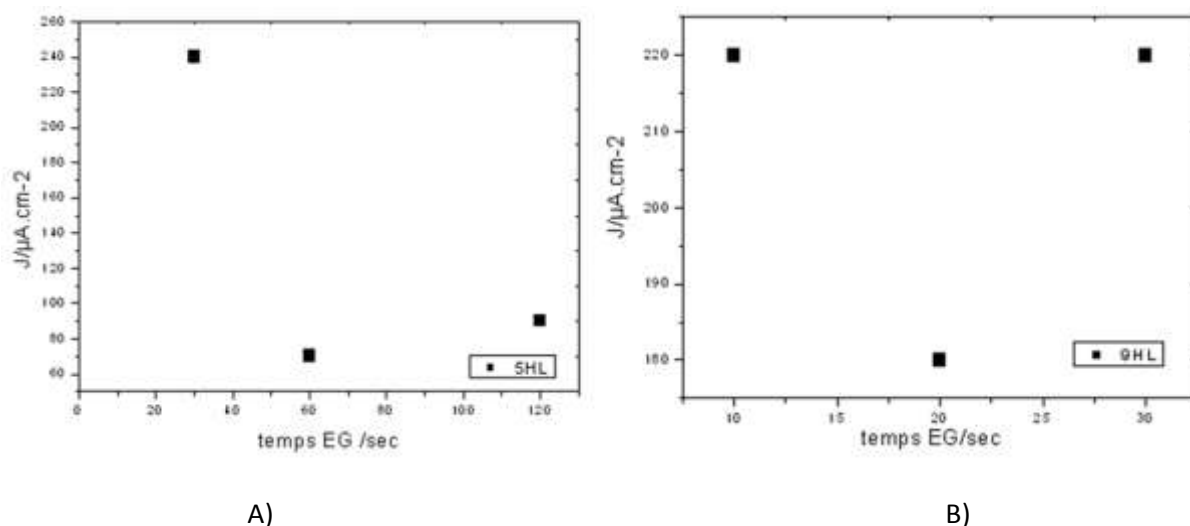


Figure 97 Densités de courant relevées au niveau des pics d'oxydation à 0.27 V obtenus avec le système DSDH/DI encapsulé dans une couche de silice/PDDA déposée par électrogénération (EG) sur une électrode de 5/2 (A) et de 9/2 (B) couches de pore de 1200 nm pour différents temps d'EG. 3 mM D-sorbitol, 1 mM NAD^+ , 0,1 mM Fc, 100 mM TRIS pH=9 $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$.

Dans nos précédents travaux décrits dans le chapitre 5, le temps optimal de dépôt du film de silice pure contenant de l'Hb dans des électrodes macroporeuses a été déterminé aux alentours de 20-30 s. Dans ces conditions, les résultats montraient que ce temps était approprié dans la mesure où il permettait de produire un recouvrement homogène de l'intérieur des différentes couches de pores. Malgré la nouvelle composition du sol, qui contient à présent non seulement la silice mais aussi le polyelectrolyte et les deux protéines rédox, des résultats relativement similaires sont mesurés. En effet, pour l'électrode de 5/2 couches, les meilleures intensités de catalyse sont obtenues pour un temps d'électrodépôt de 30 s. Des temps d'électrodépôt plus faibles ont été testés pour une électrode plus épaisse, de 9/2 couches, car ce substrat est susceptible d'être plus sensible aux variations de procédure. Toutefois les résultats présentés dans la Figure 97 B ne démontrent pas de tendance précise. L'explication proposée est que pour des temps d'électrogénération trop faibles, la couche encapsulante de Silice/PDDA est trop fine et par conséquent sa reproductibilité devient difficile. Pour conclure, on estime qu'un temps d'électrogénération satisfaisant pour former la couche mince bio-composite se situe à 20 s environ. La figure ci-dessous compare le signal électrochimique obtenu en présence de 1 mM de D-sorbitol pour une électrode plane et une électrode de 9/2 couches. Même si une augmentation du signal électrocatalytique est constatée avec l'augmentation de l'aire de la surface active, celle-ci n'est « que » d'un facteur 1,58. Ceci révèle que les éléments libres (non immobilisés) du système sont probablement encore en butte à des problèmes de diffusion.

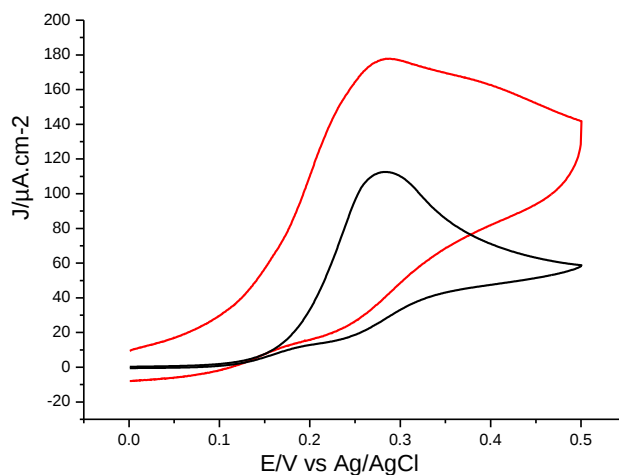


Figure 98 Comparaison des voltammogrammes cyclique obtenus pour l'oxydation de 1 mM de D-sorbitol par le système bi-enzymatique DSDH/DI encapsulé dans une couche de silice/PDDA électrogénérée pendant 20 s à -1,3 V pour une électrode plane (noire) et une électrode de 9/2 couches de pores de 1200 nm (rouge). 1 mM NAD^+ , 100 mM TRIS pH=9 $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

• Conclusion

Dans cette partie, il a été démontré que la DSDH, qui est une enzyme fortement sensible à son environnement, peut être encapsulée dans une couche de silice formée par voie sol-gel. Cette méthode, qui a été optimisée en partie par l'ajout d'un polyélectrolyte cationique, est relativement simple et permet également la co-encapsulation d'une deuxième enzyme, la DI, qui, en présence du Fc assure la régénération du NAD^+ . L'association de ces deux enzymes permet l'oxydation du D-sorbitol en fructose, phénomène dont l'intensité traduit des taux de conversion satisfaisants.

La faible augmentation du signal entre une électrode plane et une électrode de 9/2 couches donne à penser que des améliorations en termes de diffusion des espèces en jeu doivent être abordées. La partie suivante s'intéresse plus particulièrement à remédier au problème diffusionnel rencontré par le médiateur.

6.3 Immobilisation du médiateur

Les efforts de recherche pour réduire le surpotentiel d'oxydation du NADH visent principalement à développer des biocapteurs robustes et sélectifs [3,31]. Les nombreuses publications traitant de ce sujet proposent divers médiateurs permettant d'obtenir de tels résultats. Les travaux de Mano *et al* [32-34] ont étudié la famille des nitrofluorénones en tant que médiateur de l'oxydation du cofacteur NADH et ont permis de développer des médiateurs très performants en terme de stabilité, de cinétique, de constante de transfert de charge, ainsi que de réduction du surpotentiel. Dans cette

étude nous utiliserons le 4-carboxy-(2,5,7-trinitro-9-fluorenylidene)-malonitrile (CTNFM), qui appartient à cette famille (Fig. 99) :

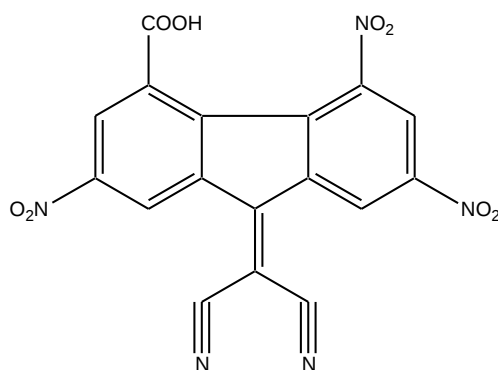


Figure 99 Structure moléculaire du 4-carboxy-(2,5,7-trinitro-9-fluorenylidene)-malonitrile (CTNFM)

La particularité de ce médiateur réside dans la présence de deux groupements nitrile qui offrent à la molécule la possibilité de s'adsorber sur des surfaces d'or, permettant de cette manière de travailler avec des médiateurs immobilisés en une monocouche auto-assemblée. Dans le cadre de nos recherches, ceci constitue une alternative aux médiateurs en solution. L'immobilisation du médiateur à la surface de l'électrode permettra de s'affranchir d'une étape supplémentaire de purification du flux sortant du réacteur et contenant le produit.

6.3.1 Procédure expérimentale de modification de surface et processus électrochimique

Avant utilisation, les électrodes d'or sont placées dans des solutions de piranha puis rincées à l'eau. Ensuite elles sont immergées dans des solutions de CTNFM mis en solution dans du THF (5 mM) pendant une période de 12 à 24 h, afin de laisser au médiateur le temps de s'adsorber à la surface de l'électrode. Les électrodes sont ensuite rincées à l'eau distillée afin d'éliminer le solvant ainsi que le surplus de médiateur non adsorbé.

La molécule de CTNFM nécessite une étape d'activation pour être dans sa forme électrocatalytique active : en effet les groupements nitro doivent être convertis en groupement nitroso par une réduction électrochimique. Il s'agit d'une activation en deux étapes qui peut être effectuée par voltammétrie cyclique. L'électrode modifiée est immergée dans une solution tampon, et suivant le choix de la borne négative du balayage de potentiel, un, deux ou trois des groupements peuvent être réduits en hydroxylamine puis convertis en groupement nitroso. Sur le cyclovoltammogramme présenté dans la Figure 100 A on repère les potentiels de réduction des trois groupements nitro à -0,38 V, -0,536 V et -0,762 V. L'équation de cette première réaction rédox pour un groupement nitro est présentée ci-dessous :



La transformation de ces groupements hydroxylamine en groupements nitroso se produit sur le balayage de retour sur un domaine de potentiel allant de -0,2 à 0,2 V. A la suite de cette étape, les groupements ont alors acquis leur forme finale qui permet à la molécule de fournir un signal rédox réversible suivant l'équilibre présenté ci-dessous :



Les couples rédox nitroso/hydroxylamine adsorbés à la surface de l'électrode engendrent individuellement des processus de réduction et d'oxydation à deux électrons et deux protons (voir équation précédente). Ces processus sont particulièrement bien adaptés dans l'électrooxydation du NADH dont l'équilibre est décrit dans l'équation suivante, car ce dernier met également en jeu un transfert à deux électrons.



Le CTNFM est un médiateur de choix pour l'électrooxydation du NADH et cette oxydation est provoquée à un potentiel quasiment nul, diminué d'environ 900 mV par rapport à une électrode non modifiée, (voir Fig. 88).

Les voltammogrammes cycliques B, D et F de la Figure 100 représentent les signaux rédox caractéristiques du CTNFM lorsqu'il a été activé. Bien que ces courbes ne permettent pas une observation nette de la réversibilité des couple redox ArNHOH/ArNO, la présence de pics de faible intensité à -0.15 V et 0.05 V peut être imputée à des groupements nitro du médiateur étant donné qu'il sera observé par la suite une augmentation de celles-ci en présence du NAD⁺.

Comme les trois potentiels de réduction des trois groupements nitro de la molécule sont suffisamment éloignés les uns des autres, il est possible d'activer un, deux ou trois suivant l'échelle de potentiel balayée. Suivant le nombre de groupes nitro activés, les courbes ne présentent pas la même allure. En effet, on constate que si deux ou trois groupes nitro sont transformés, alors le CV de caractérisation relatif à l'équation 2 montre le deuxième pic d'oxydation aux alentours de 0,05 V. Par la suite, les mesures des phénomènes de catalyse confirmeront que la bosse présente à -0.15 V est émise à partir du groupement nitro majoritairement actif dans l'oxydation du cofacteur.

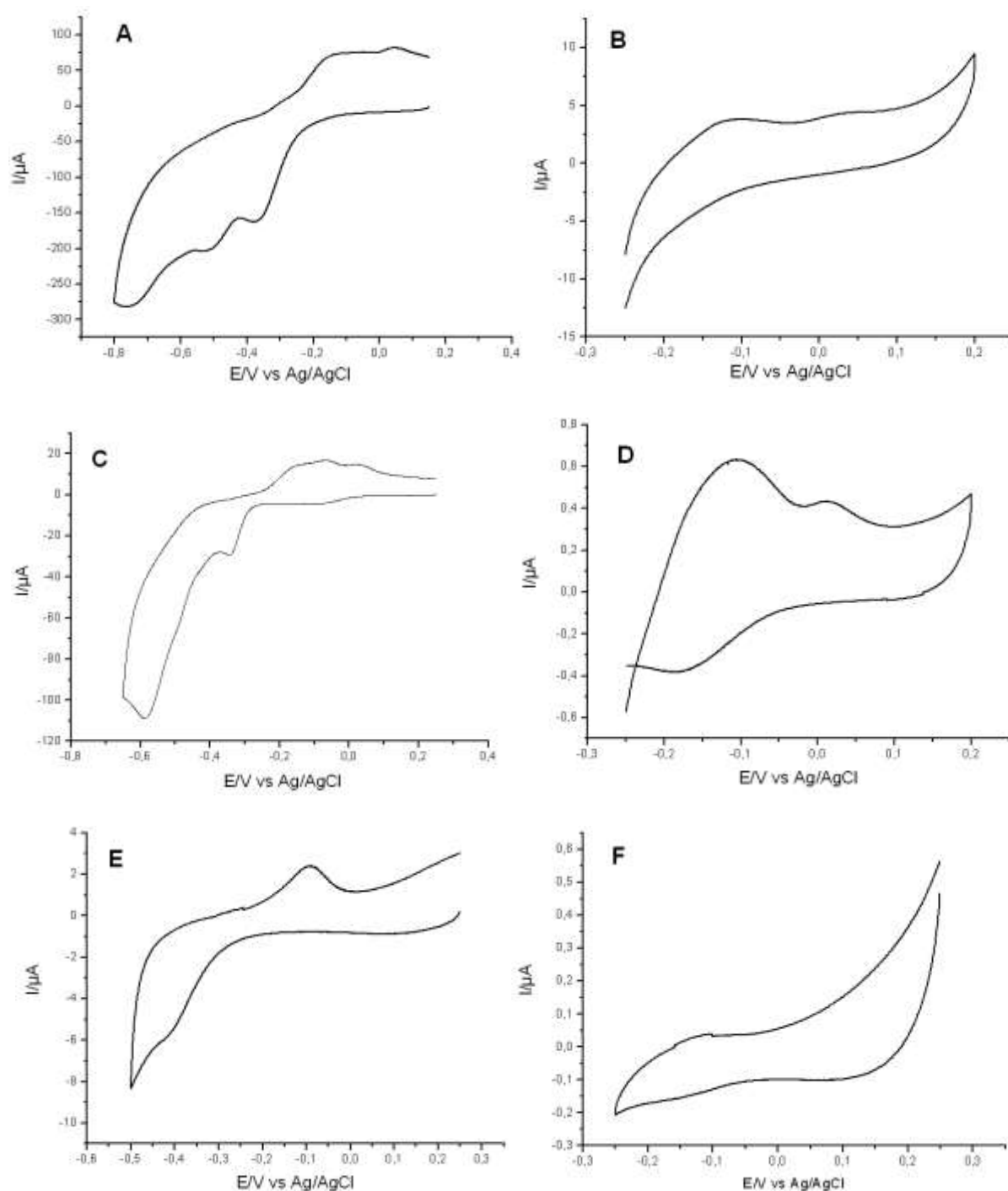


Figure 100 Cyclovoltammogrammes d'activation du CTNFM montrant l'activation de trois groupe nitro (A), de deux groupes nitro (C), et d'un (E) ainsi que les CV des signaux rédox réversibles correspondant (B, D, F). 100 mM TRIS pH=9 v(A, C, E)=100 $mV.s^{-1}$, v(B, D, F)=10 $mV.s^{-1}$.

Les travaux de Mano *et al* ont montré que l'activation de seulement un des groupes était suffisante et même préférable pour une catalyse rapide, c'est la raison pour laquelle nous essaierons de travailler dans ces conditions et limiterons l'activation à une borne inférieure de -0,5 V.

6.3.2 Résultats et discussion

Dans la suite de l'étude, la communication électrochimique entre ce médiateur, immobilisé par adsorption à la surface de l'électrode et le système électrocatalytique, encapsulé dans la couche de silice/PDDA doit être en premier lieu validée.

La Figure 101 présente la réponse électrochimique d'une électrode d'or plane recouverte par une couche auto-assemblée de CTNFM, recouverte par la couche de silice contenant le polyélectrolyte PDDA et la DI suivant la procédure optimisée et explicitée dans la partie 6.2.3 de cette étude. (Ainsi l'électrode est recouverte par une couche mince de silice faite à partir d'un sol de 0,17 M de TEOS, 5 %_{solide} de PDDA, de 0,83 mg/mL de DI, le volume de DSDH étant remplacé par un volume similaire de tampon TRIS 20 mM pH=7).

La Figure 101 A montre le signal électrochimique du CTNFM activé adsorbé sur une surface d'or, recouverte par une couche de silice/PDDA électrodéposée. Le graphe présente les deux pics caractéristiques de l'activation de deux ou trois des groupes nitro du médiateur, malgré l'application d'une activation dont la borne inférieure ne dépasse les -0,5 V. Ceci indique que le potentiel appliqué (-1,3 V) lors de l'électrogénération de la couche de silice sur l'électrode déclenche l'activation simultanée des groupes nitro du médiateur. La Figure 101 B expose la réponse d'une telle électrode à l'ajout de 1 mM de NADH. L'intensité du signal enregistrée est caractéristique d'oxydation catalysée du substrat par un médiateur combiné à la DI. Le potentiel auquel est déclenchée la catalyse indique que le couple réversible formé par le premier groupe nitro activé, dont le potentiel se situe à -0,15 V environ, est celui qui va participer majoritairement à l'oxydation du NADH.

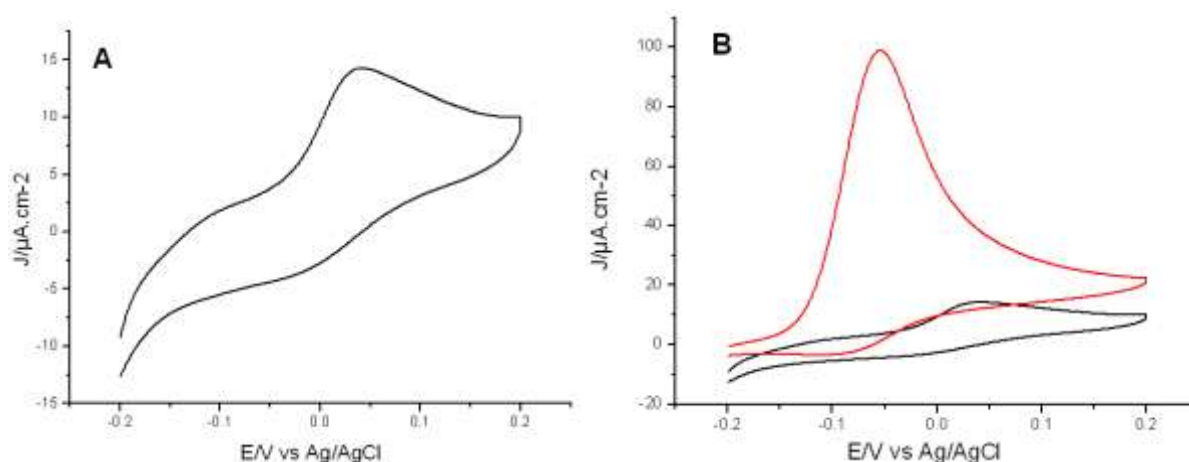


Figure 101 Cyclovoltammogramme (A) du signal rédox du CTNFM adsorbé sur une électrode d'or plane recouverte d'une couche de silice/PDDA contenant de la DI, (B) courbe noire : CV de (A), courbe rouge : réponse électrochimique de l'électrode à 1 mM de NADH. 100 mM TRIS pH=9 $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$.

En conclusion de la Figure 101, un système électrocatalytique constitué d'un médiateur adsorbé à la surface de l'électrode et de diaphorase immobilisée dans un film de silice/PDDA déposé sur cette même électrode, peut effectuer une catalyse efficace du cofacteur NADH. L'étape suivante consiste

donc à valider la communication, pour un système similaire co-encapsulant cette fois les deux enzymes, DSDH et DI dans le film de silice. La Figure 102 A) valide le fonctionnement du système électrochimique, puisque l'ajout de D-sorbitol entraîne la réponse catalytique du système DSDH/DI encapsulé dans la matrice de silice/PDDA à la surface d'une électrode recouverte d'une couche auto-assemblée de CTNFM.

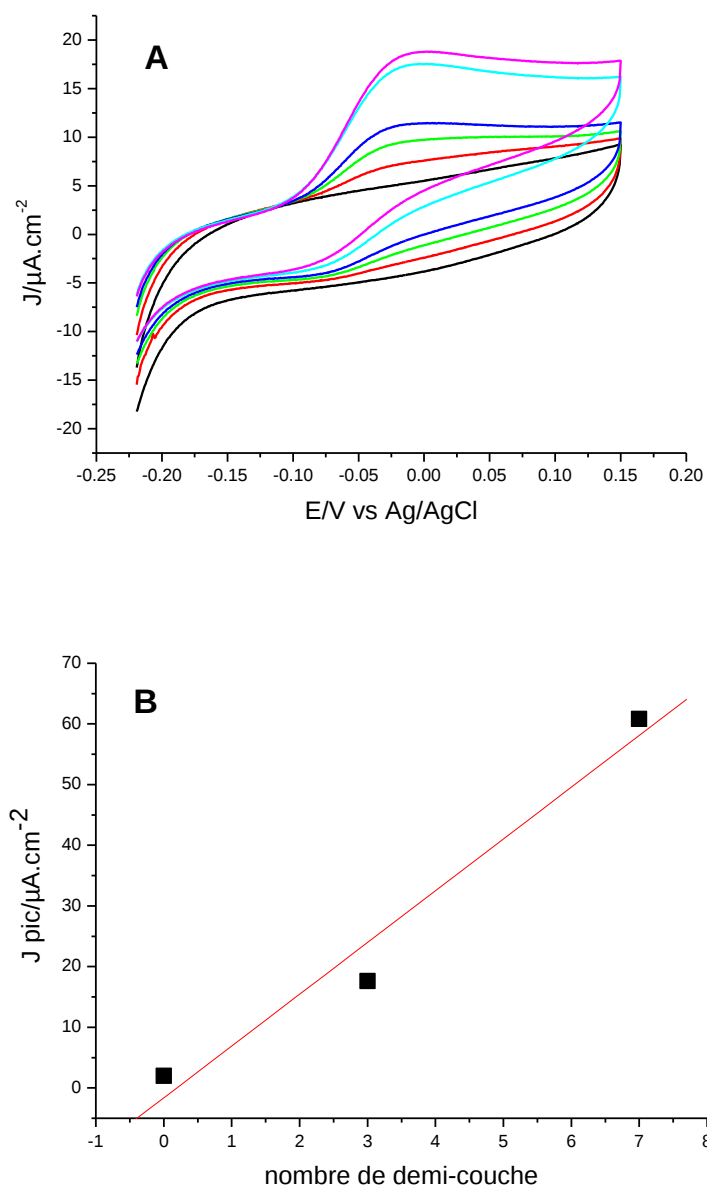


Figure 102 : (A) Voltammogrammes cycliques du système DSDH/DI encapsulé dans un film de silice/PDDA à la surface d'une électrode macroporeuse (3/2 couches, 600 nm), modifiée par une couche de CTNFM (courbe noire), réponse à l'ajout de 1 mM de D-sorbitol (rouge), 2 mM (vert), 3 mM (bleu), 4 mM (turquoise), 5 mM (violet). (B) densité de courant d'oxydation de 4 mM de D-sorbitol pris à 0 V d'une électrode plane, de 3/2 et de 7/2 couches de pores de 600 nm. 1 mM NAD^+ , 100 mM TRIS, pH=9, $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

La Figure 102 B montre l'augmentation linéaire de l'intensité du phénomène d'oxydation électrocatalytique du substrat avec l'augmentation de l'épaisseur de l'électrode puisqu'entre une électrode de 3 demi-couches et une de 7, la densité de courant est multipliée par un facteur de 3.5. En revanche, il s'avère que l'intensité des signaux est inférieure à celle présentée précédemment lorsque le médiateur était du Fc. Ceci peut s'expliquer par le fait que comparé à un médiateur en solution, un médiateur immobilisé est par conséquent moins mobile, ce qui diminue l'occurrence de ses interactions avec la DI.

Le médiateur adsorbé présente une autre limitation. En effet, sa quantité est directement limitée par l'aire de la surface active fournie par l'électrode. De plus, il est possible que les échanges électrochimiques soient difficiles entre la monocouche auto-assemblée de médiateur et les biomolécules immobilisées dans la partie supérieure de la couche de silice encapsulante. Pour surmonter ces limitations, la matrice, dans laquelle sont immobilisées les biomolécules, doit subir des modifications de sa composition, notamment par l'incorporation de nano-objets conducteurs susceptibles d'améliorer les échanges électrochimiques.

6.4 Optimisation de la couche mince d'encapsulation : incorporation de nano-particules d'or fonctionnalisées

L'insertion de nano-objets dans les matériaux sol-gel permet d'explorer les nombreuses propriétés chimiques et physiques de ces nano-éléments, afin d'améliorer les propriétés des dispositifs électro-enzymatiques qui y font appel. Par exemple, les nanotubes de carbone, qui ont d'ores-et-déjà prouvé leur contribution pour l'optimisation de la sensibilité d'électrodes [35-38], d'adsorption de médiateur [39] et d'immobilisation de protéines rédox [40], peuvent être insérés dans des couches de silice obtenues par procédé sol-gel dans le but d'optimiser les dispositifs bioélectrochimiques [41]. Il existe d'autres catégories de nano-objets pouvant servir les mêmes objectifs tels que les nano-fils de diamant [42] ou d'oxyde de métal [43]. Par ailleurs, introduire des nanoparticules de métal dans les couches d'encapsulation des dispositifs biocatalytiques présente de nombreux avantages. En effet, cela permet de diminuer le caractère isolant des matrices d'immobilisation, par l'insertion de nano-relais conducteurs, améliorant par conséquent les transferts d'électrons entre biomolécules et électrode. Par exemple, le dopage de couche de silice par des nanoparticules de titane a permis d'optimiser l'activité de la laccase immobilisée [44]. De façon similaire, l'incorporation de nanoparticules d'or dans des couches de silice a démontré l'amélioration de l'activité de la peroxydase de raifort, notamment par l'optimisation de la stabilité du dispositif assurée par l'adsorption des enzymes sur les particules [45,46]. Il a été aussi rapporté que l'activité de la glucose oxydase (GOx) était augmentée lorsque cette enzyme est immobilisée à la surface d'une électrode d'or dans un réseau polymérisé de nanoparticules de Pt et de GOx fonctionnalisées par de la thioaniline [47]. Crespilho *et al* ont incéré des nanoparticules d'or dans un système dit « couche par

couche » d'acide poly(vinylsulfonic). Ils ont montré que le bleu de Prusse peut être électrodéposé sur les particules et peut émettre un signal électrochimique [⁴⁸].

Dans ce travail, afin de palier les limitations que présente le CTNFM, médiateur présent sous forme de couche auto-assemblée à la surface de l'électrode, un dopage des films de silice d'immobilisation des biomolécules par l'incorporation de nano-objets conducteurs va être mis en place et étudié. Le choix de nano-particules d'or (Au NP) s'impose dans la mesure où non seulement, comme expliqué précédemment, ces objets métalliques peuvent jouer le rôle de relais conducteurs au sein de la couche de silice, mais peuvent aussi être fonctionnalisés avec le même médiateur que celui présent à la surface de l'électrode, augmentant de cette façon l'aire de la surface de médiation du système.

6.4.1 Détails expérimentaux

Les nanoparticules d'or sont obtenues suivant un protocole très simple où 200 μL de HAuCl_4 (20 mM) sont dissous dans 40 mL d'une solution d'eau/éthanol (1 : 1), puis réduit par l'ajout de 200 μL de NaBH_4 (0,1 M dans un mélange d'eau/éthanol (2 : 3)), introduit sous agitation manuelle pendant 2 min. Une fois les Au NP synthétisées, la fonctionnalisation de leur surface par le médiateur se fait par introduction du CTNFM dans la suspension suivant une concentration de 2,5 M.

Méthode 1:

Les substrats d'or plans sont traités à la cystéamine (25 mM), après avoir été lavés avec une solution de piranha. Ils sont ensuite placés 24 h dans la solution de Au NP afin que celles-ci adhèrent à leur surface. Les substrats sont ensuite rincés à l'eau distillée, puis placés dans une solution de CTNFM dilué dans le THF (5 mM) afin que le médiateur s'adsorbe à la surface des particules d'or. Enfin les électrodes sont recouvertes de la couche biocomposite de silice ultra-mince électrogénérée. Les proportions en PDDA (5 %_{solide}), DSDH (5 mg/mL) et DI (0,83mg/mL) sont conservées dans le mélange destiné à l'électrogénération, qui s'effectue à -1,3 V pendant 30 sec. De même que précédemment, après la formation du film les électrodes sont rincées à l'eau distillée, et conservée minimum 2 h au réfrigérateur à 4 °C sous argon, afin de désoxygéner la couche de silice.

Méthode 2 :

Les électrodes d'or sont modifiées par la formation de la monocouche auto-assemblée de CTNFM suivant le même protocole que celui décrit dans la partie 6.3.1.

Les Au NP fonctionnalisées sont introduites dans le sol hydrolysé avant l'étape de polycondensation. Comme expliqué dans la partie 6.2.2, le TEOS, l'eau et le HCl subissent dans un premier temps l'étape d'hydrolyse pendant une période de 12 h, puis le sol obtenu est dilué dans de l'eau distillée par un facteur 3 avant d'être mélangé par la suite au polyélectrolyte cationique et aux enzymes. Dans cette partie, l'eau distillée servant à la dilution du sol hydrolysé est remplacée par la solution d'Au NP

fonctionnalisées. Ainsi l'insertion des nano-objets métalliques se produit lors de l'électro-polycondensation de la silice, en même temps que l'immobilisation des biomolécules. Les proportions en PDDA, DSDH et DI sont identiques à celles évoquées dans la méthode précédente, ainsi que les conditions expérimentales de l'électrogénération.

6.4.2 Résultats et discussion

Dans les mésopores de la couche de piégeage, toutes les entités électrochimiques sont entourées de solution tampon, ce qui permet de les préserver. Toutefois, cet environnement est isolant et peut entraver les différents transferts d'électron nécessaires à la réaction électrocatalytique. Comme mentionné précédemment, l'incorporation des Au NP dans la couche d'immobilisation a été étudiée dans l'intention de surmonter les propriétés isolantes de cette matrice de silice. Un cliché TEM de ces nanoparticules, présenté dans la Figure 103, souligne la polydispersité des particules, dont le diamètre varie de 2 à 16 nm environ.

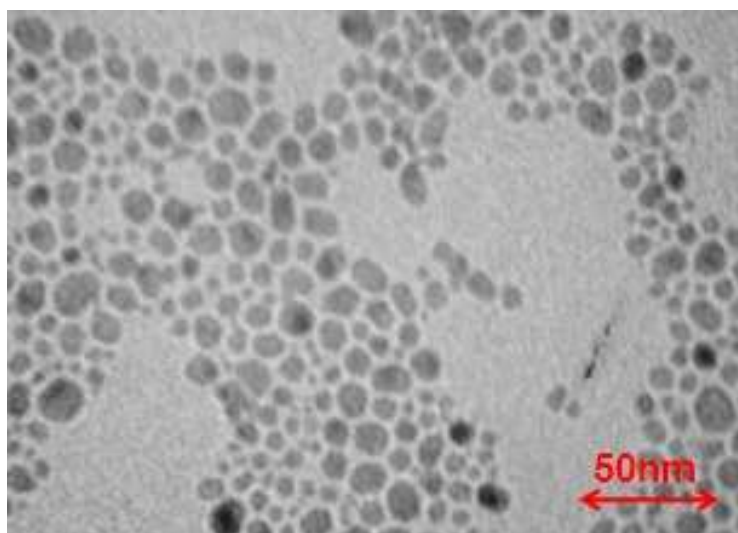


Figure 103 : Cliché TEM des nanoparticules d'or

La première méthode d'incorporation de Au NP dans la couche biocomposite de silice et d'enzymes s'effectue en deux étapes. La première consiste à immobiliser dans un premier temps les Au NP, négativement chargées de par la présence des ions chlorure qui les stabilisent, à la surface de l'électrode d'or via une monocouche auto-assemblée de cystéamine. Cette dernière présente des fonctions amine, protonnées et donc positivement chargées suivant les conditions de pH de la solution de Au NP (pH=4), ce qui permet d'établir des interactions électrostatiques attractives avec les particules, voir le schéma de la Figure 104 :

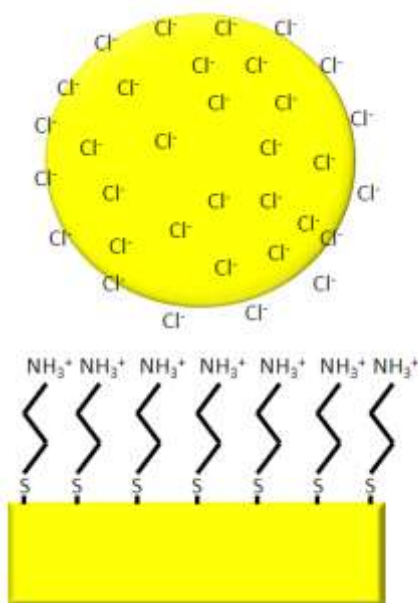


Figure 104 Schéma de l'immobilisation de Au NP stabilisées par des charges négatives sur une surface d'or portant des charges positives grâce à l'adsorption d'une monocouche auto-assemblée de cysteamine

Une fois que les Au NP sont adsorbées à la surface des substrats d'or, ceux-ci sont rincés à l'eau distillée afin d'éliminer le surplus de particules. Un cliché AFM d'une électrode recouverte de Au NP adsorbées est présenté dans la Figure 105 et montre que ces nano-objets ne se sont pas déposés en une monocouche mais forment par endroit des agglomérats :

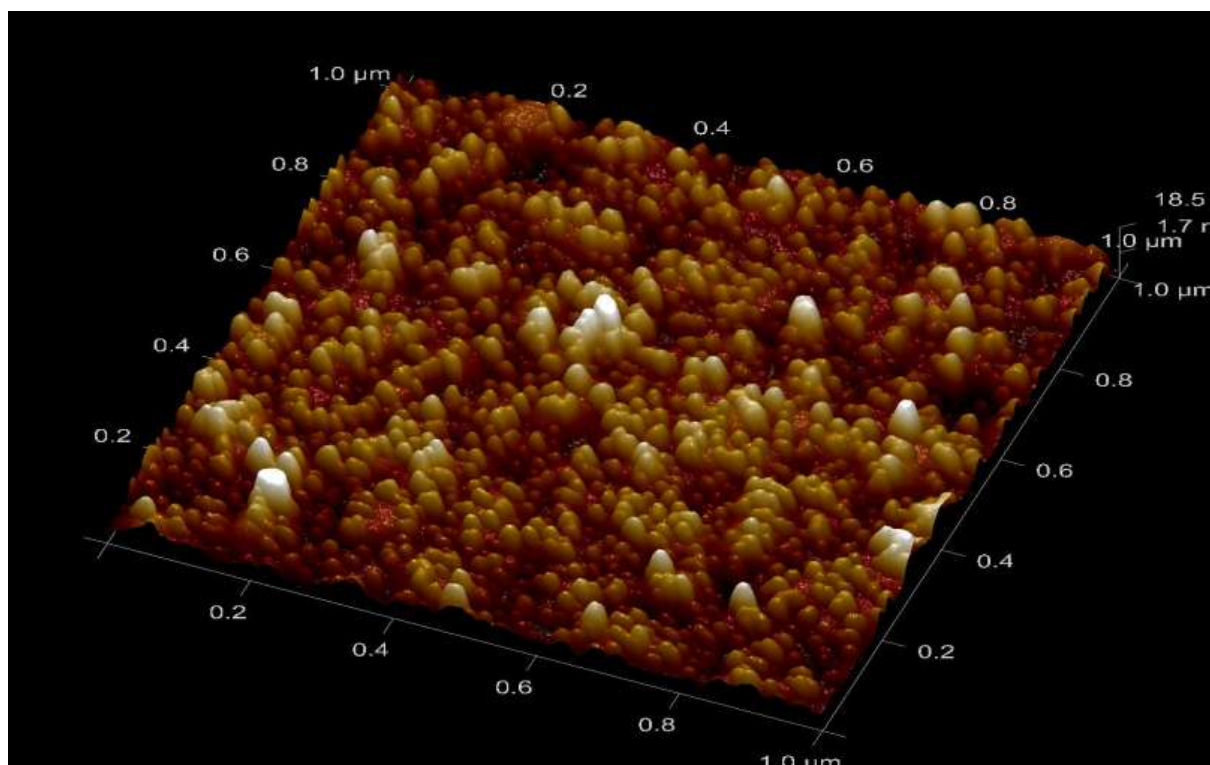


Figure 105 Cliché AFM d'une électrode d'or traitée à la cysteamine et recouverte de Au NP adsorbées à sa surface

Une fois que les Au NP sont immobilisées sur les électrodes, celles-ci sont placées dans la solution contenant le médiateur afin que celui-ci s'adsorbe à la surface des nanoparticules. Une fois que cette étape est réalisée, l'immobilisation des protéines rédox dans la couche de silice/PDDA produite par électrogénération peut s'effectuer. On suppose que le gel de silice se polycondense entre les Au NP, permettant ainsi une plus grande surface de médiation entre biomolécules immobilisées et médiateur adsorbé.

Dans un premier temps, on vérifie l'oxydation du cofacteur par la DI pour s'assurer d'une part, que le médiateur adsorbé à la surface des Au NP peut communiquer électrochimiquement avec le matériel biocatalytique immobilisé, et que, d'autre part, les particules fonctionnalisées puissent contribuer à l'intensité du signal catalytique. La Figure 106 confirme ces résultats, étant donné qu'elle montre que l'ajout de NADH, sur une électrode présentant le médiateur à la surface des Au NP immobilisées dans la silice, entraîne un signal catalytique. En effet, l'augmentation du pic d'oxydation du médiateur s'accompagne d'une diminution du pic de réduction. Par ailleurs, le signal catalytique, mesuré à 0.05 V, est multiplié par un facteur de plus de 2.6 pour l'électrode possédant des Au NP dans la couche de silice, comparé à celle qui n'en possède pas. Toutefois il est important de noter que cette augmentation est principalement générée par une augmentation simultanée du courant capacitif.

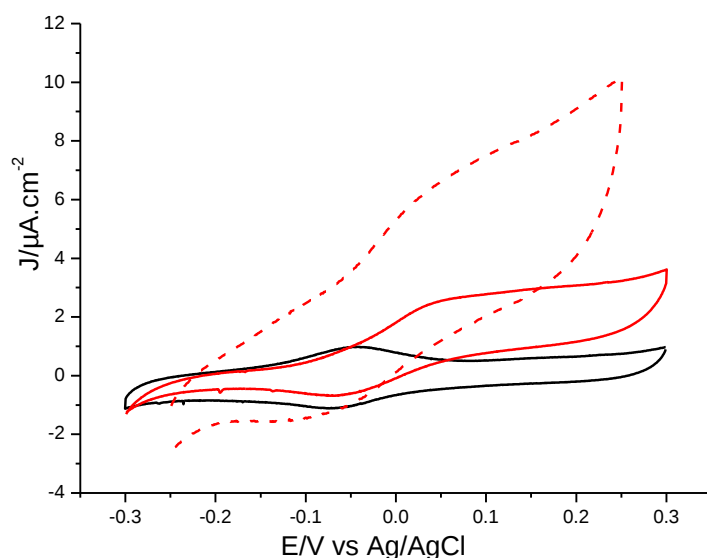


Figure 106 Réponse d'une électrode modifiée par une monocouche de CTNFM en l'absence de NADH (noir) et en présence de NADH (rouge) pour une électrode plane sans Au NP (trait plein) et recouverte de Au NP (trait pointillé). 1mM NADH, 100 mM TRIS pH=9, $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$.

La catalyse de l'oxydation du D-sorbitol par le système DSDH/DI immobilisé, lorsque la médiation est assurée par le CTNFM adsorbé sur les Au NP insérées dans la silice, est révélée dans la Figure 107. L'ajout du substrat a déclenché un signal catalytique, car le courant d'oxydation augmente significativement. L'allure de la courbe de catalyse peut être expliquée par un ratio non adéquat des

quantités de cofacteur et de substrat par rapport à la quantité de matériel enzymatique effectivement immobilisée.

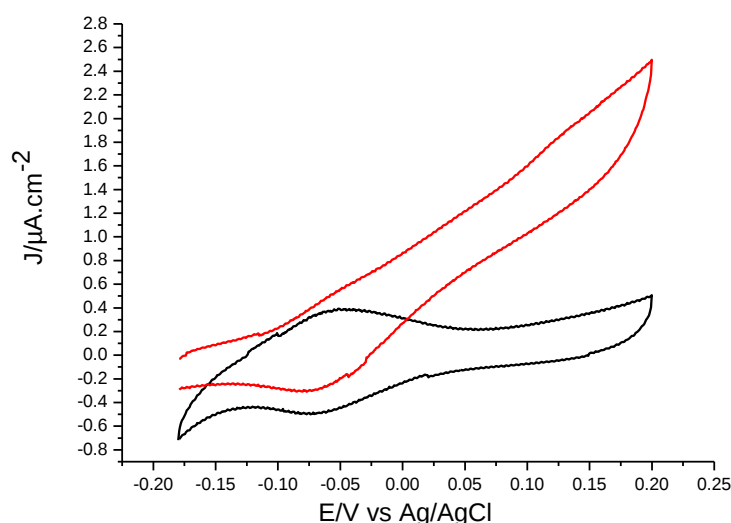


Figure 107 Réponse d'une électrode plane modifiée par une monocouche de CTNFM recouverte de Au NP, en l'absence (noir) et en présence (rouge) de D-sorbitol, pour une catalyse effectuée par le système DSDH/DI encapsulée dans des couches de silice/PDDA. 1 mM D-sorbitol, 1mM NAD⁺, 100 mM TRIS pH=9, $\nu=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

La transposition de ce système catalytique dans des électrodes macroporeuses ne montre aucune augmentation du signal catalytique avec l'augmentation de l'épaisseur de l'électrode. Par conséquent, il apparaît fort probable que les nanoparticules adsorbées à la surface de l'or ont bouché les interconnexions entre les pores, empêchant l'accès aux couches de pores inférieures pour le dépôt de la matrice d'encapsulation des biomolécules catalytiques. Ainsi cette méthode d'incorporation de Au NP dans la couche de silice biocomposite n'a pas été retenue.

La seconde méthode d'incorporation de Au NP dans la matrice de silice consiste à incorporer les Au NP fonctionnalisées au préalable par les molécules de médiateur, dans le sol hydrolysé, avant la polycondensation électrochimique. L'insertion des particules dans la couche de silice se produit donc de façon concomitante à l'encapsulation des enzymes.

En premier lieu, la contribution catalytique des Au NP insérées dans le film mince de silice par cette méthode doit être investiguée. Pour ce faire, une électrode plane d'or nu, c'est-à-dire non modifiée par une monocouche auto-assemblée de CTNFM, est recouverte d'une couche de silice/PDDA contenant non seulement le système bi-enzymatique, mais aussi les nanoparticules fonctionnalisées. Dans ce dispositif, le médiateur est donc localisé uniquement sur les nano-objets conducteurs dopant la couche de silice.

L'activation de l'électrode, présenté dans la Figure 108 A, permet de distinguer les trois pics de réduction des groupements nitro des molécules de CTNFM adsorbées sur les Au NP, à -0,266 V, -0,464 V et -0,59 V. Ces valeurs se trouvent décalées vers des potentiels positifs par rapport à celles

mesurées pour l'activation d'une couche auto-assemblée du médiateur sur une électrode d'or (-0,38 V, -0,53 V et -0,69 V). Sachant que dans les deux cas le milieu réactionnel est le même, à savoir une solution tampon TRIS (100 mM) à pH 9, cette différence de potentiel peut être expliquée par la présence de la silice environnant les nanoparticules. En effet, même s'il s'agit d'un matériau mésoporeux et donc imbibé de la solution tampon de la mesure, il est probable que la présence de la silice modifie très localement le pH, notamment autour des nanoparticules fonctionnalisées, vers des valeurs plus acides. En outre cette première mesure permet de valider de façon préliminaire la communication entre électrode et nanoparticules, puisque l'application de potentiel à l'électrode permet d'activer les Au NP présentes dans la couche la recouvrant. Cela montre également que les particules sont suffisamment proches les unes des autres pour pouvoir établir un chemin de percolation et acheminer de cette façon les électrons jusqu'à l'électrode.

La réponse de la même électrode à l'addition de 8 mM de D-sorbitol est présentée dans la Figure 108 B. On observe le signal catalytique propre à l'oxydation du substrat catalysé par le système bi-enzymatique DSDH/DI dont la médiation est assurée par le CTNFM. En effet, suite à l'ajout du sucre, le pic d'oxydation relatif au signal du médiateur à -0,15 V augmente fortement. Ces résultats prouvent que les Au NP fonctionnalisées par le CTNFM sont capables d'assurer à elles seules la catalyse du D-sorbitol et d'acheminer le message électrochimique jusqu'à l'électrode. Par ailleurs, l'allure de la courbe de catalyse, qui présente deux bosses, l'une à -0.15 V et l'autre à 0.08 V, indique que cette catalyse a été assurée par plusieurs groupes nitro du médiateur.

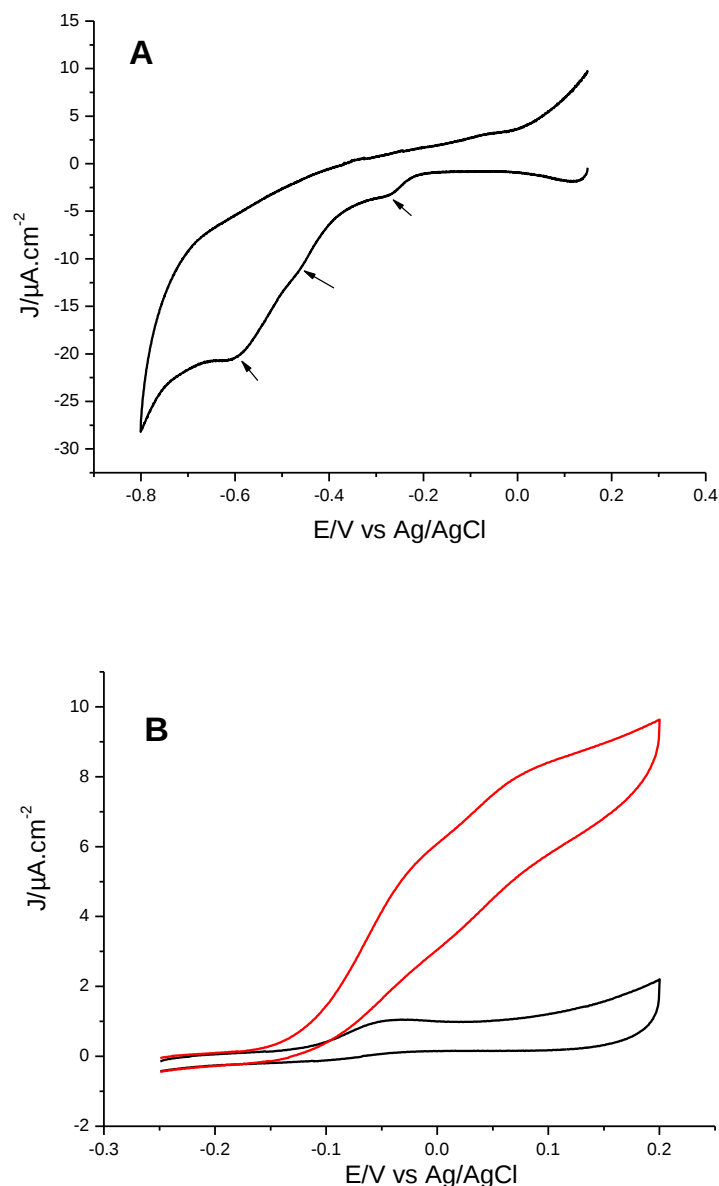


Figure 108 (A) Cyclovoltammogramme d'activation du CTNFM adsorbé sur les Au NP incorporées dans une couche mince de silice/PDDA contenant le système bi-enzymatique DSDH/DI. 100 mM TRIS pH=9, $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Réponse de l'électrode à en l'absence de D-sorbitol (noir), suite à l'ajout de 8 mM de D-sorbitol (rouge). 1 mM NAD^+ , 100 mM Tris pH=9 $v=10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

La comparaison de la contribution de la médiation fournie par la surface de l'électrode (Fig. 109, courbes rouge), à celle présentée par les nanoparticules (Fig. 109, courbes bleue), permet de constater que les Au NP sont capables de générer une catalyse du D-sorbitol deux fois plus intense (pour des densités de courant relevées à 0 V). La combinaison des deux catégories de surface de médiation, celle fournie par la surface de l'électrode et celle par la surface des Au NP, résulte en un signal de catalyse plus intense relevé pour E_{pic} égal à 0 V. Toutefois, l'intensité du phénomène catalytique fournie par ce dernier substrat n'est pas le résultat de l'addition des intensités données par les substrats présentant chacun indépendamment une des catégories de surface active. On suppose que la couche de CTNFM adsorbée sur l'électrode possède un caractère légèrement isolant,

ce qui peut entraîner un dépôt de silice plus fin. L'électrode qui ne présente du CTNFM que sur les nanoparticules de la couche de silice a donc probablement été recouverte par une couche de silice plus épaisse que les deux autres, encapsulant de cette manière une plus grande quantité du matériel bio-électrocatalytique.

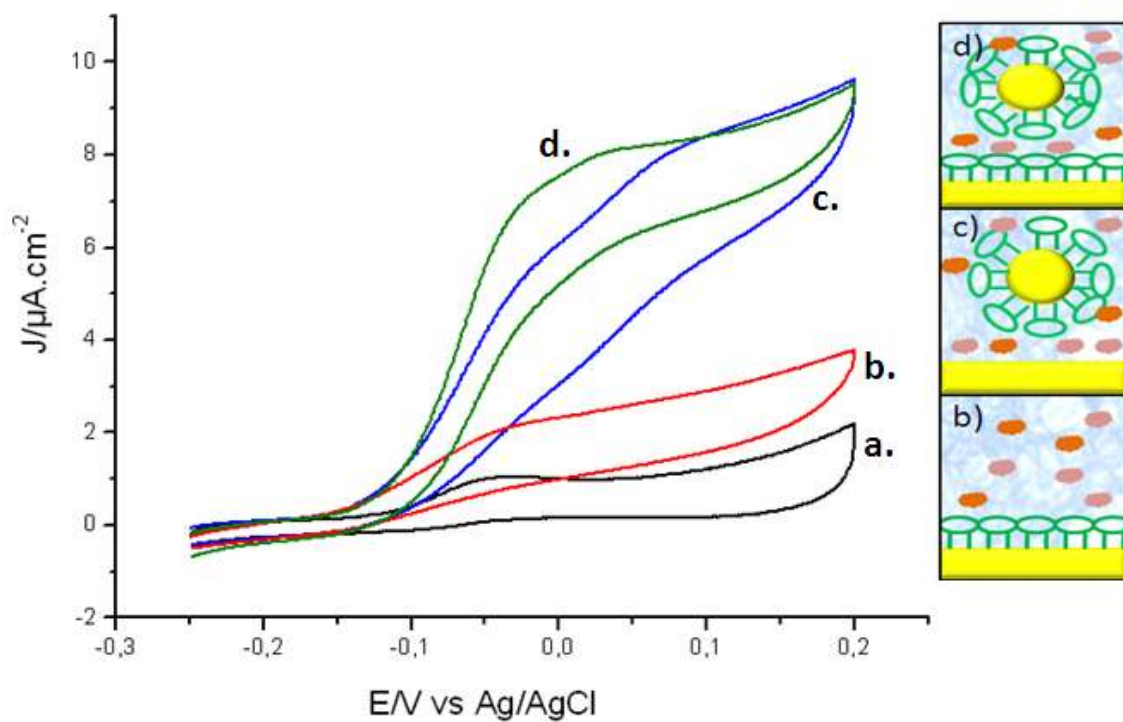


Figure 109 Signal redox du CTNFM (noir/a.). Réponse à l'ajout de 8 mM de D-sorbitol d'une électrode d'or plane recouverte d'une couche mince de silice/PDDA contenant le système bi-enzymatique DSDH/DI présentant le CTNFM adsorbé sur la surface de l'électrode (rouge/b.), adsorbé à la surface des Au NP incorporées dans la couche encapsulante (bleu/ c.), adsorbé sur la surface de l'électrode et des AuNP (vert/d.). 1 mM NAD^+ , 100 mM Tris pH=9 $v=10\text{ mV.s}^{-1}$.

Dans une démarche quantitative, le taux de recouvrement Γ , (en mol.cm^{-2}), se déduit de la façon suivante :

$$\Gamma = \frac{Q}{nF A}$$

où A (cm^2) est l'aire de la surface sur laquelle sont adsorbées les molécules, Q (C) la quantité de charge mesurée au travers de l'aire intégrée sous le pic d'oxydation du signal électrochimique caractéristique du CTNFM, n le nombre d'électrons transférés au cours des réactions d'oxydoréduction (ici $n=2$), et F la constante de Faraday, égale à 96500 C.mol^{-1} .

Dans le cas de l'électrode d'or plane modifiée par la monocouche auto-assemblée de CTNFM, le taux de recouvrement calculé est de $6,153.10^{-13}\text{ mol.cm}^{-2}$, à partir du signal redox réversible du médiateur (courbe noire, Fig. 109). Toutefois on relève que ce calcul peut être erroné dans la mesure où il suppose que la totalité des molécules constituant la monocouche sont activées. Or le dépôt de silice peut éventuellement en détruire une partie ou inhiber partiellement son activation. Cette donnée sera donc assimilée à un taux apparent (Γ_{app}) fournissant l'information relative à la quantité de

molécules adsorbées sur une surface d'or recouverte d'une couche de silice électrodéposée, pouvant être électrochimiquement actives dans ces conditions. Par conséquent, à partir du signal rédox du CTNFM généré par les nanoparticules, (courbe noire Figure 108 B), il est possible de retrouver l'aire de la surface de médiation fournie par les Au NP modifiées.

$$A = \frac{Q}{nF}$$

Cette formule nous permet donc d'évaluer que l'aire de la surface de médiation fournie par les Au NP est d'environ $0,777 \text{ cm}^2$. Etant donné que le substrat de départ présente une surface plane de $0,25 \text{ cm}^2$, il apparaît que la surface active a été augmentée d'un facteur supérieur à 4.

L'optimisation de la catalyse du D-sorbitol par l'incorporation de Au NP dans la couche d'encapsulation des biocatalyseurs est avérée. Cela a permis en outre, d'améliorer l'action du médiateur lorsque celui-ci est immobilisé par adsorption. On cherche à présent à transposer ce nouveau système catalytique dans les structures hautement organisées d'électrodes macroporeuses, afin d'augmenter encore l'efficacité de la réaction. Des précédents travaux de Szamocki *et al* ont déjà révélé l'optimisation de l'intensité de réactions bioélectrocatalytiques par l'immobilisation des systèmes analogues dans des électrodes macroporeuses [49]. Les voies d'immobilisation investiguées dans ces recherches ne faisant pas appel à des couches ultra-minces de silice, l'application de cette méthode dans une structure poreuse reste donc à étudier.

Des électrodes de 1, 5 et 7 demi-couches de pores de 600 nm de diamètre sont recouvertes de la couche de silice/PDDA contenant le système bi-enzymatique et optimisé par l'incorporation des nanoparticules fonctionnalisées. La Figure 110 présente la réponse électrocatalytique de chacun des substrats à l'ajout de 8 mM de sorbitol :

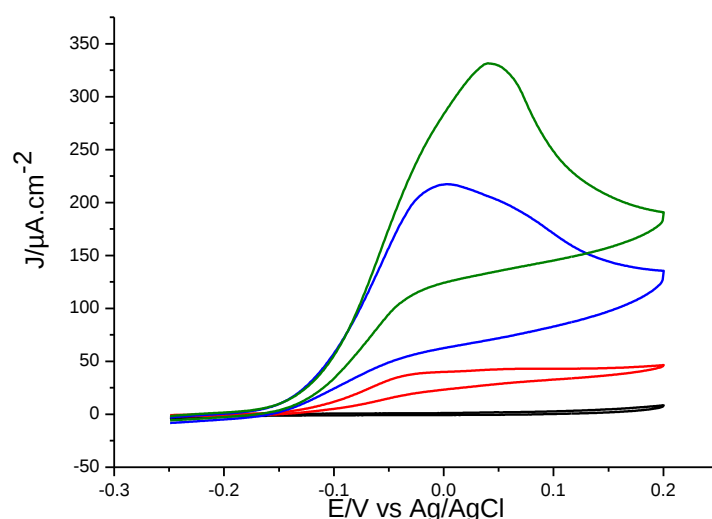


Figure 110 Réponse électrochimique à l'ajout de 8 mM de D-sorbitol d'électrodes macroporeuses (ϕ_{pore} : 600 nm) de 3/2 couches (rouge), 5/2 couches (bleu), 7/2 couches (vert) recouvertes d'une couche mince de silice/PDDA encapsulant le

système bi-enzymatique DSDH/DI et contenant les nanoparticules fonctionnalisées par les CTNFM, signal rédox du CTNFM (noir). 100 mM TRIS pH=9, $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Plus l'électrode présente de demi-couches de pores, et plus l'intensité de l'oxydation est élevée (Fig. 110). Le facteur f calculé pour l'électrode de 3 demi-couches est de 5,24, pour celle de 5 demi-couches de 27,92, et enfin celle de 7 demi-couches de 42,57. Il se trouve donc largement supérieur à sa valeur théorique (1,8, 9 et 12 respectivement). Ceci peut aisément s'expliquer par la contribution tridimensionnelle apportée par les nanoparticules. Par ailleurs, la forme de ces courbes pour les électrodes les plus épaisses (5 et 7 demi-couches) indique une limitation en diffusion que rencontre le substrat dans cette catégorie de système. Bien que ceci ne soit pas une entrave au bon fonctionnement de l'application finale sous forme de réacteur (il suffit d'effectuer la catalyse par chronoampérométrie en soumettant le système à un potentiel de 0.05 V environ pour se placer au point d'intensité de catalyse maximum et obtenir ainsi le meilleur taux de conversion électrochimique), cela souligne une limitation du système qui ne permet pas une diffusion optimale du substrat au travers de l'épaisseur de l'électrode ainsi que des couches minces biocomposites pour fournir suffisamment de sites enzymatiques.

Des clichés TEM ont été réalisés à partir de coupe FIB de l'électrode de 7 demi-couches. L'image de la coupe transverse de cette électrode révèle que le dépôt de la silice s'est formé dans toute l'épaisseur de la structure de l'électrode, tapissant la surface des pores de chaque couche (Fig. 111). Sur ce même cliché, certains pores apparaissent remplis. Cela se produit soit parce que la coupe FIB s'est opérée au niveau du pôle d'un pore, soit parce que l'électrode n'a pas pu être rincée dans l'intégralité de sa structure après la polycondensation et celle-ci s'est donc poursuivie dans certains de ses pores.

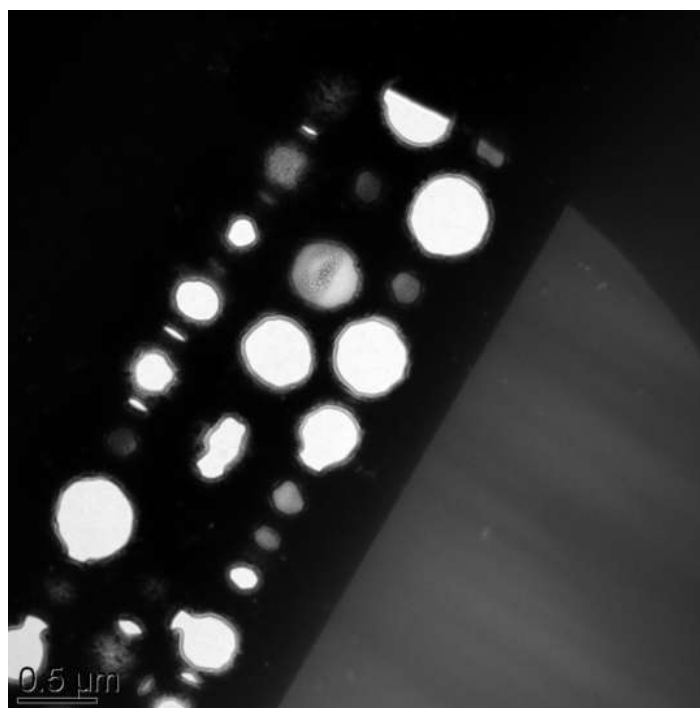


Figure 111 Cliché TEM d'une coupe transverse réalisée par FIB

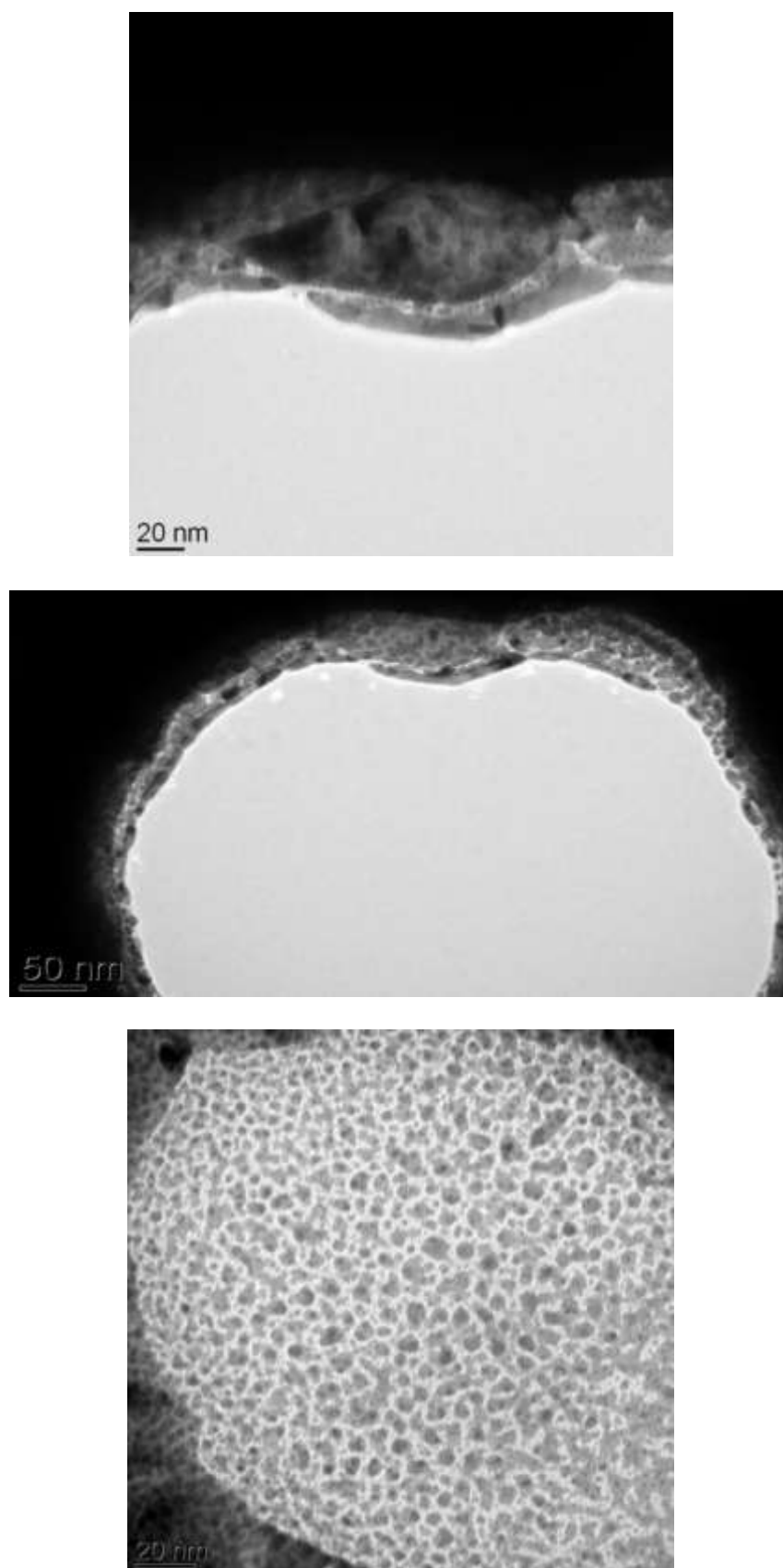


Figure 112 Clichés TEM de l'intérieur des pores d'une même coupe FIB, recouverts de la couche de silice/PDAA dopée de nano-particules d'or.

La contribution électrochimique des nanoparticules a été révélée précédemment par les techniques de voltammétrie cyclique qui ont mis en évidence leur rôle dans l'augmentation de la surface active de l'électrode. Les clichés TEM présentés dans la Figure 112 en sont de bonnes illustrations : on observe la présence des Au NP dans les films de silice tapissant les pores, que l'on voit apparaître en tâches plus foncées par rapport à la silice qui se révèle en plus clair. Ses particules métalliques semblent assez proches les unes des autres, (les distances qui les séparent sont évaluées à approximative 5 nm), révélant une forte densité de ces nano-objets dans la matrice de silice expliquant par là même la possibilité de communication électrochimique entre celles-ci et l'électrode.

Les analyses EDX opérées au centre du dernier cliché de la Figure 31 (fournis dans les annexes A.3), ont prouvé que les nano-objets d'or sont bien à l'origine des parties tachetées du cliché.

6.4.3 Conclusion

L'optimisation de l'intensité d'une réaction bioélectrocatalytique modèle et complexe, à savoir, l'oxydation du D-sorbitol par un système bi-enzymatique a pu être obtenue par un travail de perfectionnement établi sur plusieurs échelles. Tout d'abord, à l'échelle moléculaire, l'immobilisation du médiateur sous forme de couche auto-assemblée, permet de s'affranchir des problèmes de diffusion de celui-ci, rendant possible l'utilisation de structures d'électrodes plus épaisses. Ensuite, l'incorporation de nano-objets métalliques dans la couche de silice ultra-mince augmente l'aire de la surface de médiation et instaure des nano-relais conducteurs au sein de la couche d'immobilisation du matériel enzymatique, ce qui résulte en des signaux électrocatalytiques beaucoup plus intenses. Enfin, la transposition de ce système dans des structures macroporeuses d'électrode multiplie une nouvelle fois l'intensité du phénomène, fournissant de cette façon un système de biocatalyse électrochimique très performant.

L'ensemble des biomolécules constituant le système électrocatalytique responsable de la synthèse du réacteur doivent être impérativement immobilisées à la surface de l'électrode de travail. En effet, leur présence dans la solution réactionnelle imposerait des étapes post-synthèse de purification, nécessaires pour récupérer le produit final. Le médiateur étant adsorbé à la surface de l'électrode et des nano-particules d'insertion, il ne représente plus une pollution pour le flux sortant. En revanche, jusqu'ici le cofacteur se trouvait dilué dans le milieu réactionnel, et devait, afin de réagir avec les entités enzymatiques, diffuser jusqu'à leur site actif.

La partie suivante de ce chapitre concerne l'immobilisation du cofacteur NAD^+ pour l'élaboration du système catalytique final pouvant opérer dans le réacteur à flux.

6.5 Immobilisation du cofacteur NAD⁺

Il existe différentes techniques d'immobilisation du cofacteur permettant de retenir celui-ci à la surface d'électrodes constituant des dispositifs biocatalytiques. Celles-ci ont été précédemment présentées dans le chapitre 2. Dans ce travail, il s'agit donc de combiner la méthode de rétention du cofacteur aux principes qui ont été suivis pour immobiliser les enzymes et le médiateur.

6.5.1 Inclusion physique du cofacteur dans la couche mince de silice mésoporeuse

Dans un premier temps, une couche mince de silice contenant du NAD⁺ est élaborée par électrogénération sur une électrode plane. Cette expérience préliminaire d'inclusion du cofacteur dans la matrice d'immobilisation des enzymes permet de déterminer si le NAD⁺, peut être au même titre que l'enzyme, et ce, malgré sa plus petite taille, retenu physiquement dans les mésopores de la silice mésoporeuse. Le médiateur choisi est le Fc, non immobilisé, mais dissous en solution, pour pouvoir dans un premier temps évaluer l'impact de l'immobilisation du cofacteur seulement, sur la performance du système bi-enzymatique étudié.

Le cofacteur est initialement introduit avec une concentration de 15 mM dans le sol de départ à 0,17 M de TEOS, contenant le PDDA (5 %_{solide}), la DSDH (5 mg/mL) et la DI (0,83 mg/mL). L'électrogénération du film s'effectue à -1,3 V pendant 20 sec. Les voltammogrammes cycliques présentés dans la Figure 113 montrent que le NAD⁺ a été retenu dans la couche de silice électrogénérée. En effet l'ajout du D-sorbitol entraîne une réponse catalytique de la part de l'électrode, qui ne serait pas réalisable en l'absence de celui-ci (courbes en trait plein). Il est probable que des interactions de type électrostatique peuvent retenir le cofacteur sous sa forme oxydée dans la couche mince de silice, sachant que dans ces conditions de pH, celle-ci est chargée négativement. En revanche, une fois que la catalyse est déclenchée et qu'il passe sous sa forme réduite, la charge négative portée par ses groupements phosphates peut engendrer des interactions répulsives avec la matrice de silice, d'où la diminution de l'intensité du signal au fur et à mesure des cycles. L'intensité de la catalyse enregistrée pour ce système ainsi que sa stabilité temporelle demeurent plus faibles que si le cofacteur avait été présent en solution (courbes en trait pointillé). Ceci est probablement causé par le relargage du cofacteur en dehors de la couche biocomposite ou par un problème de régénération du cofacteur. La présence de pic vers 0.2 V sur les cyclovoltammogrammes obtenus pour les systèmes contenant le cofacteur immobilisé, révèle que dans la matrice d'immobilisation, la concentration en NAD⁺ à proximité de la DI est trop faible. Des optimisations en termes de concentrations de cofacteur encapsulé s'imposent donc.

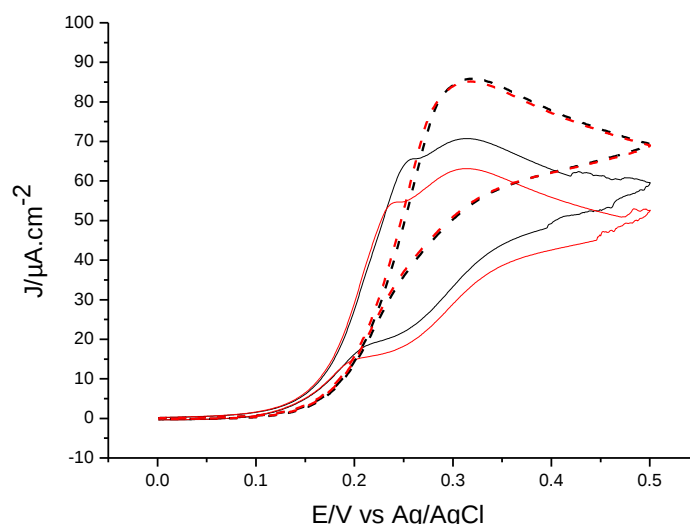


Figure 113 Réponses électrochimiques à l'addition de 4 mM de D-sorbitol d'électrodes d'or planes, recouvertes d'un film de silice/PDDA contenant le système bi-enzymatique DSDH/DI, encapsulant le cofacteur NAD^+ (trait plein), ou sans cofacteur, celui-ci étant dilué en solution à 1 mM (trait pointillé). La réponse de l'électrode est enregistrée 20 min après l'addition du D-sorbitol (noir), puis 10 min après cette première mesure (rouge). 0,3 mM Fc, 100 mM TRIS pH=9 $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$.

Afin de déterminer la quantité optimale en NAD^+ pouvant être incluse dans le sol hydrolysé de départ, différentes concentrations en cofacteur ont été incorporées dans le mélange contenant le TEOS, le PDDA et les enzymes DSDH et DI. Il semblerait que pour une concentration de NAD^+ dans le sol, avant polycondensation, proche de 30 mM, les intensités de catalyse soient plus prononcées (Fig. 114). Les faibles intensités enregistrées pour les systèmes présentant des concentrations inférieures à 30 mM sont expliquées par des concentrations en cofacteur trop faibles pour alimenter tous les centres actifs enzymatiques présents dans la couche de silice. Par ailleurs, pour des concentrations supérieures à 30 mM, les intensités de catalyse diminuent avec l'augmentation de la quantité de cofacteur immobilisé dans la couche. La présence de cette entité chargée peut conduire à des déstabilisations lors de la formation du film de silice ultra-mince, conduisant à une immobilisation des biomolécules moins efficace. En revanche, l'allure de la courbe de catalyse présentée dans la Figure 114 B), montre que la concentration de cofacteur encapsulé pour laquelle l'intensité maximale est obtenue, c'est-à-dire 30 mM, permet d'approvisionner la DI avec suffisamment de NAD^+ . En effet, aucun pic n'est observable autour du potentiel de 0.2 V. (Le présence du pic à 0.45 V est un bruit de fond généré par la matrice de silice).

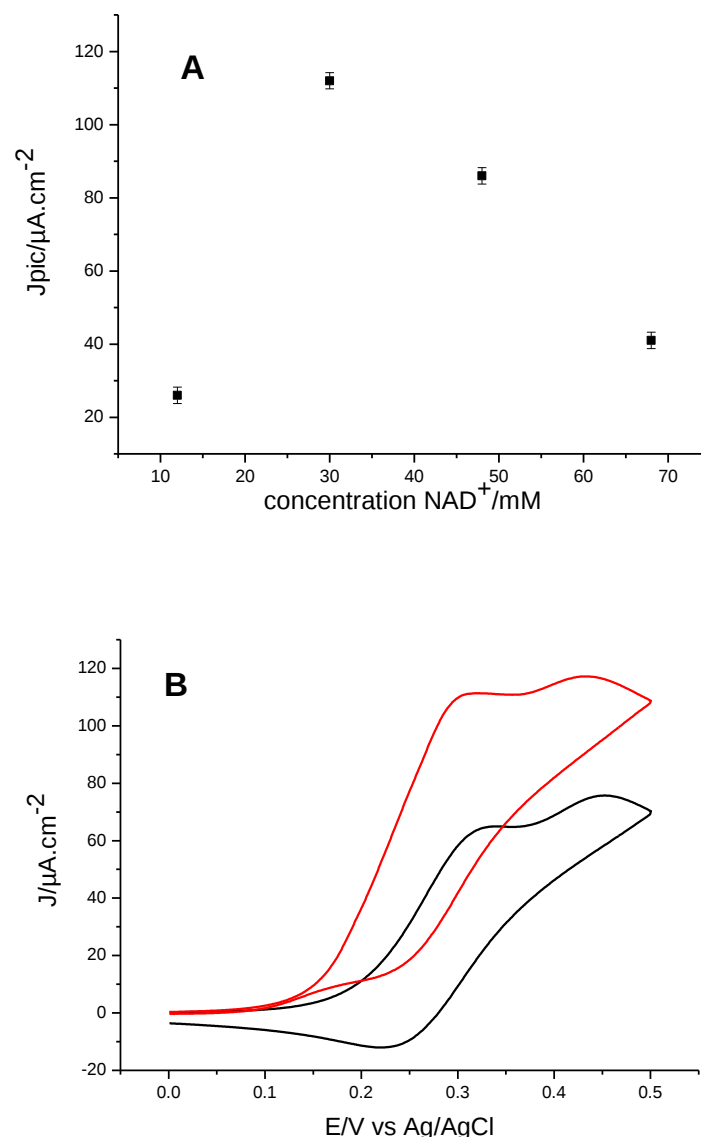


Figure 114 A) Intensité du pic du courant d'oxydation du D-sorbitol en fonction de la concentration en NAD^+ dans le sol de départ par le système bi-enzymatique DSDH/DI. La silice est obtenue à partir d'un sol de 0,17 M de TEOS, 5 %_{solide} de PDPA 5 mg/mL de DSDH et 0.83 mg/mL de DI électrodéposé à -1,3 V pendant 20 sec. B) Cyclovoltammogramme obtenu à partir d'une électrode recouverte d'une film de Si/PDPA contenant la DSDH/DI et 30 mMde NAD^+ , du médiateur Fc (noire), de la réponse électrochimique à l'ajout de D-sorbitol (rouge). 8 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS pH=9. $v=10 mV.s^{-1}$.

6.5.2 Immobilisation par pont moléculaire

Le médiateur adsorbé CTNFM peut présenter une alternative d'immobilisation du cofacteur intéressante, ce qui permettrait éventuellement d'améliorer la stabilité des films biocomposites contenant le NAD^+ . En effet, il est possible de créer un pont moléculaire, instauré par la présence d'ion Ca^{2+} , qui lie le cofacteur via ses fonctions phosphates aux fonctions carboxyliques du CTNFM. Ce mécanisme a été décrit dans les travaux de Mano *et al*, relatifs à la médiation par cette

fluorénone [34,50]. Ainsi la DI est éliminée du système électrocatalytique, étant donné que l'échange d'électrons entre médiateur et cofacteur se produit dans ce cas grâce à la proximité spatiale qu'instaure le pont. Ceci permet en outre de simplifier la chaîne électrocatalytique, qui devient alors mono-enzymatique, réduisant de ce fait les coûts de revient du système, ce point n'étant pas négligeable si on considère l'application industrielle de ce projet.

Une électrode d'or plane, modifiée par une couche auto-assemblée de CTNFM, est donc recouverte d'une couche de silice/PDDA contenant de la DSDH. Les Au NP fonctionnalisées au CTNFM sont également présentes dans le film de silice. Les proportions en TEOS, PDDA et DSDH sont conservées. Le NAD^+ est introduit dans le sol à la concentration optimale de 30 mM déterminée précédemment. Le CaCl_2 a été introduit suivant différentes proportions dans le sol de départ et il a été déterminé que la concentration optimale en ions Ca^{2+} se situe dans une gamme de 1 et 3 mM. Le graphe de la Figure 115 révèle que dans ces conditions, l'intensité de la catalyse est très faible comparée à celles obtenus pour les systèmes contenant de la DI. De plus la stabilité du système dans le temps s'avère être relativement compromise car en 10 min le signal diminue de 30 % environ. Il apparaît donc nécessaire de chercher des possibles voies d'optimisation du système mono-enzymatique

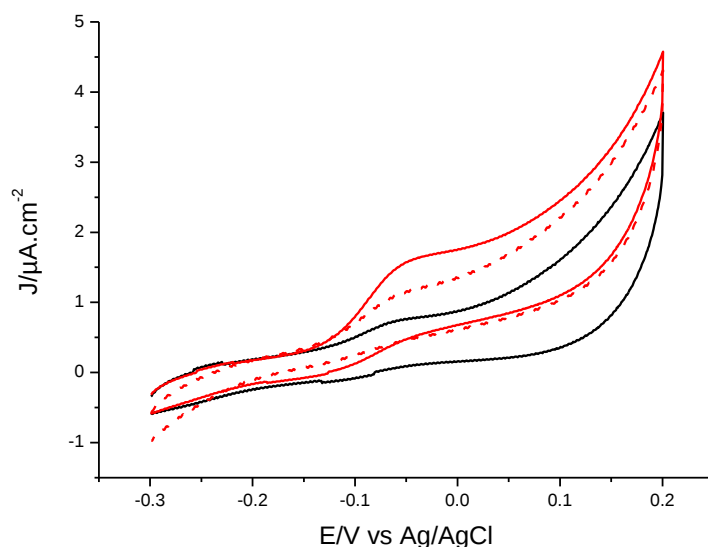


Figure 115 Cyclovoltammogramme de la réponse du système mono-enzymatique DSDH à l'ajout de D-sorbitol 20 min après l'ajout du substrat (rouge) et 10 min après cette première mesure (rouge pointillé), signal redox du médiateur (noir). La silice est obtenue à partir d'un sol de 0,17 M de TEOS, 5 %_{solide} de PDDA, 5mg/mL de DSDH et 30 mM NAD^+ , 3 mM CaCl_2 électrodéposé à -1,3 V pendant 20 sec. 8 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS pH=9. $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

6.5.3 Stabilisation par greffage covalent du cofacteur à la matrice de silice

Afin de renforcer la stabilité du système électrocatalytique, une stratégie envisageable est de lier de façon covalente des molécules de NAD^+ à une molécule précurseur de silice telle que des composés alkylsilanes ou alkylamines, afin d'insérer la molécule résultante dans la matrice de silice lors de son étape de polycondensation. Afin que le cofacteur conserve une mobilité suffisante, nécessaire à une communication électrochimique efficace à la fois avec le site actif de l'enzyme et le médiateur, il a été considéré qu'une chaîne alkyle d'une longueur conséquente devait être placée entre la molécule de NAD^+ et celle du précurseur de silice. Lors de la polycondensation, cette molécule va participer à la polycondensation au même titre que les autres précurseurs et se retrouvera donc prise dans le réseau de silice de façon à présenter le cofacteur vers le milieu extérieur (voir schémas de la figure ci-dessous).

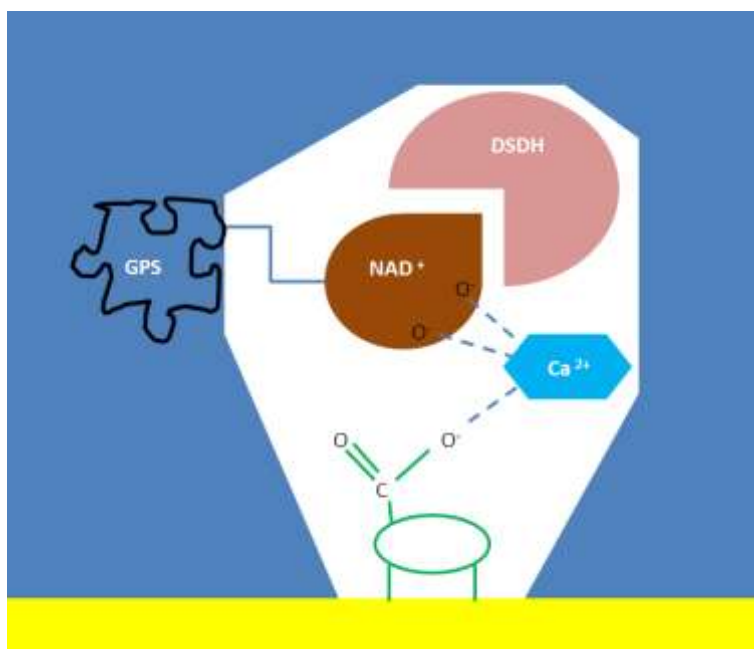


Figure 116 Schéma du système électro-catalytique composé d'un médiateur adsorbé (vert), relié au cofacteur (marron) via un pont moléculaire formé par l'ion calcium (bleu), et de l'enzyme DSDH (rouge). Le cofacteur est lié de façon covalente à un précurseur de silice afin d'établir un greffage de celui-ci sur la structure de la silice mésoporeuse (bleu).

Suite aux recherches effectuées chez nos collaborateurs du LCPME, le précurseur de silice sélectionné pour réagir avec le cofacteur est le glycidoxypropyl-silane (GPS). Il s'agit d'une molécule disponible commercialement, possédant une fonction époxy pouvant réagir avec le NAD^+ suivant la réaction suivante :

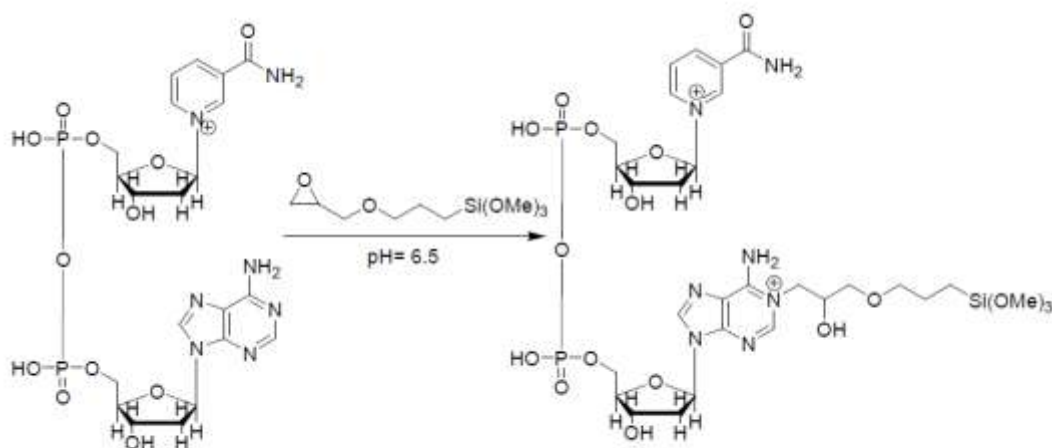


Figure 117 Mécanisme réactionnel du greffage du NAD^+ au GPS

De cette façon, après l'électrogénération du film, le cofacteur se trouve immobilisé dans le film de silice de façon beaucoup plus stable que par simple inclusion physique.

La réaction de greffage se produit de façon simple : dans une solution de tampon TRIS à pH 7, on introduit le NAD^+ et le GPS suivant les concentrations respectives de 378 mM et 1,5 M. Le mélange est agité durant la nuit pour permettre à la réaction de s'effectuer.

Le sol présente les concentrations habituelles de TEOS (0,17 M) contenant la solution de Au NP fonctionnalisées au CTNFM, de PDDA (5 %_{solide}), et de DSDH (5 mg/mL). Le CaCl_2 est introduit suivant des concentrations de 1.15 mM. 25 μL de la solution de GPS- NAD^+ sont ajouté au sol avant hydrolyse. Le médiateur est également adsorbé sur la surface de l'électrode.

La figure suivante révèle que le système est capable de fournir une catalyse plus intense ($10 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$) que dans le cas du cofacteur retenu par seulement un pont moléculaire ($1.8 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$). De plus la stabilité est améliorée car 10 min après la prise du premier signal, le signal ne décroît plus que de 20 % environ, (Fig.118).

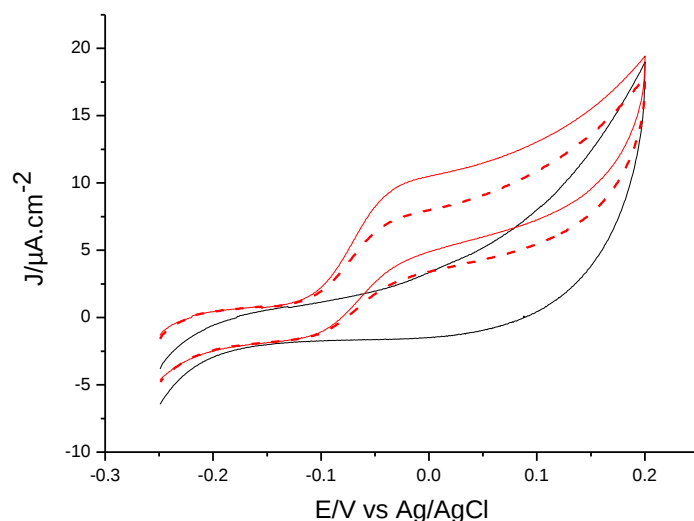


Figure 118 Cyclovotamogramme de la réponse du système mono-enzymatique DSDH à l'ajout de D-sorbitol 20 min après l'ajout du substrat (rouge) et 10 min après cette première mesure (rouge pointillé), signal redox du médiateur (noir). La silice est obtenue à partir d'un sol de 0,17 M de TEOS, 5 %_{solide} de PDDA, 5mg/mL de DSDH et 25 μ L de la solution de GPS-NAD⁺, 1.15 mM CaCl₂ électrodéposé à -1,3 V pendant 20 sec. 8 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS pH=9. $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Ce système est transposé dans une électrode macroporeuse afin de déterminer l'augmentation de signal que l'on peut atteindre avec ce système grâce à la nanostructuration de l'électrode. La courbe bleue obtenue à partir d'une électrode de 5 demi-couche (ϕ_{pore} : 600 nm) montre que l'intensité de la catalyse a pu être augmentée par un facteur de 3.72. En revanche on note que cette amélioration n'est pas due seulement à une augmentation du courant faradique mais aussi du courant capacitif.

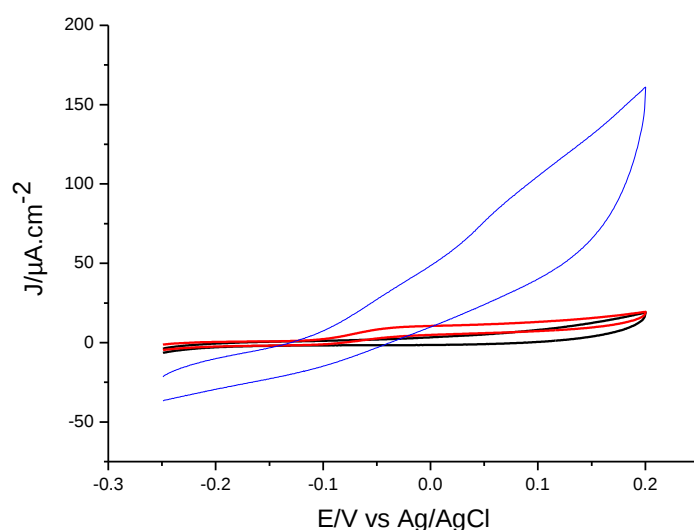


Figure 119 Cyclovotamogramme de la réponse du système mono-enzymatique DSDH à l'ajout de D-sorbitol 20 min après l'ajout du substrat pour une électrode plane (rouge) et une électrode de 5 demi-couches (bleue), signal redox du médiateur (noir). La silice est obtenue à partir d'un sol de 0,17 M de TEOS, 5 %_{solide} de PDDA, 5mg/mL de DSDH et 25 μ L de la solution de GPS-NAD⁺, 1.15 mM CaCl₂ électrodéposé à -1,3 V pendant 20 sec. 8 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS pH=9. $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

6.5.4 Conclusion

La réalisation d'un système de bio-catalyse électrochimique pouvant opérer dans un réacteur a nécessité différentes étapes d'optimisation visant d'une part à retenir de façon efficace toutes les biomolécules rédox à la surface de l'électrode de travail et d'autre part à intensifier les échanges électrochimiques pour assurer une intensité de catalyse satisfaisante.

L'étude de la couche d'encapsulation de silice ultra-mince ainsi que de sa modification par incorporation de nano-particules d'or a révélé que le recours à cette méthode de rétention de protéines rédox permettait de développer des électrodes à structures complexes dans lesquelles les systèmes bio-catalytiques peuvent être activés de façon optimale. De plus le choix d'un médiateur pouvant s'adsorber à la fois sur la surface des électrodes et celle des nano-particules d'or a permis d'accéder à un système où la médiation, bien qu'établie par un médiateur immobile, assure efficacement la catalyse du D-sorbitol.

Le jeu de construction moléculaire instauré par le pont de rétention électrostatique entre cofacteur et médiateur par l'intermédiaire des ions Ca^{2+} a permis non seulement de simplifier la chaîne catalytique mais aussi d'obtenir l'immobilisation complète des biomolécules.

Afin d'améliorer l'intensité des catalyses produites par le système final simplifié, une autre voie d'immobilisation des protéines rédox est explorée. L'alternative aux couches de silice ultra-minces proposée est la réalisation d'une matrice d'encapsulation faite à partir d'un polymère électrodéposé. Le chapitre suivant est consacré à l'étude de cette nouvelle méthode de rétention des biomolécules et à l'analyse des performances catalytiques enregistrées pour de tels systèmes.

Références Bibliographiques

- (1) Damian, A.; Omanovic, S. *Langmuir* **2007**, *23*, 3162.
- (2) Wang, J. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 814.
- (3) Katakis, I.; Domínguez, E. *Microchimica Acta* **1997**, *126*, 11.
- (4) Lobo, M. J.; Miranda, A. J.; Tuñón, P. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 191.
- (5) Schauder, S.; Schneider, K. H.; Giffhorn, F. *Microbiology* **1995**, *141*, 1857.
- (6) Kafi, A. K. M.; Wu, G.; Chen, A. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 566.
- (7) Xuecai, T.; Jinlei, Z.; Shengwei, T.; Dandan, Z.; Zenwei, H.; Yan, M.; Zaiyin, H. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1514.
- (8) Bhaduri, S.; Mathur, P.; Payra, P.; Sharma, K. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 12127.
- (9) Scampicchio, M.; Lawrence, N. S.; Arecchi, A.; Mannino, S. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 2437.
- (10) Ardakani, M. M.; Karimi, M. A.; Mirdehghan, S. M.; Zare, M. M.; Mazidi, R. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, *132*, 52.
- (11) Takagi, K.; Kano, K.; Ikeda, T. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, *445*, 211.
- (12) Gorton, L.; Domínguez, E. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *82*, 371.
- (13) Hollmann, F.; Witholt, B.; Schmid, A. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *19-20*, 167.
- (14) Mao, F.; Mano, N.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4951.
- (15) Sohyoung, K.; Yun, S.-E.; Chan, K. *Electrochemistry Communications* **1999**, *1*, 151.
- (16) Fry, A. J.; Sobolov, S. B.; Leonida, M. D.; Voivodov, K. I. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 5607.
- (17) Kano, K.; Takagi, K.; Ogino, Y.; Ikeda, T. *Chemistry Letters* **1995**, *24*, 589.
- (18) Miki, K.; Ikeda, T.; Todoriki, S.; Senda, M. *Analytical Science* **1989**, *5*, 269.
- (19) Kashiwagi, Y.; Osa, T. *Chemistry Letters* **1993**, *22*, 677.
- (20) Sokic-Lazic, D.; Arechederra, R. L.; Treu, B. L.; Minter, S. D. *Electroanalysis*, *22*, 757.
- (21) Nadzhafova, O.; Etienne, M.; Walcarius, A. *Electrochemistry Communications* **2007**, *9*, 1189.
- (22) Jia, W.-Z.; Wang, K.; Zhu, Z.-J.; Song, H.-T.; Xia, X.-H. *Langmuir* **2007**, *23*, 11896.
- (23) Heller, A.; Feldman, B. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2482.
- (24) Williams, A. K.; Hupp, J. T. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 4366.
- (25) Brennan, J. D. *Accounts of Chemical Research* **2007**, *40*, 827.
- (26) Wang, Z.; Etienne, M.; Kohring, G. W.; Walcarius, A. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 2092.
- (27) Persello, J. *Adsorption on Silica Surfaces* New York, 2000; Vol. 90.
- (28) Schneider, K. H.; Giffhorn, F. *European Journal of Biochemistry* **1989**, *184*, 15.

- (29) Wang, Z.; Mathieu, E.; Kohring, G.-W.; Bon-Saint-Côme, Y.; Kuhn, A.; Walcarius, A. *Electrochim. Acta* **2011**, in press.
- (30) Limoges, B.; Marchal, D.; Mavré, F.; Savéant, J.-M. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 2084.
- (31) Ruhlig, D.; Schuhmann, W. *Electroanalysis* **2007**, 19, 191.
- (32) Mano, N.; Thienpont, A.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **2001**, 3, 585.
- (33) Mano, N.; Kuhn, A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, 477, 79.
- (34) Mano, N.; Kuhn, A. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, 16, 653.
- (35) Viry, L.; Derré, A.; Garrigue, P.; Sojic, N.; Poulin, P.; Kuhn, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 499.
- (36) Saleh, F. S.; Mao, L.; Ohsaka, T. *Sensors and Actuators, B* **2011**, 152, 130.
- (37) McLamore, E. S.; Shi, J.; Jaroch, D.; Claussen, J. C.; Uchida, A.; Jiang, Y.; Zhang, W.; Donkin, S. S.; Banks, M. K.; Buhman, K. K.; Teegarden, D.; Rickus, J. L.; Porterfield, D. M. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, 2237.
- (38) Lahiff, E.; Lynam, C.; Gilmartin, N.; O'Kennedy, R.; Diamond, D. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2010**, 398, 1575.
- (39) Qiu, J. D.; Zhou, W. M.; Guo, J.; Wang, R.; Liang, R. P. *Analytical Biochemistry* **2009**, 385, 264.
- (40) Holzinger, M.; Haddad, R.; Maaref, A.; Cosnier, S. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, 9, 6042.
- (41) Gong, K.; Zhang, M.; Yan, Y.; Su, L.; Mao, L.; Xiong, S.; Chen, Y. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 6500.
- (42) Qureshi, A.; Kang, W. P.; Davidson, J. L.; Gurbuz, Y. *Diamond and Related Materials* **2009**, 18, 1401.
- (43) Liu, A. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 24, 167.
- (44) Cheng, J.; Di, J.; Hong, J.; Yao, K.; Sun, Y.; Zhuang, J.; Xu, Q.; Zheng, H.; Bi, S. *Talanta* **2008**, 76, 1065.
- (45) Jia, J.; Wang, B.; Wu, A.; Cheng, G.; Li, Z.; Dong, S. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 2217.
- (46) Xu, Z.; Chen, X.; Dong, S. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, 25, 899.
- (47) Bahshi, L.; Frascioni, M.; Tel-Vered, R.; Yehezkeli, O.; Willner, I. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 8253.
- (48) Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Brett, C. M. A.; Oliveira Jr, O. N.; Nart, F. C. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 17478.
- (49) Szamocki, R.; Velichko, A.; Mücklich, F.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, 2121.
- (50) Mano, N.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **1999**, 1, 497.

Chapitre 7

Méthode alternative pour l'immobilisation d'enzymes: les peintures électrophorétiques

7 Méthode alternative pour l'immobilisation d'enzymes : les peintures polymère électrophorétiques

7.1 Présentation du Résydrol®

Le Resydrol® est un mélange de copolymères d'acide acrylique et de différents acrylates. Il s'agit d'une peinture électrophorétique, qui peut donc être électrodéposée sur un substrat conducteur auquel est appliqué un potentiel approprié. Le Resydrol® est fourni sous sa forme soluble, dans ce cas ses fonctions acides carboxyliques sont déprotonées. L'application d'un potentiel positif sur le substrat à recouvrir, conduit par l'intermédiaire de l'oxydation de l'eau en oxygène à la production locale d'ions H^+ . Par conséquent le pH est localement modifié dans la zone de diffusion proche de la surface d'électrode, ce qui va entraîner la protonation des chaînes de polymère. Ainsi, en perdant sa solubilité, le Resydrol® précipite sur la surface du substrat (Fig. 120).

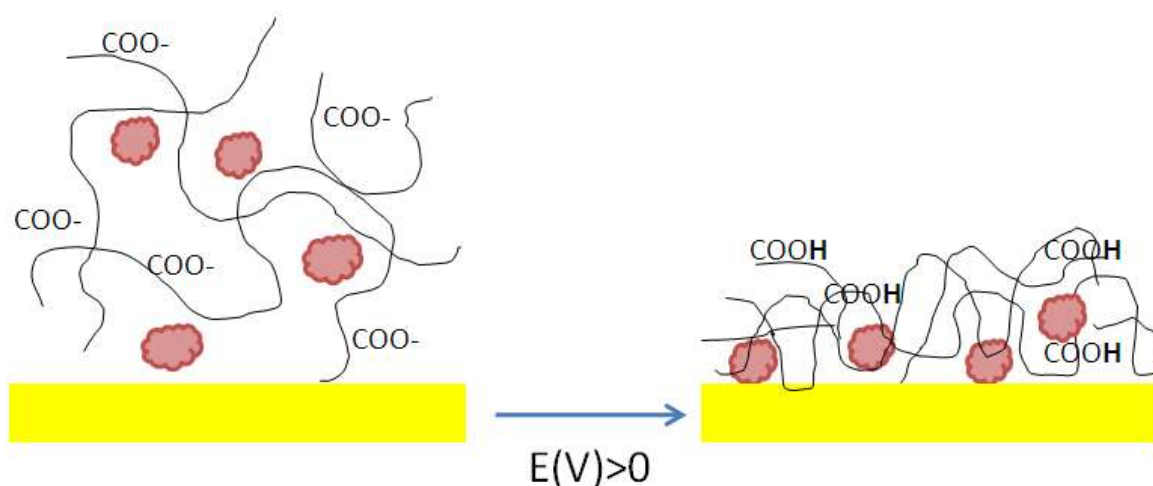


Figure 120 Schéma de la procédure de dépôt électrophorétique du Resydrol®

Dans l'industrie, le polymère à électrodéposer est mélangé à des pigments d'où l'appellation de « peinture électrophorétique ». Ce type de procédé est notamment utilisé dans l'industrie automobile pour recouvrir, protéger et colorer les carrosseries de voiture.

La possibilité d'utiliser des peintures électrodéposées (PED) comme matrice d'immobilisation des enzymes à la surface d'électrode a été démontrée par l'équipe de Schuhmann [^{1,2}]. Dans ces travaux, la glucose oxydase a été immobilisée dans une peinture électrophorétique similaire, et l'activité catalytique de cette enzyme envers le glucose a pu être révélée grâce à la détection du H_2O_2 généré enzymatiquement. De plus, cette technologie d'immobilisation a prouvé sa reproductibilité, ainsi que la stabilité dans le temps et la sensibilité qu'elle confère aux dispositifs biocatalytiques qui y font appel. La co-immobilisation des enzymes avec des hydrogels rédox dans ces peintures a également été expérimentée, permettant l'élaboration de biocapteurs sophistiqués, combinant une rétention

simultanée de l'enzyme et du médiateur. Cette stratégie a évolué vers la synthèse de peintures électrophorétiques présentant elle-même des caractéristiques rédox pour l'encapsulation et la médiation de la glucose déshydrogénase [3]. L'encapsulation d'autres molécules telles que des métalloporphyrines dans cette catégorie de matrice polymère a également été testée [4]. Szamocki *et al* ont montré que le Resydrol® pouvait encapsuler la GOx dans des structures d'électrodes macroporeuses similaires à celle dont il est ici question. Cette méthode d'encapsulation alternative à la silice est donc explorée dans ce chapitre, dans le but d'établir une comparaison avec la voie d'immobilisation précédente et de déterminer quel est le procédé le plus performant pour la réalisation des électrodes du bio-réacteur électrochimique.

7.2 Immobilisation de l'hémoglobine

Précédemment, dans le chapitre 5, l'hémoglobine a été encapsulée dans des films de silice ultra-minces. Grâce à son signal électrochimique, cette biomolécule rédox a permis l'élaboration et l'optimisation des couches minces de silice électrodéposées dans les structures d'électrodes d'or macroporeuses. Afin d'évaluer le comportement de la matrice d'immobilisation polymère faite à partir de PED dans la structure des mêmes électrodes, l'Hb est à nouveau utilisée en tant que sonde redox.

7.2.1 Détails expérimentaux

Les électrodes d'or macroporeuses sont plongées dans une solution de Resydrol® à 10 %_{vol} dans l'eau contenant de l'Hb (10 mg/mL). L'électroprécipitation procède suivant l'application de 20 pulses de potentiels. Chaque pulse se décompose en l'application d'un potentiel de 2,2 V pendant 0,2 s pour déclencher l'oxydation de l'eau, puis de 0,8 V pendant 0,8 s pour permettre l'équilibre de la concentration en Hb au voisinage de l'électrode. Enfin un potentiel de 0 V est appliqué pendant 10 s, afin d'éliminer de la surface des électrodes les dégagements gazeux d'oxygène [5].

Après la procédure de dépôt électrophorétique, les électrodes sont rincées à l'eau distillée et sont placées minimum 2h sous vide à température ambiante.

7.2.2 Résultats et discussion

Trois électrodes macroporeuses d'épaisseurs différentes (1, 3 et 5 demi-couches) présentant des tailles de pore similaires (600 nm) sont recouvertes d'un dépôt de Resydrol® encapsulant de l'Hb. La Figure 121 A montre que plus l'électrode possède de demi-couches de pores, plus le signal enregistré

est intense. Dans un premier temps, cela confirme que la couche de polymère déposée électrophorétiquement permet non seulement de retenir la protéine rédox à la surface de l'électrode, mais préserve également l'activité de celle-ci. Ensuite, comme expliqué précédemment dans le cas d'encapsulation de l'Hb par la silice, cela indique que la quantité de biomolécules rédox immobilisées augmente avec l'épaisseur de l'électrode. Cette observation confirme que le dépôt de PED pénètre bien dans la structure de l'électrode macroporeuse sans bloquer les couches supérieures de l'électrode.

La Figure 121 B) compare le signal rédox de l'Hb lorsque celle-ci est immobilisée à la surface d'une électrode poreuse de 5 demi-couches, pour une taille de pores de 600 nm, suivant une méthode d'encapsulation dans un film de silice ou de PED. Ces graphes montrent que l'intensité des pics de réduction et d'oxydation du fer contenu dans l'Hb est plus importante dans le cas du piégeage dans le Resydrol®, l'intensité des courants capacitifs respectifs étant relativement similaire. L'explication de cette différence réside dans la différence de quantité de matériel rédox encapsulé par les deux méthodes. En effet, l'encapsulation par électrodépôt de film de silice est une méthode où l'épaisseur de la couche d'immobilisation doit être contrôlée pour ne pas, d'une part qu'elle devienne trop épaisse et empêche une diffusion appropriée des espèces et d'autre part, qu'elle ne bouche pas les interconnexions. Dans cette mesure, comme l'épaisseur des couches ne dépasse pas la dizaine de nanomètres, la quantité d'espèces encapsulées est limitée. En revanche, dans le cas d'immobilisation par dépôt de Resydrol®, la quantité de dépôt n'est pas limitée de la sorte. On suppose que le PED remplit les pores, ce qui permet de retenir une plus grande quantité de biomolécules au voisinage de l'électrode.

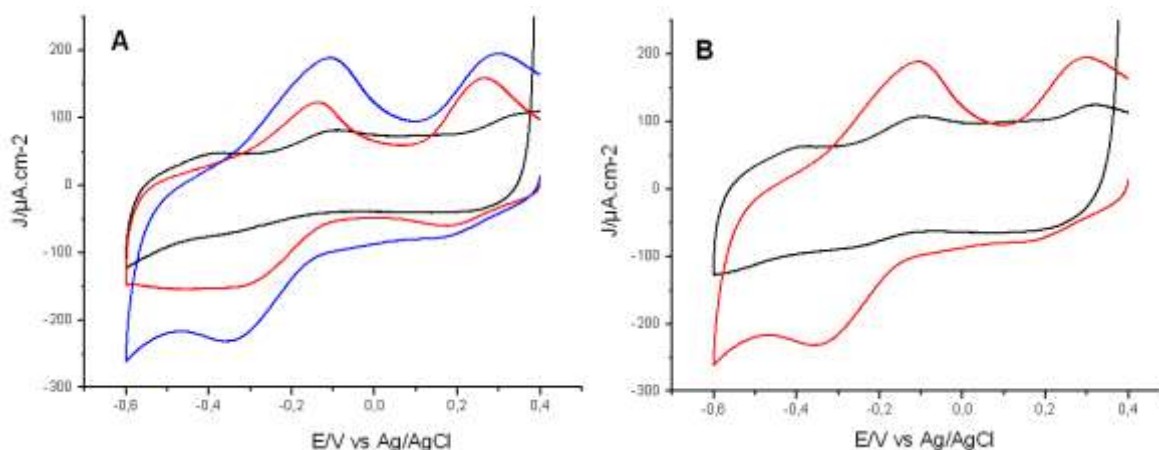


Figure 121 Voltammogrammes cycliques obtenus à partir d'électrodes d'or macroporeuses recouvertes d'un dépôt PED contenant de l'Hb. A) comparaison du signal obtenu à partir d'électrodes de différentes épaisseurs dont la taille des pores est de 600 nm : 1/2 couche (noir), 3/2 couches (rouge), 5/2 couches (bleu). B) comparaison entre deux électrodes de 5/2 couches de pores de 600 nm de diamètre recouvertes par une couche de silice encapsulant l'Hb (noir), par un dépôt de PED contenant l'Hb (rouge). 50 mM PBS, pH=6,5, $v=100 \text{ mV.s}^{-1}$.

La réduction de l' H_2O_2 catalysée par l'Hb est également testée afin de conclure sur le maintien de l'activité catalytique d'une molécule rédox encapsulée dans une matrice de Resydrol®. Les courbes présentées dans la Figure 122 A montrent que l'addition d'eau oxygénée dans le milieu réactionnel

provoque une réponse catalytique du système. Il est fort probable que la diffusion de cette espèce jusqu'au centre catalytique des molécules d'Hb est rendue possible grâce à sa faible densité du PED. Plus la concentration d' H_2O_2 est élevée et plus l'intensité du signal de réduction est importante. On note qu'à partir d'une certaine concentration en H_2O_2 , l'intensité du signal atteint un plateau, caractéristique des réactions catalysées par une protéine rédox. Par ailleurs, le phénomène de catalyse est également amplifié lorsque le système biocatalytique est déposé sur des électrodes présentant un nombre supérieur de demi-couches de pores (Fig. 122 B). En effet, entre une électrode présentant une demi-couche de pores et une de trois, l'intensité de la catalyse est multipliée par 2 environ, par contre, entre une électrode présentant une demi-couche de pores et une de cinq, elle se trouve multipliée par 3,25.

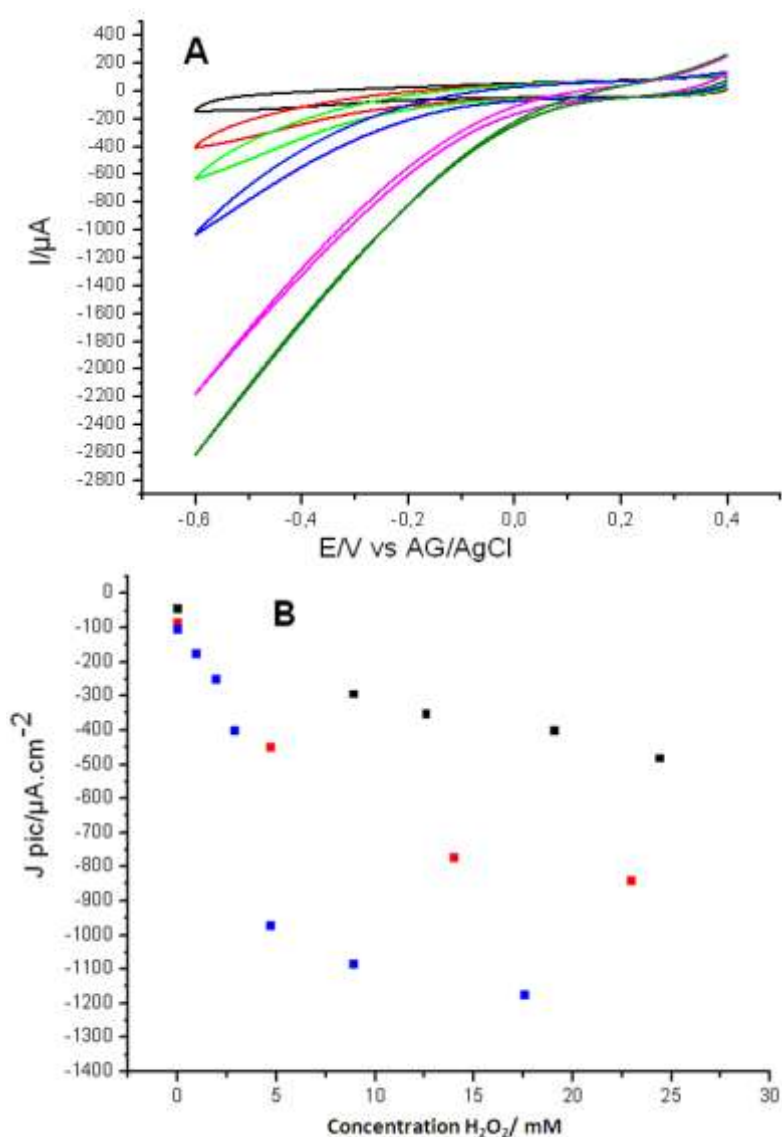


Figure 122 A) Réponse électrochimique d'une électrode de 5/ 2 couches de pores (600 nm) à l'ajout de H_2O_2 : signal redox de l'Hb (noir), du rouge au vert : 0,89 mM H_2O_2 , 1,95 mM, 2,9 mM, 4,71 mM and 50,6 mM . B) densité de courant de réduction de l' H_2O_2 pris à -0,4 V, en fonction de la concentration en H_2O_2 pour une électrode de 1/2 couche (noir), 3/2 couches (rouge), 5/2 couches (bleu). 50 mM PBS pH=6,5, $v=100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Le Figure 123 permet de comparer les densités de courant de réduction de l' H_2O_2 catalysée par l'Hb, relevés à -0,4 V, pour deux électrodes de 5 demi-couches de pores de 600 nm de diamètre chacune, recouvertes par une couche d'encapsulation soit de silice, soit de Resydrol®. Pour les faibles concentrations, l'efficacité des deux méthodes d'immobilisation semble similaire, les densités de courants relevées dans les deux cas étant proches. Toutefois, plus les concentrations en H_2O_2 deviennent importantes, et plus l'écart se creuse entre les deux catégories d'électrodes : des densités de courant plus élevées sont relevées dans le cas d'immobilisation de l'Hb par la silice. Ceci s'explique par une diffusion plus facile à effectuer dans ce type d'électrode, le substrat n'ayant que quelque nm de silice à franchir pour atteindre le catalyseur biologique. Dans le cas du Resydrol®, il est important de souligner que le chemin que doit parcourir le substrat pour atteindre un centre actif capable d'échanges électrochimiques avec l'électrode est plus conséquent. La diffusion est donc ralentie dans ce système.

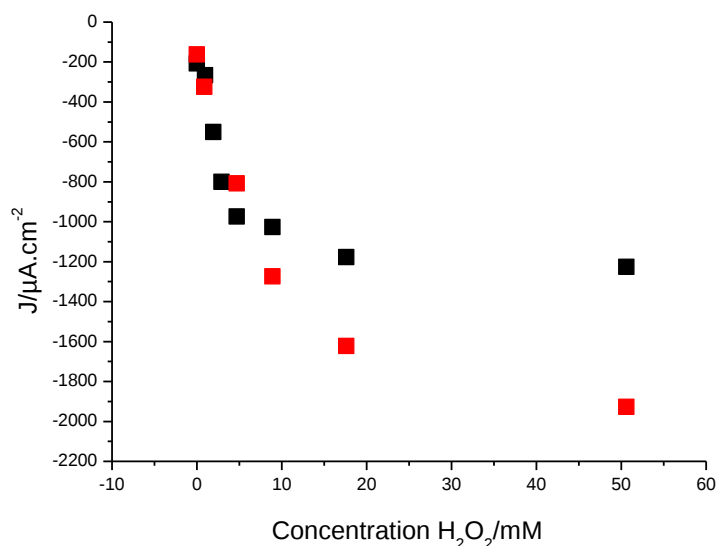


Figure 123 Comparaison des densités de courant de réduction de l' H_2O_2 (relevés à -0,4 V) entre deux électrodes de 5/2 couches de pores de 600 nm, sur lesquelles est immobilisée l'Hb dans une couche de PED (noir) ou de silice (rouge). 50 mM PBS, pH=6,5, $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

En conclusion de ces expériences préliminaires, on peut conclure que l'immobilisation de biomolécules dans une couche de Resydrol® électrodéposée constitue une alternative intéressante à l'encapsulation de protéines rédox dans des couches de silice mésoporeuse.

7.3 Immobilisation du système électrocatalytique final

7.3.1 Détails expérimentaux

Les nanoparticules d'or sont préparées suivant la procédure précédemment décrite dans la partie 6.4. Elles sont également fonctionnalisées par le CTNFM adsorbé.

Le Resydrol® AY 498w/35WA est mélangé avec la solution de Au NP modifiées par du CTNFM avec un ratio de (1:5). 50 μ L de DSDH (10 mg/mL), 30 μ L de PDDA, 33 μ L de DI (5 mg/mL) sont ajoutés à 150 μ L du mélange de polymère et de nanoparticules. Les électrodes ont été recouvertes par le film de PED suivant la procédure d'électrodépôt pulsée décrite dans la partie 7.2 de ce même chapitre. Après l'électrodépôt les électrodes sont rincées à l'eau distillée puis gardées à 4°C sous argon pendant environ 2 h.

7.3.2 Résultats et discussions

Comme expliqué précédemment dans le chapitre 5, lorsque la DSDH est encapsulée dans une couche mince de silice, son activité peut être significativement améliorée lorsqu'un polyélectrolyte cationique est ajouté à la matrice d'immobilisation. En effet celui-ci assure la création d'un environnement favorable positivement chargé, autour de la protéine redox qui porte en revanche des charges surfaciques négatives à cause des conditions basiques de pH qu'elle-même requiert pour la réalisation d'une réaction d'oxydation (le point isoélectrique de la DSDH se situant à 4,3). Le polyélectrolyte permettant l'optimisation la plus prononcée du système biocatalytique est le poly(dimethyldiallylammonium chloride) (PDDA).

Le Resydrol® possède un pK_a de 4,3, par conséquent, lorsqu'il se trouve dans sa forme électrodéposée dans le milieu réactionnel constitué d'une solution de tampon TRIS à pH 9, il présente des charges surfaciques négatives. Dans ces conditions, le Resydrol® peut donc générer des interactions répulsives vis-à-vis de la protéine redox. C'est la raison pour laquelle le PDDA est également mélangé au PED. La figure suivante montre que lorsque le PDDA est incorporé au film de Resydrol® contenant les enzymes DSDH et DI, l'activité enzymatique est intensifiée, car la densité de courant est multipliée par 2,7 comparée à celle enregistrée pour une couche sans polyélectrolyte, pour des milieux réactionnels contenant le substrat (8 mM) et le cofacteur (1 mM). Le médiateur utilisé est le CTNFM, précédemment employé dans le chapitre 6, car il permet une immobilisation par adsorption à la surface de l'électrode. Par ailleurs, la différence de formes entre les deux courbes confirme cette constatation : en présence de PDDA, le taux de conversion électrochimique de la réaction d'oxydation est plus élevé, ce qui s'explique par l'environnement favorisant l'activité de l'enzyme négativement chargée.

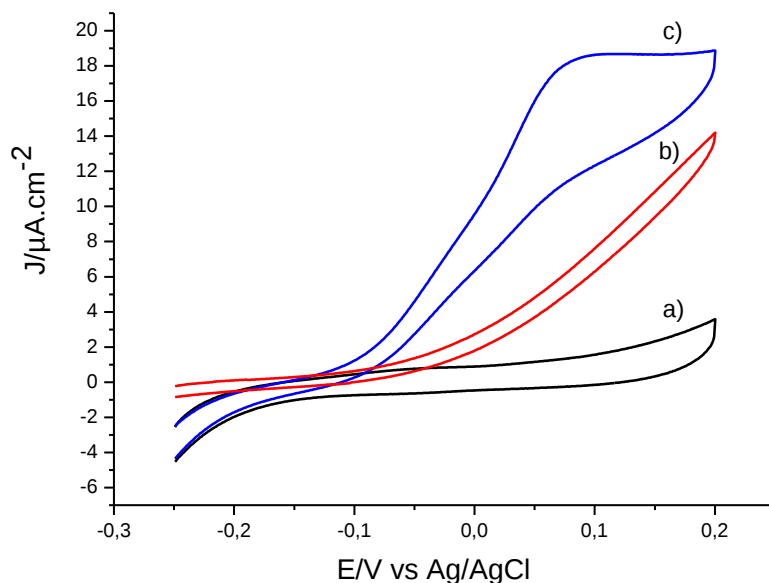


Figure 124 Cyclovoltammogramme de l'oxydation du D-sorbitol par le système DSDH/DI encapsulé dans une matrice de Resydrol® à la surface d'une électrode plane recouverte d'une couche auto-assemblée de CTNFM : signal électrochimique du CTNFM (noir), signal catalytique obtenu pour une couche de Resydrol® sans polyelectrolyte (rouge), signal catalytique obtenu pour une couche de Resydrol® contenant du PDDA. 1 mM NAD^+ , 8 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS pH=9, $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$.

En outre, la Figure 124 permet de valider la communication électrochimique entre le système bi-enzymatique encapsulé dans une matrice de Resydrol® et la couche auto-assemblée de CTNFM, car l'ajout de D-sorbitol entraîne effectivement une réponse catalytique.

Pour augmenter la conductivité au sein de la couche d'immobilisation de polymère, la stratégie similaire à celle appliquée pour l'optimisation de la couche de silice est suivie pour améliorer le film de Resydrol®. Les nanoparticules d'or fonctionnalisées par une monocouche de médiateur auto-assemblé à leur surface sont donc incorporées au film contenant les enzymes. De cette manière, la quantité de CTNFM n'est plus limitée par la surface active de l'électrode et les échanges électrochimiques peuvent être optimisés dans l'intégralité de la couche malgré son caractère isolant, même dans les zones les plus éloignées de la surface d'électrode.

La Figure 125 montre le balayage d'activation produit à partir d'une électrode d'or plane nue, recouverte d'une couche de Resydrol®/PDDA contenant de la DSDH et de la DI ainsi que des nanoparticules d'or fonctionnalisées par le CTNFM. Les trois pics caractéristiques de la réduction des trois fonctions nitro portées par la molécule du médiateur sont détectés. Comme ce dispositif présente le CTNFM seulement à la surface des Au NP de la couche d'encapsulation, ce résultat démontre que celles-ci peuvent communiquer de façon significative avec l'électrode, c'est-à-dire qu'elles se trouvent assez proches les unes des autres pour assurer l'acheminement des électrons jusqu'à celle-ci.

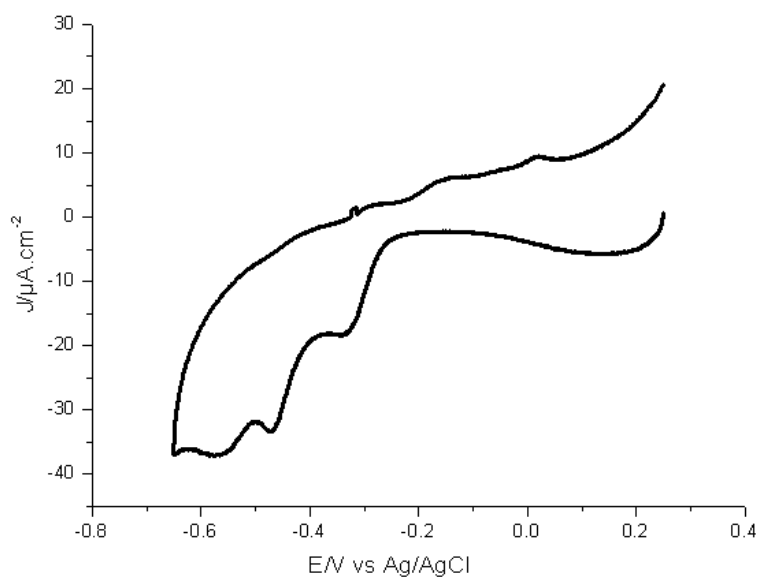


Figure 125 Cyclovoltammogramme d'activation du CTNFM adsorbé sur les Au NP incorporées dans la couche de Resydrol®/PDPA, chaque pic de réduction entre -0,2 V et -0,65 V correspond à l'activation d'un des groupements nitro en groupe nitroso. 100 mM TRIS, pH=9, 100 mV.s⁻¹.

La Figure 126 montre la réponse catalytique provoquée par l'ajout de 8 mM de D-sorbitol sur trois électrodes recouvertes d'une couche de Resydrol®/PDPA encapsulant le système bi-enzymatique de la DSDH et de la DI. La courbe b) renvoie à la réponse d'une électrode présentant le médiateur CTNFM seulement adsorbé à sa surface, la couche d'immobilisation ne contenant pas de Au NP. En comparaison de celle-ci, la réponse d'une électrode localisant le médiateur seulement à la surface des nanoparticules incorporées dans la couche d'encapsulation, est beaucoup plus intense (courbe c)). Cela prouve que les nanoparticules à elles seules, sont capables de contribuer de façon significative à la catalyse du D-sorbitol. Par conséquent, lorsque les deux types de surface de médiation sont combinés, il se produit un effet de synergie entre elles, permettant de générer une intensité de catalyse supérieure aux précédentes (courbe d)). Par ailleurs, ces observations permettent de déduire que le caractère isolant de la couche de médiateur adsorbé impacte moins l'électroprécipitation du polymère que l'électrogénération de la silice. Cela peut aisément s'expliquer par la considération de la valeur absolue des potentiels de dépôt des deux matériaux, qui révèle que celui nécessaire à la génération de la couche de polymère est plus élevé que celui-ci requis pour la formation de la silice.

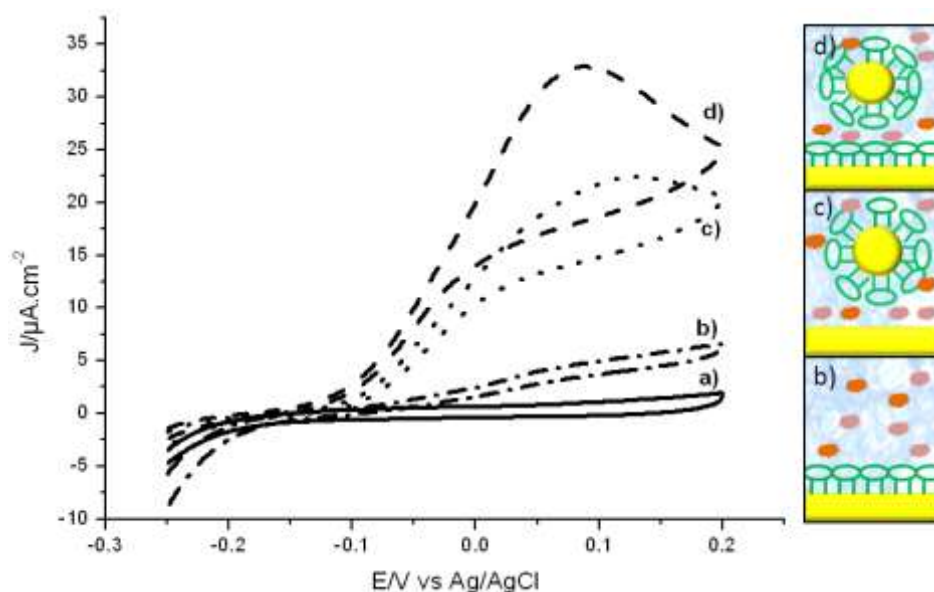


Figure 126 Cyclovoltammogramme du signal redox du médiateur (a), de la réponse électrochimique à l'ajout de 8 mM de D-sorbitol du système enzymatique DSDH/DI encapsulé dans une couche de Resydrol®/PDPA sur une électrode d'or plane recouverte d'une couche auto-assemblée de CTNFM (b), sur une électrode d'or nu présentant le CTNFM seulement à la surface des Au NP incorporées dans la couche d'immobilisation (c), sur une électrode présentant le CTNFM adsorbé à sa surface et sur celle des Au NP présentes dans la couche d'immobilisation (d). 1 mM NAD^+ , 100 mM TRIS pH=9, $v=10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$.

Ces mesures n'ont pas permis d'évaluer le taux de recouvrement Γ des molécules de CTNFM sur les nanoparticules d'or lorsque celles-ci sont insérées dans la couche de polymère. En effet, il apparaît que le signal rédox du médiateur obtenu par voltammétrie cyclique se trouve noyé dans un « bruit de fond » généré par la matrice de Resydrol®, ce qui empêche la détermination de la charge mise en jeu par cette espèce électroactive.

Dans le but d'évaluer l'impact de l'épaisseur de la couche de Resydrol®/PDPA dopée par les Au NP fonctionnalisées sur l'efficacité de la catalyse de l'oxydation du D-sorbitol, différentes électrodes planes ont été recouvertes d'une couche de peinture électrophorétique électro-précipitée suivant différent nombre de cycles de dépôt. Pour toutes ces électrodes, le médiateur n'est porté que par les Au NP. Pour chaque substrat, l'oxydation catalytique du D-sorbitol est mesurée. Pour chacun d'entre eux, la densité de courant du pic d'oxydation est reportée dans la Figure 127. L'intensité maximale est enregistrée à partir du substrat modifié par une procédure de dépôt comprenant 20 cycles. Les intensités plus faibles, enregistrées pour les substrats obtenus pour des procédures de 5 à 15 cycles, s'expliquent par la quantité inférieure de matériel bio-électrocatalytique et de Au NP immobilisés sur l'électrode. Si la procédure de déposition excède 20 cycles, alors la couche de Resydrol® devient trop épaisse et entrave la diffusion des espèces en solution.

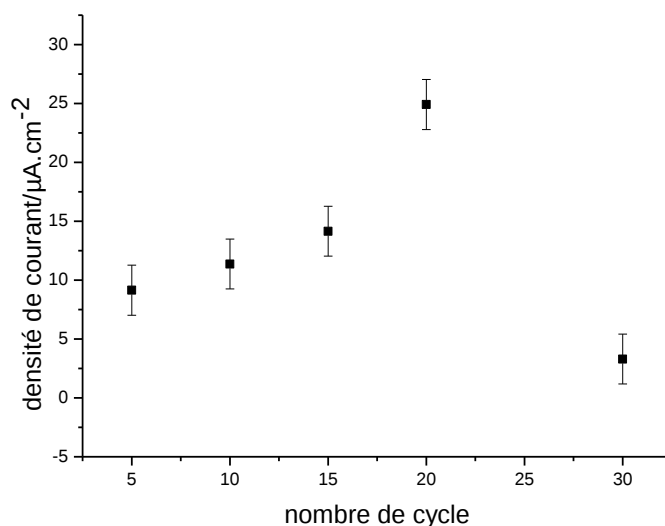


Figure 127 Densité de courant des substrats d'or plan recouvert d'une couche de Resydrol®/PDPA contenant le système enzymatique constitué de DSDH et de DI et dopée par les Au NP fonctionnalisées, précipitée suivant différent nombre de cycle d'électrodéposition. 1 mM NAD^+ , 8 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS pH=9, $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Afin d'obtenir une catalyse du substrat d'intensité supérieure, le système bio-électroenzymatique est encapsulé dans des couches de Resydrol®/PDPA électroprécipitées dans les électrodes macroporeuses présentant des structures organisées. Des électrodes de une et de trois demi-couches de pores de 1200 nm de diamètre ont été testées et comparées à une électrode plane (Fig. 128). Comme montré précédemment dans la partie 7.2, le processus d'électroprécipitation du polymère ne bloque pas les couches supérieures des électrodes. En effet, la figure suivante montre que plus l'électrode est épaisse, et plus l'intensité de la catalyse est importante, ce qui est en accord avec l'augmentation de surface active rendue disponible pour les électrodes épaisses.

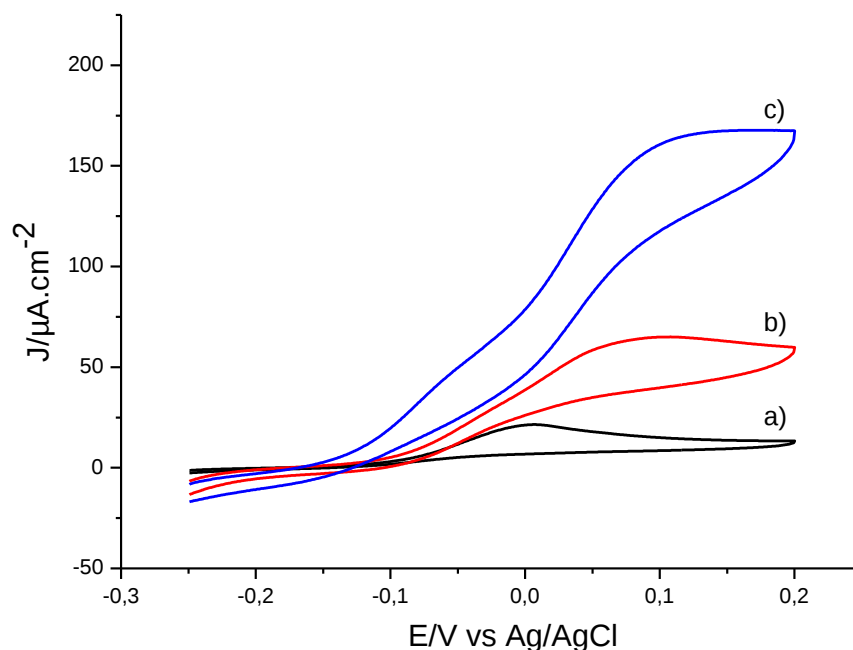


Figure 128 Cyclovoltammogrammes cycliques de l'oxydation de 8 mM de D-sorbitol par le système DSDH/DI encapsulé dans une matrice de Resydrol®/PDDA électroprécipitée sur une électrode plane (a), d'une demi-couche de pores (b) et de trois demi-couches de pores (c). $\varnothing=1200$ nm, 1 mM NAD⁺, 100 mM TRIS pH=9 $v=10$ mV.s⁻¹.

Si on considère le facteur d'augmentation du signal f , présenté dans le chapitre 4, on remarque qu'entre une électrode plane et une électrode poreuse, l'augmentation du signal mesurée expérimentalement est plus importante que celle calculée théoriquement. Le facteur f relevé à partir de la figure 128 est en effet de 2,8 comparé à la valeur théorique calculée de 1,8 pour une électrode d'une demi-couche, et de 7,3 comparé à 5,4 pour une électrode de 5 demi-couches. Ceci peut être expliqué par le procédé d'électroprécipitation qui dépose probablement une partie de la matrice de Resydrol® en dehors de la structure poreuse de l'électrode. Comme les Au NP de cette partie du film se trouvent connectées à l'électrode, elles contribuent également au signal électrochimique.

Les clichés TEM de la coupe FIB présentés dans la Figure 129, réalisée sur une électrode macroporeuse, révèlent la porosité de la couche de polymère électrodéposé qui remplit les pores. La structure poreuse de la matrice polymère donne une explication quant à la diffusion des espèces, telles que le substrat et le cofacteur, à l'intérieur de la couche d'encapsulation jusqu'aux espèces immobilisées.

Afin d'immobiliser le cofacteur dans la structure de polymère électrodéposé, il est possible de suivre la même stratégie que celle présentée dans la partie 6.4. Le système électrocatalytique peut donc être simplifié en remplaçant la DI par la création du pont moléculaire grâce à la présence de l'ion Ca²⁺ qui se lie à la fois à la fonction carboxylique du médiateur et au groupement phosphate du cofacteur. Cette construction moléculaire, de par la proximité spatiale qu'elle instaure entre médiateur et cofacteur, va favoriser les échanges électrochimiques entre ces deux espèces. L'avantage de

travailler avec un cofacteur immobilisé prévient les éventuels problèmes de diffusion de celui-ci au travers de la couche d'immobilisation et permet de cette même façon de ne pas polluer le flux sortant du réacteur par un des éléments de la chaîne biocatalytique. De plus, éliminer la DI de la chaîne catalytique permet de réduire le coût d'élaboration du dispositif de manière significative.

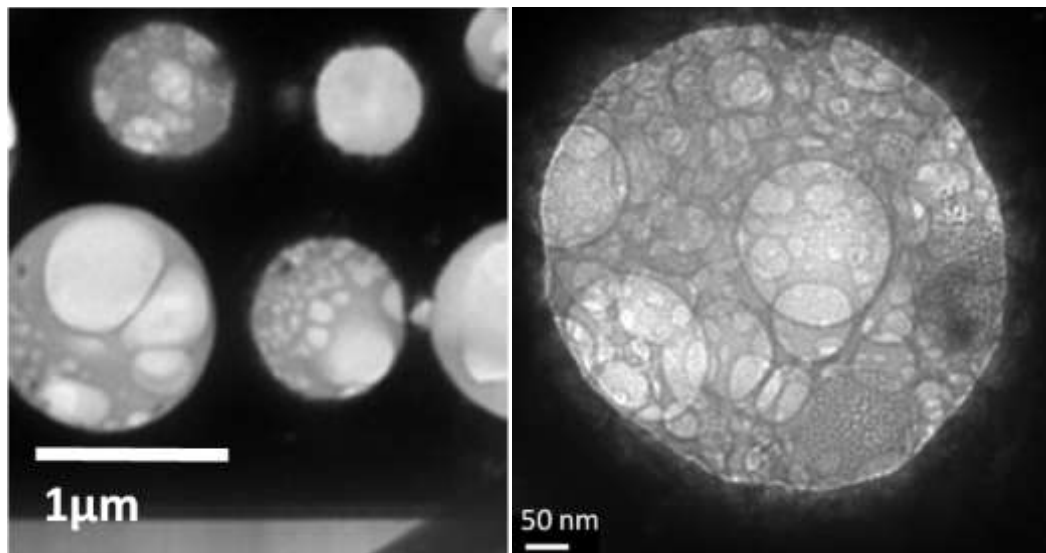


Figure 129 Clichés TEM de la coupe transverse d'une électrode recouverte d'une couche de Resydrol®/PDPA/AuNP contenant de la DSDH et de la DI.

Avant l'étape d'électroprécipitation, le volume de DI est remplacé par un volume équivalent de NAD^+ , mis en solution dans un tampon TRIS à 100 mM pH=9 contenant 0,2 M de CaCl_2 . Après la formation de la matrice de polymère par dépôt électrochimique, la réponse catalytique de l'électrode à l'ajout de D-sorbitol est mesurée. La Figure 130 A permet d'évaluer la concentration optimale en NAD^+ dans la solution ajoutée au mélange initial contenant Resydrol®. L'intensité maximale de catalyse est obtenue pour une concentration de 55 mM de NAD^+ . Pour des concentrations inférieures, l'intensité du signal enregistré est plus faible étant donné que le système ne dispose pas de suffisamment de cofacteur. Pour les concentrations supérieures à 55 mM, la réponse catalytique du système est également plus faible, car une quantité trop importante en cofacteur peut déstabiliser le processus de formation de la couche de Resydrol®.

La Figure 130 B) montre que le nouveau système simplifié peut également être électrodéposé sur une électrode macroporeuse de 3 demi-couches ($\varnothing_{\text{pore}} : 1200 \text{ nm}$). Il apparaît, encore une fois, que le signal est beaucoup plus intense lorsque le système bio-électrocatalytique est immobilisé sur une électrode poreuse que sur une électrode plane. Il est en effet multiplié par un facteur d'une valeur de plus de 4.3. La stabilité de l'interaction entre médiateur et cofacteur introduite par la présence du Ca^{2+} est relativement bonne, étant donné que l'intensité du signal demeure stable. On constate en effet que des mesures de l'intensité de catalyse effectuées à 20 minutes d'intervalles (courbe rouge pleine et pointillée de la Figure 130 B) ne montrent qu'une très légère diminution du signal. En comparaison avec les mesures de stabilité du signal présentées dans la partie 6.5 du chapitre précédent, le système enzymatique composé de la DSDH, du cofacteur NAD^+ immobilisé et du

médiateur CTNFM adsorbé, montre de meilleures performances dans le cas de l'immobilisation dans la matrice de Resydrol® que dans celles de silice.

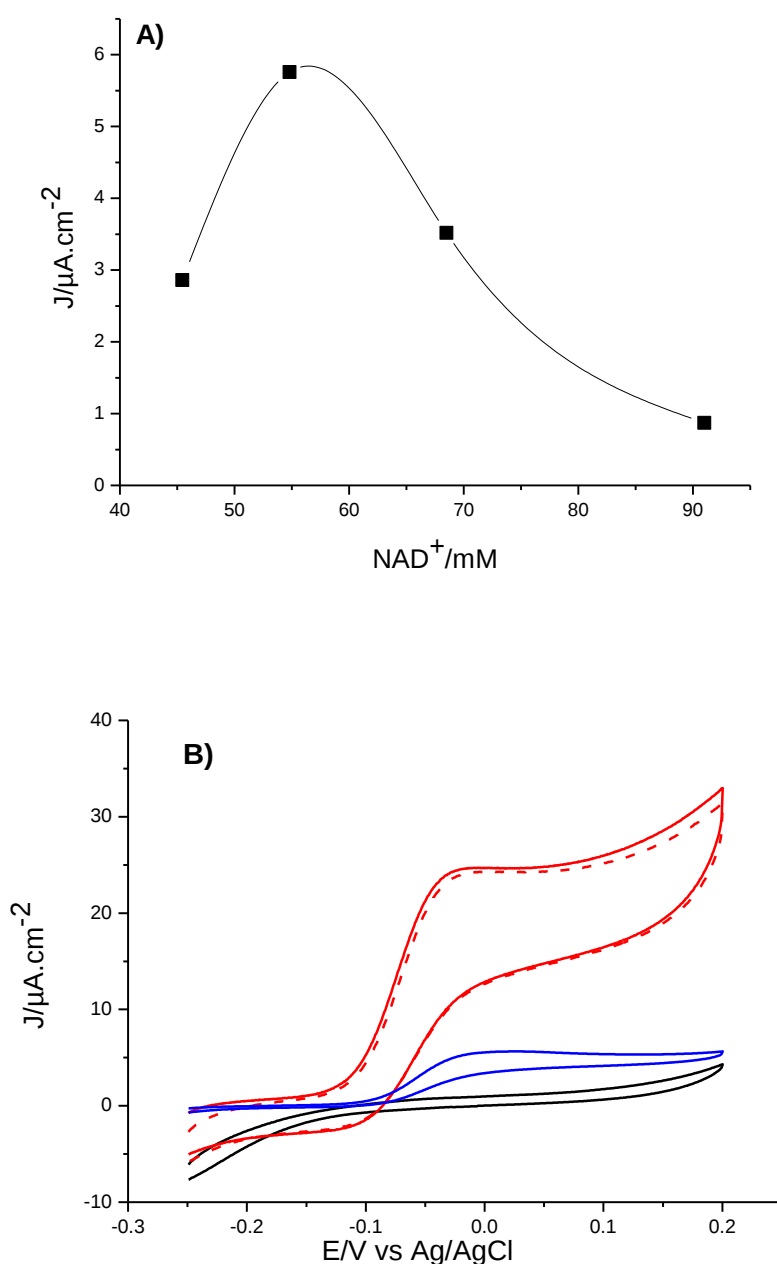


Figure 130 Oxydation du D-sorbitol par la DSDH encapsulée dans une couche de Resydrol®/PDDA contenant des AuNPs modifiées par une monocouche auto-assemblée de CTNFM ; A) comparaison des courants catalytiques en fonction de la concentration en NAD^+ de la solution ajoutée au mélange contenant le Resydrol® et les AuNPs fonctionnalisées avant l'électrodéposition, B) comparaison du signal d'oxydation du D-sorbitol lorsque le système est déposé sur une électrode plane (bleu), et sur une électrode présentant 3/2 couches (rouge), même électrode mesurée 20 min après (rouge pointillé). Le signal redox du CTNFM pour l'électrode plane est tracé en référence (noir). 8 mM D-sorbitol, 1 mM NAD^+ , 100 mM TRIS pH=9, $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

Même si l'intensité du signal électrocatalytique est plus faible que lorsque le système possède de la DI, la construction supramoléculaire, de par la simplification du système enzymatique qu'elle instaure, peut être utilisée dans d'autres applications bio-électrochimiques.

7.4 Conclusion

Le travail présenté dans ce chapitre a mis en valeur l'intégration d'une démarche d'optimisation déployée sur plusieurs échelles, en partant de l'échelle supramoléculaire jusqu'à l'échelle micrométrique, dans un unique système afin de produire une bio-électrocatalyse hautement efficace [6]. Le schéma de ce dispositif est proposé dans la Figure 131. Ce travail a permis d'observer une synergie des différentes conceptions structurales établies sur plusieurs échelles, pour pouvoir aboutir à un dispositif dont les performances globales sont optimisées.

Le procédé mis en place a consisté dans un premier temps à modifier la surface de l'électrode par une monocouche auto-assemblée adsorbée de médiateur, utilisé comme transducteur d'un système enzymatique immobilisé dans une couche de polymère électrodéposée (Fig. 131 a)). De plus il a été prouvé que des nano-particules d'or, également fonctionnalisées par le médiateur, peuvent être insérées dans la matrice d'encapsulation des biomolécules, permettant alors d'augmenter de façon significative la surface active disponible pour la réaction catalytique grâce au « hopping »/transport d'électrons partant des Au NP jusqu'à l'électrode (Fig. 131 b)). Par ailleurs, l'optimisation de la réaction bio-catalytique a été d'autant plus perfectionnée que le système a montré une importante augmentation de l'intensité catalytique lorsque l'immobilisation de celui-ci est effectuée dans des électrodes macroporeuses (Fig.131 c)). Pour finir, l'interaction supramoléculaire entre médiateur et cofacteur instaurée par la présence du Ca^{2+} rend possible non seulement une simplification du système, mais aussi l'intégration de tous les composants de la chaîne électrocatalytique dans la couche d'immobilisation de Resydrol®.

Les électrodes macroporeuses de la taille finale requise par le réacteur pilote, peuvent donc être modifiées par cette construction catalytique et être testées sous flux, dans le prototype du réacteur.

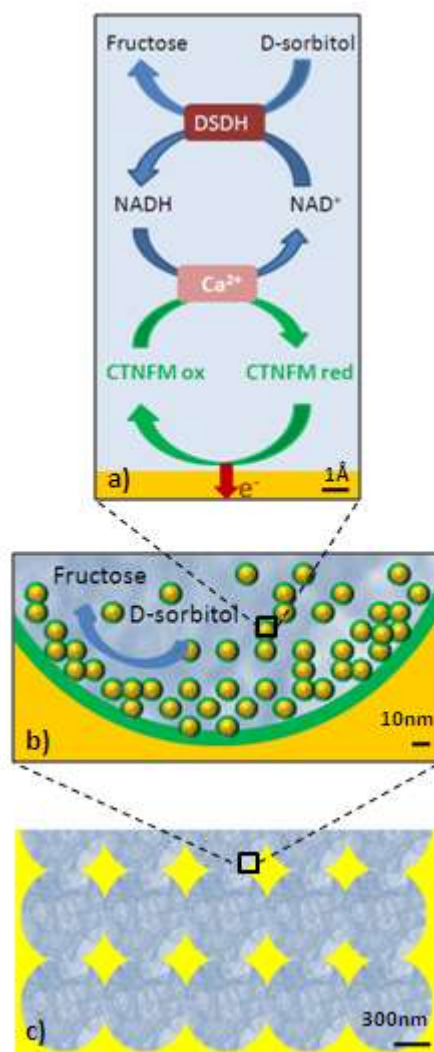


Figure 131 Schéma du dispositif final : le contrôle à plusieurs échelles, de la microstructure de l'électrode macroporeuse, jusqu'à l'organisation supramoléculaire du système biocatalytique, rend possible la réalisation d'un dispositif bio-électrocatalytique optimisé. a) surface des Au NP modifiées par le CTNFM peuvent interagir avec le système biocatalytique simplifié par construction supramoléculaire pour effectuer l'oxydation du D-sorbitol dans la couche d'encapsulation de PED, b) section de l'intérieur d'un pore dont la surface est fonctionnalisée par une monocouche de CTNFM mis en contact avec le système bio-catalytique immobilisé par une couche de polymère électrodéposée dopée par des Au NP fonctionnalisées, c) schéma d'une coupe transverse d'une électrode macroporeuse recouverte de la peinture électrophorétique [6].

Références Bibliographiques

- (1) Kurzawa, C.; Hengstenberg, A.; Schuhmann, W. *Analytical Chemistry* **2001**, 74, 355.
- (2) Vilkanauskyte, A.; Erichsen, T.; Marcinkeviciene, L.; Laurinavicius, V.; Schuhmann, W. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, 17, 1025.
- (3) Ngounou, B.; Guschin, D. A.; Castillo, J.; Schuhmann, W. In *ECS Transactions*; 6 ed. San Francisco, CA, 2009; Vol. 19, p 119.
- (4) Isik, S.; Oni, J.; Rjabova, V.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W. *Microchimica Acta* **2004**, 148, 59.
- (5) Szamocki, R.; Velichko, A.; Mücklich, F.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, 2121.
- (6) Bon Saint Côme, y. a.; Lalo, H.; Wang, Z.; Etienne, M.; Gajdzik, J.; Kohring, G.-W.; Walcarius, A.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Langmuir* **2011**, 27, 12737.

Chapitre 8

Test du bioréacteur électrochimique

8 Test du bioréacteur électrochimique

Les travaux précédemment présentés ont permis de décrire les méthodes d'élaboration de l'électrode de travail du réacteur destinée à être incorporée dans la cellule de synthèse électrocatalytique dimensionnée à l'échelle pilote. Avant de procéder au test de celle-ci, l'optimisation des voies d'immobilisation des biomolécules rédox constituant la chaîne électrocatalytique responsable de la synthèse des produits ciblés, a été réalisée et a en outre permis de définir différentes voies de rétention du système complet, du médiateur aux enzymes, sans omettre le cofacteur à la surface de l'électrode. Les intensités des phénomènes catalytiques ont été maximisées de façon à assurer des rendements espace/temps satisfaisants. Il s'agit à présent de tester ces électrodes dans l'application finale du réacteur, où le milieu réactionnel contenant le réactif initial est mis en mouvement et alimente le réacteur sous forme de flux continu.

8.1 Description du dispositif

La construction du réacteur s'est déroulée chez nos collaborateurs de l'Université de la Sarre à Saarbruck. Elle se base sur l'élaboration d'une cellule à flux, c'est-à-dire l'armature dans laquelle sont insérées les deux catégories d'électrodes, la contre électrode (CE) et l'électrode de travail (ET). Cette cellule, tenant lieu de prototype, est faite à partir de polyoxométhylène (POM), polymère thermoplastique présentant une haute stabilité thermique. La cellule est scellée par une plaque métallique vissée sur l'ensemble du dispositif, l'étanchéité de celui-ci étant en partie assurée par des joints de plastique disposés aux points de contact des différentes parties de la cellule (Fig. 132).

Le flux aqueux contenant le réactif de départ circule dans le compartiment de la cellule en contact avec l'ET. En revanche le flux de gaz, servant à réaliser la contre réaction sur la CE, qui est en l'occurrence une électrode à diffusion de gaz (Gaz Diffusion Electrode « GDE »), circule dans le compartiment supérieur, l'étanchéité entre les deux étant assurée grâce à la membrane de Nafion®. On rappelle que si on réalise une réaction de réduction à l'ET, alors la CE doit effectuer une oxydation, en l'occurrence l'oxydation du H_2 en H^+ . Dans le cas contraire d'une réaction d'oxydation sur l'ET alors la réduction de O_2 en H_2O sera exécutée au niveau de la GDE. La présence d'une grille de POM entre les compartiments de l'ET et de la GDE permet en outre de protéger la membrane Nafion® des contraintes mécaniques dues aux pressions simultanées des flux liquides et gazeux de la cellule.

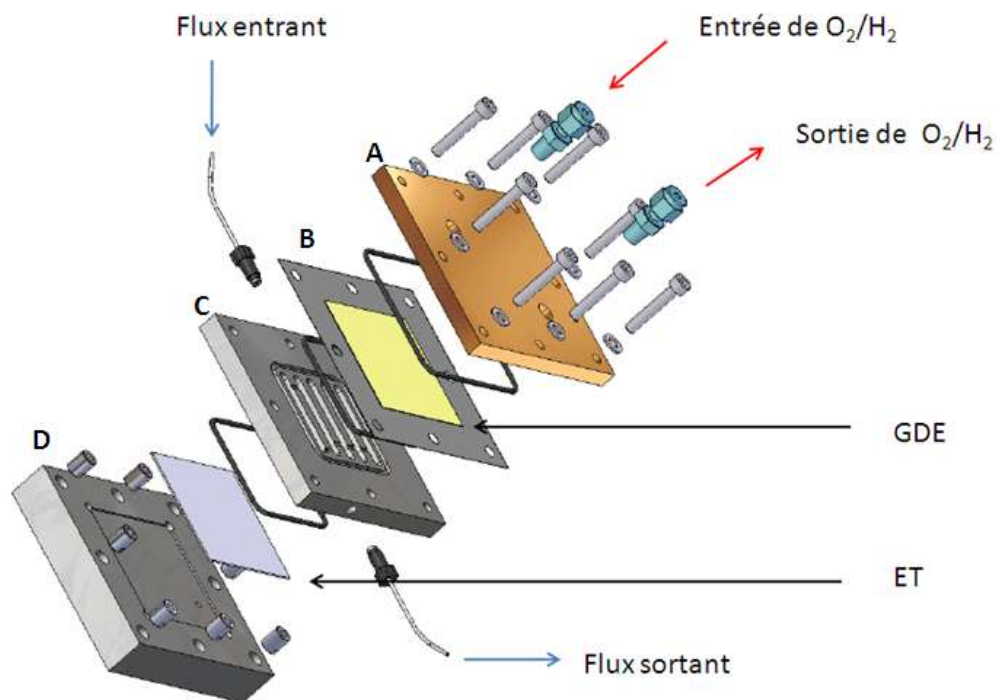


Figure 132 Schéma éclaté du réacteur : A) plaque de scellage, B) GDE, C) grille, D) électrode de travail insérée dans son socle

Dans les clichés ci-dessous on observe la GDE (Fig. 2 B), dont la partie transparente est la membrane Nafion® et la partie noire celle de carbone mélangé au catalyseur de platine (voir chapitre 2). L'ET est insérée dans son socle de POM (Fig. 2 D).

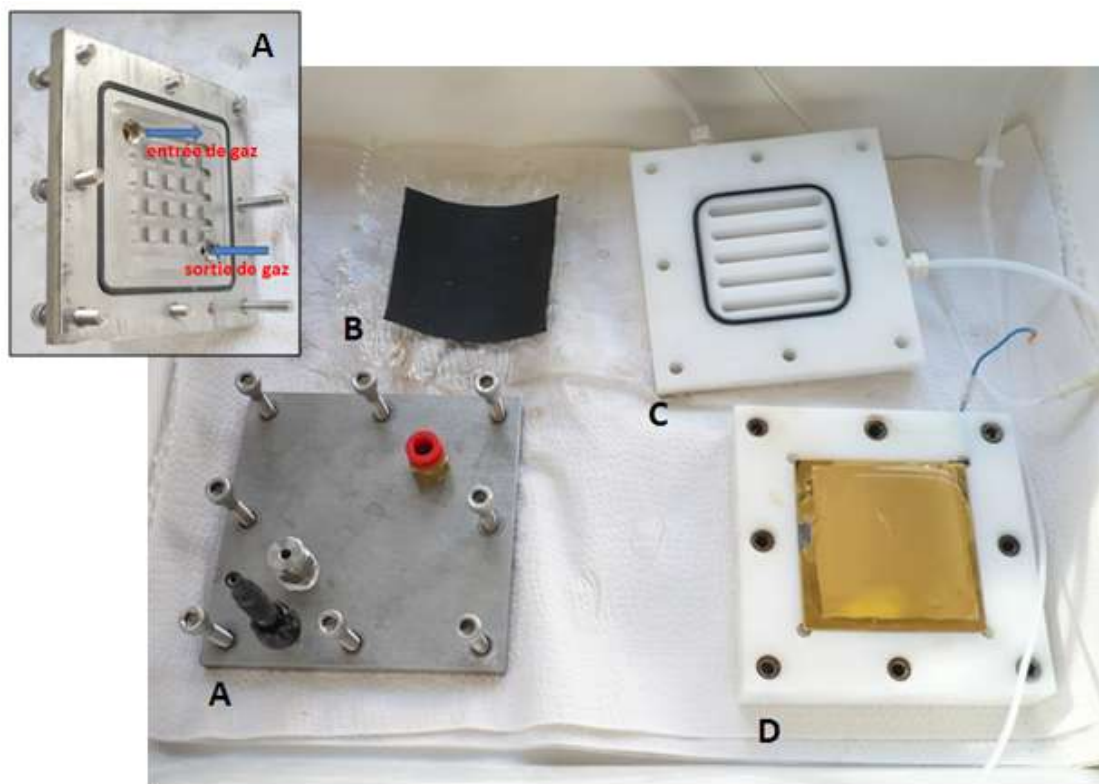


Figure 133 Réacteur décomposé: A) plaque de scellage, B) GDE, C) grille, D) électrode de travail insérée dans son socle

Afin d'alimenter le réacteur en réactif sous forme de flux continu, celui-ci est relié à une pompe (Fig.134). On observe sur le cliché ci-dessous que la référence (ER) est prise au niveau de la CE.

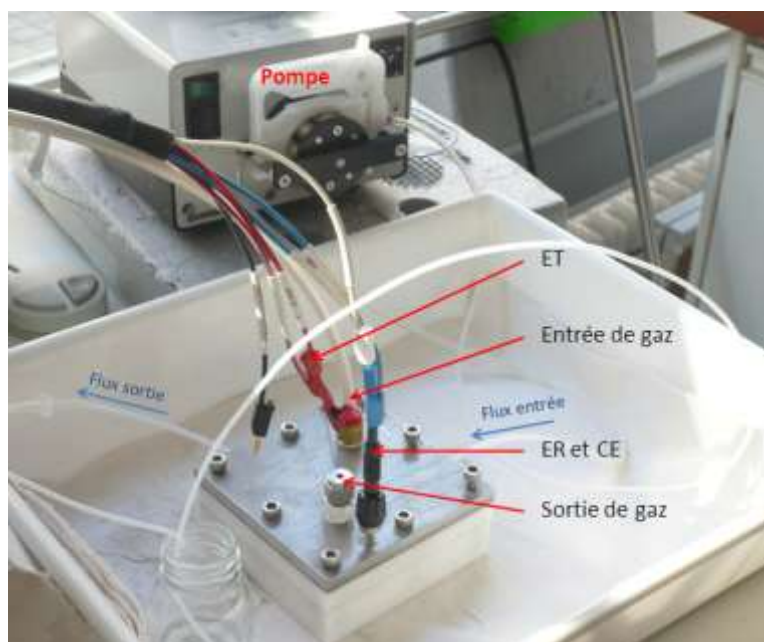


Figure 134 Réacteur sous flux relié à la pompe

8.2 Réduction du peroxyde d'hydrogène

L'objectif des expériences qui vont suivre est d'étudier le comportement des électrodes d'or macroporeuses quand elles sont utilisées dans une cellule électrochimique soumise à un flux continu. Dans un premier temps, nous allons étudier les courbes classiques de voltammétrie cyclique d'une surface d'or placée dans une solution de K_2SO_4 dans le but de valider la position des pics caractéristiques d'oxydation et de réduction du métal. L'emploi de H_2SO_4 est proscrit dans le réacteur dans la mesure où il attaque et dégrade la CE. En effet cette étape est nécessaire parce que, contrairement aux mesures présentées dans les chapitres précédents, il ne s'agit plus de mesures conventionnelles effectuées dans un dispositif à trois électrodes (ER, ET, CE) où la référence était une électrode $Ag/AgCl$ saturée, mais dans un dispositif à seulement deux électrodes, où la référence est en même temps la contre électrode. Ceci occasionne par conséquent des décalages de potentiels entre ces deux systèmes. Par exemple, il a été observé expérimentalement que les mesures effectuées lorsque le système réalise à la contre-électrode l'oxydation de l'hydrogène présentent des potentiels décalés de 0.1 V environ comparés à ceux relevés lorsque les expériences sont conduites dans une cellule à trois électrodes avec pour référence une électrode normale à hydrogène (normal hydrogen electrode « NHE »), voir Fig. 135 A et B. De même, si dans le réacteur la contre-réaction est la réduction de l'oxygène, alors les potentiels des mesures seront décalés de -0.4 V par rapport à celles qui auraient été obtenues versus la NHE. On relève également que lorsque le milieu réactionnel est mis en mouvement, cela n'impacte pas la position des pics lorsque la contre réaction est l'oxydation du dihydrogène (Fig. 135 B), en revanche s'il s'agit de la réduction du dioxygène, des

valeurs croissantes du flux occasionnent un décalage des potentiel vers les valeurs positives (Fig. 135 C).

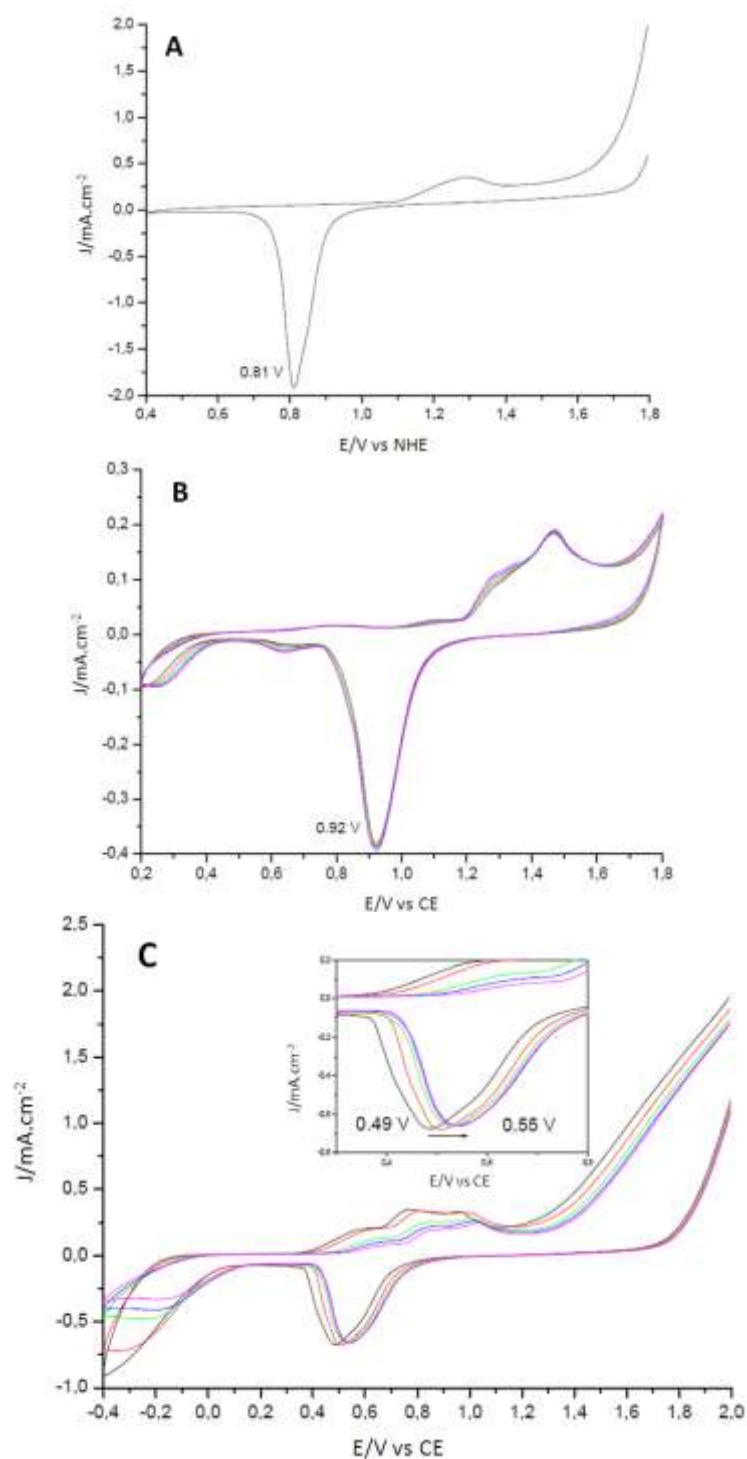


Figure 135 Caractérisation d'électrodes d'or planes dans 0,5 M K_2SO_4 : les pics caractéristiques de l'oxydation de l'or et de la réduction de l'oxyde d'or sont mesurés dans les conditions standards d'une cellule électrochimique constituée de trois électrodes dont une électrode de référence NHE (A) et dans les conditions de la cellule du réacteur avec un dispositif à deux électrodes où la référence est prise à la GDE alimentée par du dihydrogène (B) ou de l'oxygène (C). Pour les graphes B et C les mesures sont faites sans flux (noir) et avec (rouge : $2 mL.min^{-1}$, vert : $7 mL.min^{-1}$, bleu : $13 mL.min^{-1}$, rose : $25 mL.min^{-1}$). $v=100 mV.s^{-1}$.

La première réaction réalisée sur électrodes poreuses insérées dans le réacteur et mesurée sous l'action d'un flux est la réduction du peroxyde d'hydrogène. Cette réaction a été sélectionnée car elle présente une cinétique de réaction lente (cf chapitre 5) et permet donc a priori au substrat de diffuser dans l'intégralité de la structure poreuse avant qu'il ne réagisse entièrement avec la surface de l'électrode. Les mesures sont faites à partir d'une solution de K_2SO_4 à 0.5 M présentant une concentration en H_2O_2 de 10 mM. Dans un premier temps la mesure est réalisée sur une électrode de 5 demi-couches sans flux, c'est-à-dire que le milieu réactionnel n'est pas mis en mouvement par la pompe (courbe noire de la Fig. 137). Ensuite les mesures intensité versus potentiel sont effectuées alors que la pompe est actionnée et par conséquent, dans ces conditions, le milieu réactionnel n'est plus à l'état statique mais en mouvement. Les mesures opèrent donc dans des conditions dynamiques, assurant de cette façon un apport continu de réactif à l'électrode, qui ne doit alors plus mesurer de phénomènes limités par un transport de masse au sein de la cellule. Bien évidemment, un phénomène de limitation du transport de masse sera toujours présent au sein de la couche de diffusion, l'agitation due au flux permet seulement de limiter les phénomènes d'appauvrissement dans la cellule du réacteur. Toutefois il est important de considérer que les conditions dynamiques ne seront pas comparables dans les différentes couches de pores constituant l'électrode : la demi couche de pores supérieures en contact direct avec le milieu réactionnel subira les effets du flux de façon plus marquée que celle se trouvant à la base de la structure (voir Fig. 136). Il apparaît donc important de déterminer à partir de quelle valeur du flux, l'électrode macroporeuse émet un signal électrochimique caractéristique d'un système étudié dans des conditions dynamiques.

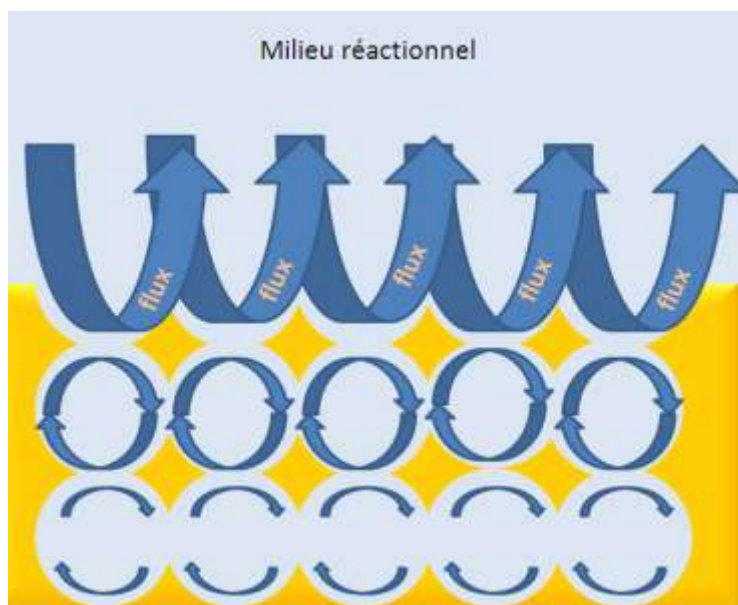


Figure 136 Schéma des différentes intensités du flux ressenties dans les différentes couches de la structure de l'électrode macroporeuse

Lorsque les mesures de réduction de H_2O_2 sont effectuées dans des conditions statiques, le système, limité par un phénomène de diffusion du substrat, génère des courbes intensité vs potentiel présentant une diminution de l'intensité du courant passé le potentiel du pic de réduction, comme

c'est le cas pour la courbe noire de la Figure 137. En revanche lorsque les mesures sont relevées alors que le milieu réactionnel est mis en mouvement, un plateau en intensité est enregistré sur la gamme des potentiels inférieurs à celui du pic de réduction. Cette observation indique que le système n'est plus limité par la diffusion des espèces dans la cellule grâce à un transport de masse suffisant, qui est dans le cas présent assuré par un apport permanent de substrat fourni par le flux circulant dans le réacteur. Les courbes de la Figure 137 permettent en outre d'indiquer d'une part que le fonctionnement de l'électrode poreuse sous flux permet d'augmenter l'intensité de la réaction et qu'un flux de $3,2 \text{ mL.min}^{-1}$ est suffisant pour parer, dans une structure d'électrode poreuse de 5 demi-couches, aux limitations dues à la diffusion. Il assurera donc *a fortiori* pour des électrodes moins épaisses (1 et 3 demi-couches de pores) des conditions dynamiques dans l'intégralité de leur structure. Le flux de $16.25 \text{ mL.min}^{-1}$ permettant d'obtenir des intensités plus importantes, sera donc appliqué pour les mesures suivantes.

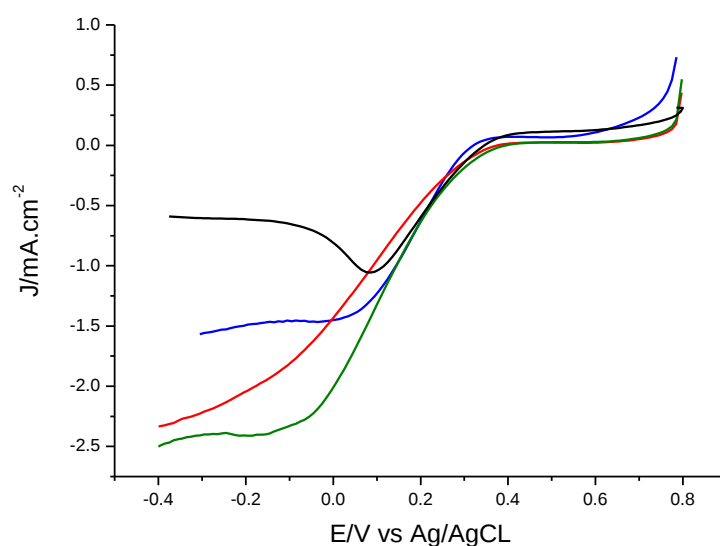


Figure 137 Courbes intensité vs potentiel de la réduction H_2O_2 à la surface d'une électrode poreuse de 5 demi-couches à différents flux appliqués à la cellule du réacteur : sans flux (noir), 3.2 mL.min^{-1} (rouge), 13 mL.min^{-1} (bleu), $16.25 \text{ mL.min}^{-1}$ (vert). $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, $0.5 \text{ M K}_2\text{SO}_4$, $v=10 \text{ mV.s}^{-1}$.

La Figure 138 A permet d'évaluer l'efficacité des électrodes macroporeuses lorsque celles-ci doivent réagir avec un milieu réactionnel en mouvement. Plus l'électrode est épaisse, plus l'intensité du signal de réduction enregistrée est importante. La Figure 138 B souligne que l'augmentation de l'intensité du signal évolue linéairement avec l'augmentation de l'épaisseur de l'électrode testée. Toutefois la mesure du facteur d'augmentation f montre que celui-ci est inférieur à sa valeur théorique calculée (cf chapitre 5.1). En effet pour 1, 3 et 5 demi-couches on obtient des valeurs de f de 1.22, 1.55 et 1.95 respectivement, inférieures aux valeurs théoriques (1.81, 5.43 et 9.06). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à flux égal, sur deux électrodes d'épaisseurs différentes, le renouvellement en réactif sera plus efficace pour l'électrode présentant l'épaisseur la plus faible. Pour conclure, dans ces conditions, la contribution des différentes demi-couches de pores de

l'électrode envers l'intensité du signal catalytique n'est pas comparable suivant leur position et leur profondeur au sein de la structure poreuse qu'elles constituent.

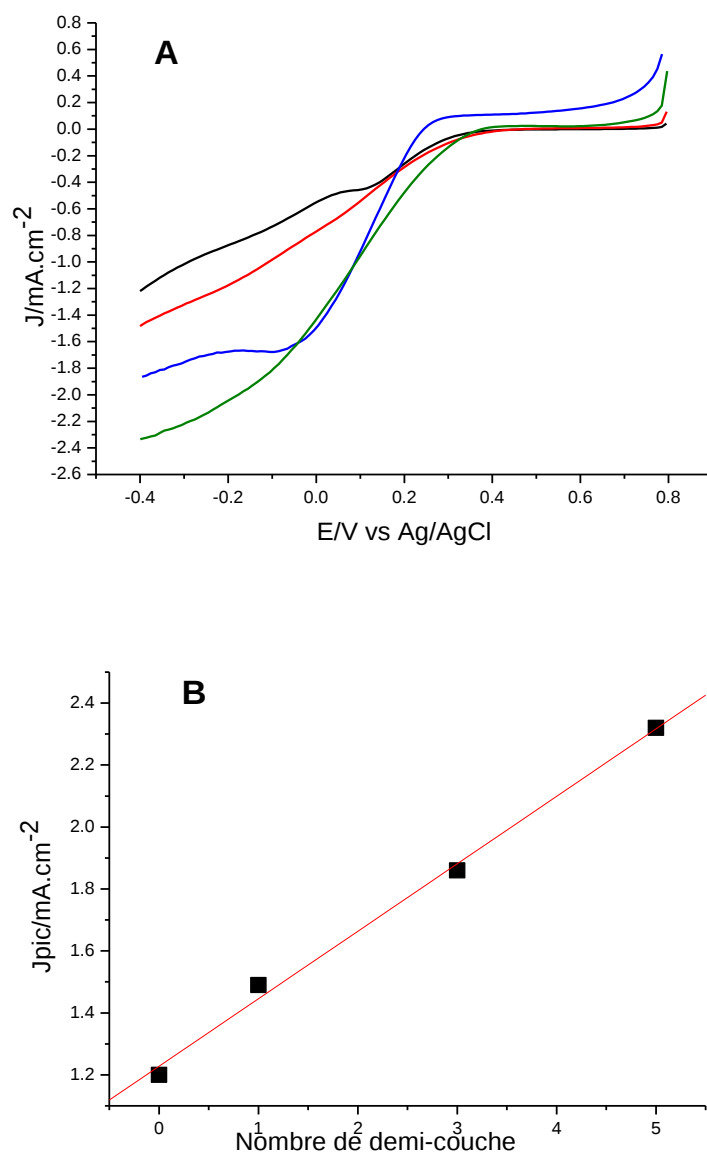


Figure 138 A) Courbes intensité vs potentiel de la réduction H_2O_2 à la surface d'électrodes poreuses sous un flux de $16.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ appliqués à la cellule du réacteur : électrode plane (noir), électrode d'1 demi-couche (rouge), électrode de 3 demi-couches (bleu), électrode de 5 demi-couches (vert). B) Densité de courant prises à -0.4 V en fonction de l'épaisseur de l'électrode sur laquelle la mesure est effectuée. $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, $0,5 \text{ M K}_2\text{SO}_4$, $v=10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

8.3 Mise en marche des électrodes à structure optimisée dans le réacteur à flux

8.3.1 Procédure d'électrodépôt

L'oxydation du D-sorbitol par la chaîne enzymatique constituée en partie de la déshydrogénase DSDH peut être réalisée au sein du réacteur grâce aux développements de procédures d'immobilisation permettant le maintien de tout le matériel électrocatalytique à la surface de l'électrode macroporeuse. Il s'agit à présent de tester l'efficacité des telles électrodes dans les conditions du réacteur, c'est-à-dire lorsque le milieu réactionnel est mis en mouvement sous forme de flux continu traversant la cellule du réacteur.

Comme présenté dans le chapitre 4, les électrodes de travail du réacteur ont pu être réalisées suivant les dimensions du réacteur pilote grâce à l'élaboration du template de cristal colloïdal par la méthode de Langmuir-Blodgett. Or les deux voies d'immobilisation développées, celle obtenue par électrogénération d'une couche ultra-mince de silice et celle par électroprécipitation d'une couche de polymère, nécessitent une cellule de dépôt adaptée à la taille de l'électrode à modifier. Celle-ci est présentée dans le cliché photographique suivant :

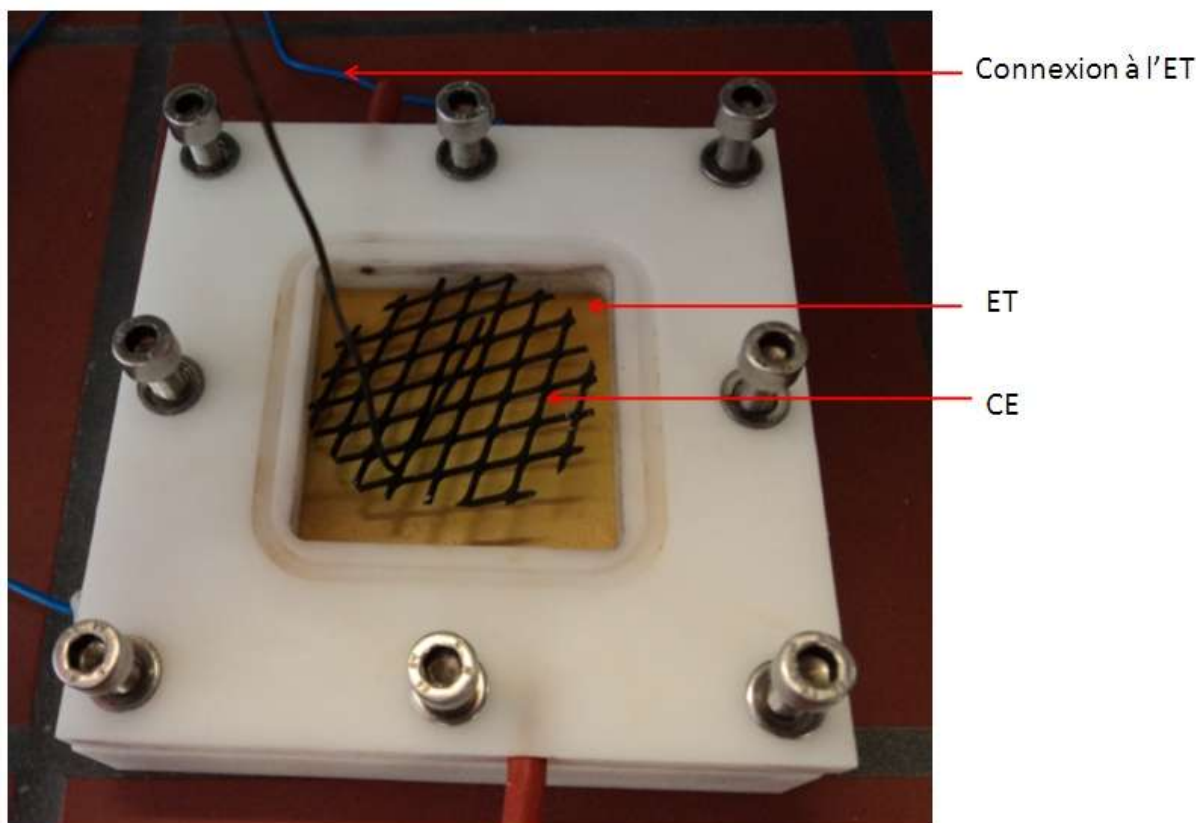


Figure 139 Cliché de la "cellule de déposition", comprenant l'électrode de travail et la contre-électrode, l'électrode de référence n'étant pas présente sur ce cliché.

Les modifications de surface de l'ET se déroulent suivant les procédés décrits dans la partie 6.2.2 pour l'électrogénération de la couche d'encapsulation de Silice et dans la partie 7.2 pour la déposition électrochimique du Resydrol®.

Comme la réaction en jeu à l'ET est l'oxydation du D-sorbitol, la réaction de réduction du dioxygène à la CE doit être mise en place grâce à l'alimentation de la GDE par un flux continu de O₂.

8.3.2 Mesures ampérométriques de l'électrosynthèse

Au terme du chapitre 7, nous avons pu observer que l'immobilisation complète du système était plus performante lorsque les biomolécules étaient retenues dans la matrice de polymère électrodéposé. Ainsi une électrode plane et des électrodes macroporeuses de 1 et 3 demi-couches d'une surface géométrique de 36 cm² sont modifiées par une couche de Resydrol®/PDDA contenant les nanoparticules d'or fonctionnalisées par le CTNFM ainsi que les biomolécules la DSDH, le Ca²⁺ et le cofacteur NAD⁺ suivant les mêmes proportions que celles définies dans la partie 7.3. Ce système permet d'opérer avec seulement le substrat, le D-sorbitol, dissous dans le flux réactionnel et diffusant dans la couche de polymère électrodéposé pour réagir avec les sites électrocatalytiques.

Après électrodépôt de la couche bioélectrocatalytique, les électrodes sont rincées et séchées. Elles sont conservées au minimum deux heures sous azote afin d'éliminer l'oxygène de la couche d'encapsulation. Elles sont ensuite insérées dans le réacteur.

En premier lieu, on procède à l'étape d'activation du médiateur qui s'effectue alors que le flux de solution tampon n'est pas mis en mouvement par la pompe. Une fois cette étape effectuée, on injecte la solution tampon dans laquelle le substrat est dilué (2 mM D-sorbitol) avec un débit de 3 mL.min⁻¹. Ce débit a été choisi car d'une part il semble suffisant pour créer un état dynamique à la surface d'une électrode de 5 demi-couches donc à plus forte raison pour une électrode de 3 demi-couches (cf Figure 137) et d'autre part, on le choisit relativement faible pour ne pas engendrer de trop grandes perturbations hydrodynamiques au voisinage de la couche d'encapsulation, qui pourraient induire des phénomènes de fuite des biomolécules. Il est important de relever que malgré la mise en mouvement du milieu réactionnel, l'accès du substrat aux sites enzymatiques sera toujours dépendant du phénomène de diffusion au travers de la couche d'encapsulation. D'après les courbes de voltammétrie cyclique présentées dans la partie 7.3 du chapitre précédent on sait que la catalyse de l'oxydation du D-sorbitol est opérationnelle pour un potentiel supérieur à -0.1 V. En prenant en compte les décalages en potentiel induits par la prise de référence au niveau de la GDE, on en déduit qu'avec la configuration de la cellule du réacteur, l'oxydation du substrat s'amorce à partir d'un potentiel de -0.5 V. On procèdera par conséquent à des mesures chronoampérométriques pour un potentiel fixé à -0.3 V pour assurer une intensité de catalyse suffisante. Les premiers résultats très prometteurs sont présentés dans la figure suivante, qui expose les courbes obtenues

suite aux mesures chronoampérométriques des trois types d'électrodes (plane, 1 et 3 demi-couches) :

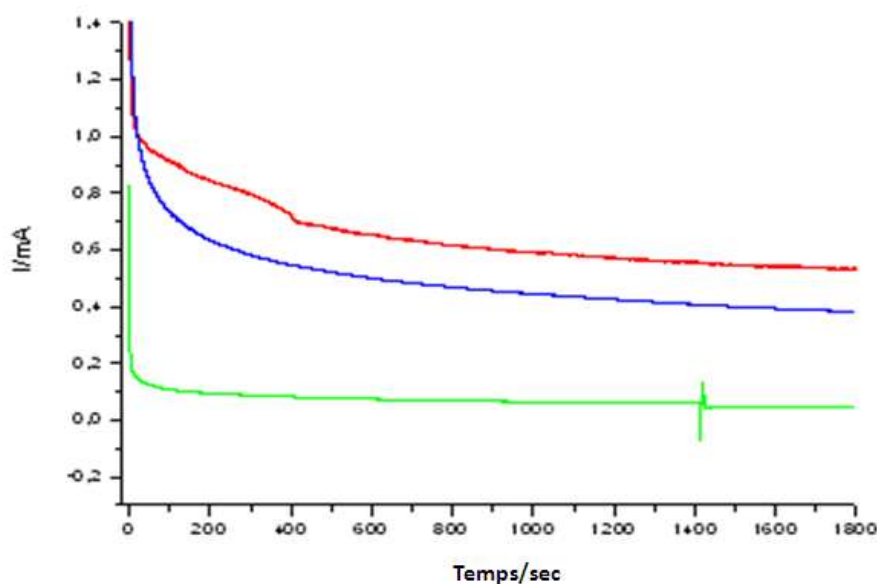


Figure 140 Mesures chronoampérométriques d'électrodes d'or présentant différentes épaisseurs, modifiées par une couche de Resydrol®/PDPA/AuNP contenant la DSDH, du NAD^+ et du Ca^{2+} : électrode plane (verte), électrode d'1 demi-couche (rouge), de 3 demi-couches (bleu). 2 mM D-sorbitol, 100 mM TRIS pH=9 E(V)=-0.3 V.

Si l'on compare les mesures obtenues entre une électrode plane et une électrode d'une demi-couche, on observe une augmentation du signal. Ce premier résultat souligne l'intérêt de la démarche de nanostructuration contrôlée du matériau d'électrode pour le bon fonctionnement du réacteur. En effet, augmenter de cette manière l'intensité de la catalyse impacte directement de façon positive le rendement final du dispositif.

Il est possible de calculer la quantité de substrat transformé (M en mol) grâce à la charge mesurée sur chaque chronoampérogramme (Q en C) à partir de la relation suivante, où F est la constante de Faraday :

$$M = \frac{Q}{nF}$$

D'après les calculs, la quantité de D-sorbitol transformée s'évalue à $4.5 \cdot 10^{-6}$ mol pour l'électrode plane, $13.4 \cdot 10^{-6}$ mol pour l'électrode de 1 demi-couche et $12.5 \cdot 10^{-6}$ mol pour l'électrode de 3 demi-couches. Sachant que le flux de D-sorbitol présente une concentration de 2 mM et qu'il a circulé à $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ dans la cellule, on évalue la quantité de D-sorbitol initiale susceptible de réagir à $192 \cdot 10^{-6}$ mol. Il apparaît donc possible de calculer le rendement pour chacune des électrodes, soit de 2.3 % pour l'électrode plane, 6.5 % pour l'électrode d'une demi-couche, et de 6.9 % pour celle de 3.

En revanche, l'intensité de catalyse mesurée à partir de l'électrode de 3 demi-couches se révèle être inférieure à celle obtenue à partir d'une électrode d'une demi-couche. Même si à ce jour ce résultat

n'est pas entièrement expliqué, il apparaît fort probable qu'un piégeage inefficace des enzymes dans l'intégralité de la structure de cette électrode en soit la cause.

8.4 Conclusion

Ce dernier chapitre a permis de présenter les premiers résultats relatifs à la mise en fonctionnement du bioréacteur électrochimique réalisant l'électrosynthèse de sucres par biocatalyse. Les électrodes, optimisées par les différentes études présentées dans ce manuscrit, ont été testées dans leur application finale et ont pu révéler quelques premiers résultats encourageants concernant les performances du bioreacteur.

Ces résultats préliminaires obtenus avec le réacteur ouvrent la voie à de plus amples investigations. Des perspectives futures devront s'orienter sur l'évaluation et optimisation du rendement du réacteur. Celles-ci devront s'organiser autour de l'expérimentation sur des échelles de temps plus longues, afin d'établir en partie des conclusions sur la stabilité du système et sur d'éventuels relargages du matériel biocatalytique dans le milieu réactionnel. Une analyse des produits dans le flux sortant en HPLC devra être également effectuée afin de pouvoir déterminer avec précision la quantité de produit synthétisé par le dispositif, et par conséquent pouvoir définir les rendements du dispositif. Enfin des électrodes d'épaisseurs plus conséquentes doivent être testées dans le but d'optimiser encore plus le processus d'électrosynthèse.

Conclusion et perspectives

Le fil directeur de ce travail de thèse est principalement articulé autour de la réalisation de l'électrode de travail d'un bioréacteur électrochimique. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à la structure du matériau d'électrode, à la recherche de matrices performantes pour l'encapsulation du matériel biocatalytique et également à l'optimisation de la composition du système catalytique lui-même. Ces objectifs ont été poursuivis afin d'assurer la conception d'une électrode sur laquelle se déroulent des phénomènes de biocatalyse dont l'intensité est optimisée.

Dans un premier temps nous avons cherché à réaliser une électrode d'or macroporeuse d'une surface avoisinant les 40 cm². Cette taille est directement définie par les dimensions du réacteur pilote dans lequel l'électrode est destinée à fonctionner. Afin d'obtenir cette structure métallique, un template de billes organisées de façon compacte, appelé cristal colloïdal, a été déposé à la surface de l'électrode à structurer. Cette étape est suivie par l'électrodépôt de l'or puis de la dissolution du template pour révéler la structure métallique poreuse finale. Ainsi, il a fallu tout d'abord explorer divers procédés permettant la réalisation d'un tel dépôt de billes ordonnées sur la surface requise, et dont l'épaisseur est contrôlée. Nous avons donc mis en évidence l'efficacité de la méthode d'assemblage par la technique de Langmuir-Blodgett, qui nous a permis de répondre parfaitement à ces critères.

Ensuite, nous nous sommes intéressés au développement d'une couche de silice ultra-mince obtenue par voie sol-gel, permettant l'encapsulation d'espèces bio-électrochimiques à la surface des électrodes macroporeuses. Le dépôt du film se produisant par électrogénération, nous avons optimisé la composition du sol et le temps d'électrodépôt afin d'assurer un recouvrement homogène de l'intégralité de l'électrode. Grâce à l'emploi d'une sonde protéique rédox, à savoir l'hémoglobine, couplé à l'observation de clichés TEM de l'intérieur des structures d'électrodes modifiées, la rétention et le maintien de l'activité catalytique de biomolécules dans l'ensemble de la structure complexe d'électrodes poreuses a pu être mise en évidence.

Dans la partie suivante, nous avons étudié l'encapsulation complète du système enzymatique dans ces mêmes couches de silice. Tout d'abord, l'amélioration de l'environnement électrostatique des enzymes s'est imposée, ce qui a permis d'assurer en outre une très bonne stabilité de la réponse électrochimique générée par ces nouvelles électrodes. Ensuite, une attention particulière a été portée sur le choix d'un médiateur pouvant s'immobiliser par adsorption à la surface de l'or et permettant de cette façon une meilleure médiation dans l'intégralité de l'épaisseur des électrodes. Enfin une meilleure intensité de catalyse a pu être obtenue par l'incorporation, dans la matrice de silice, de nanoparticules d'or fonctionnalisées par le même médiateur adsorbé. Il est intéressant de considérer que la performance du système résultant peut être mise au service d'autres dispositifs électrochimiques, ouvrant de cette façon de nouvelles voies d'exploration pour notamment le développement de biocapteurs ou biopiles efficaces. Pour finir, afin de respecter la problématique initiale d'encapsulation du système bioélectrochimique complet, différentes voies d'immobilisation du cofacteur ont été testées. Afin de palier les faibles intensités enregistrées pour ces derniers

systèmes, une voie alternative d'encapsulation du matériel enzymatique a été explorée. Il s'agit de la création de matrices de polymère générées par électroprécipitation sur la surface de l'électrode, au cours de laquelle se produit l'encapsulation. Une stratégie d'optimisation de cette couche de rétention s'est également articulée autour de l'amélioration des propriétés électrostatiques et de l'insertion des nanoparticules conductrices fonctionnalisées. Les résultats obtenus à partir des ces dernières électrodes, modifiées par les systèmes finaux intégralement immobilisés dans la couche polymère, ont révélé de meilleures intensités. Par conséquent, le prototype du réacteur pilote a été testé et mis en marche avec celles-ci.

Pour conclure, les électrodes finales, obtenues suites à ces différentes optimisations, présentent une architecture complexe, conçues et organisées sur plusieurs échelles. En effet, la structure micrométrique du squelette métallique de l'électrode est obtenue par la réalisation de pores interconnectés et hautement ordonnés. Ensuite les couches micrométriques à nanométriques d'encapsulation, sont à l'origine de phénomènes catalytiques d'intensité hautement amplifiée grâce à l'incorporation de nanoparticules fonctionnalisées. Enfin différents jeux de piégeage et de rétention du cofacteur montrent que la maîtrise des interactions à l'échelle moléculaire entre les différents éléments de la chaîne catalytique permet de répondre efficacement aux problématiques de réalisation du bioréacteur.

Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour la réalisation de nouveaux dispositifs électrochimiques faisant appel à des électrodes sur lesquelles des phénomènes biocatalytiques prennent place. Suivant l'enzyme à encapsuler et donc, de la charge spécifique que porte cette protéine, une modification des additifs chargés de la couche d'encapsulation est à envisager. La fonctionnalisation des nanoparticules par différentes molécules peut également être à la base de nouvelles voies de recherche pour l'optimisation d'interfaces performantes que l'on peut retrouver non seulement dans la majorité des applications électrochimiques, mais aussi dans les cellules photovoltaïques ou les transistors.

Les résultats préliminaires encourageants obtenus avec le bioréacteur mis en fonctionnement, soulignent l'étendue des études et recherches à déployer pour maîtriser et améliorer le fonctionnement du dispositif final. Il apparaît nécessaire de tester le réacteur sur des temps plus longs, pour connaître la durée de vie du dispositif. Ensuite une analyse du flux sortant permettra d'évaluer le rendement du réacteur et soutiendra l'orientation des optimisations à effectuer. Ces dernières devront porter sur l'épaisseur optimale des électrodes de travail à insérer et sur les valeurs de flux définissant en partie les temps de séjour des réactifs dans la cellule. De futures expérimentations permettront également de répondre aux questions suivantes : faut-il appliquer le flux en continu ou par intermittence, et si c'est le cas qu'elles doivent être les temps de repos et ceux de circulation? Faut-il créer une boucle de recyclage du flux sortant réinjecté dans la cellule pour améliorer le rendement ? La modélisation des profils de concentrations des produits à l'intérieur de la cellule et de l'électrode même constituera un excellent outil de compréhension du dispositif, support de plus amples perfectionnements. Nous espérons que le bioréacteur final, fonctionnant avec l'électrode optimisée réalisée au cours de cette thèse, puisse démontrer une viabilité compétitive afin de pouvoir s'imposer comme une réelle alternative écologique pour la synthèse et production de nombreuses molécules d'intérêt.

Annexes

A 1

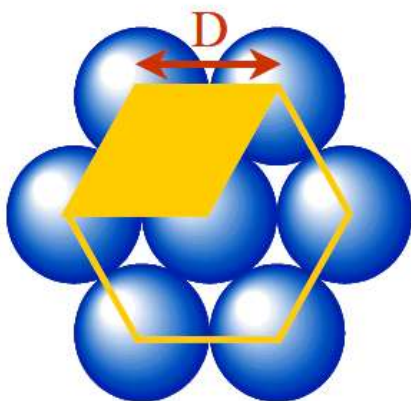
- **Prétraitement des billes avant épandage**

Les particules de silice synthétisées au préalable suivant la réaction décrite dans le chapitre 3, sont conservées dans de l'eau distillée afin de préserver leurs groupements de fonctionnalisation (chaîne alkyle terminée par une fonction amine et fonction alcool). Cependant les particules colloïdales destinées à former le film de Langmuir doivent être dispersées dans un solvant respectant plusieurs critères que ne remplit pas l'eau. En effet, celui-ci doit tout d'abord être non miscible avec l'eau et doit pouvoir s'étaler facilement à la surface de celle-ci. Ensuite il doit être un bon dispersant pour les particules et son point d'ébullition doit être aussi bas que possible afin de s'évaporer rapidement à température et pression ambiante. Le chloroforme (CHCl_3) répondant à tous ces critères, est de ce fait couramment utilisé pour l'épandage de molécules amphiphiles. Il s'agit donc du solvant que l'on emploie pour effectuer l'épandage des billes de silice. D'après les travaux de Reculosa *et al* décrits dans la littérature, les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les billes sont dispersées dans un mélange chloroforme-éthanol (80-20 %_{vol}). Les billes doivent donc être transférées de leur solvant de conservation (l'eau) à celui d'épandage (le mélange de chloroforme et d'éthanol). Pour ce faire, on effectue plusieurs cycles de lavage de la suspension aqueuse initiale par l'éthanol. Cela consiste à disperser et centrifuger plusieurs fois un prélèvement de cette suspension dans un nouveau volume d'éthanol afin d'éliminer toute trace d'eau. Au final une fois que les billes sont redispersées dans un volume minimal d'éthanol absolu, on complète la solution par la quantité de chloroforme appropriée pour atteindre les bonnes proportions eau-éthanol.

A 2

- **Calcul de l'aire du film de Langmuir**

A fort taux de compression du film, les nanoparticules sont organisées suivant un arrangement hexagonal dont l'aire théorique d'occupation peut être facilement déterminée. Le diamètre est déterminé par DLS (par granulométrie), la concentration en g/mL de la suspension est déduite de la masse du produit de synthèse mesurée lors de la lyophilisation des billes et du volume de suspension final dans lequel les billes sont dispersées. Ainsi en connaissant le diamètre des particules, et la masse totale de la silice colloïdale, on peut remonter, grâce à la densité de la silice colloïdale jusqu'à un nombre de particules à épandre et par conséquent à l'aire du film obtenu à partir d'un prélèvement de la suspension initiale. On note que ce calcul donne une estimation de la surface finale du film de Langmuir car lors de l'épandage et des divers lavages nécessaires à transférer les billes dans le chloroforme, des pertes de particules colloïdales sont inévitables.



Aire de la maille hexagonale :

$$\frac{3\sqrt{3}}{2} \times D^2$$

Nombre de particules par maille : 3

Aire par particule :

$$\frac{\sqrt{3}}{2} \times D^2$$

A 3

- Synthèse du complexe $[\text{Os}(\text{1-méthylimidazole})_2(\text{N,N'-diméthyl-1,1'-biimidazole})_2]^{2+/3+}$

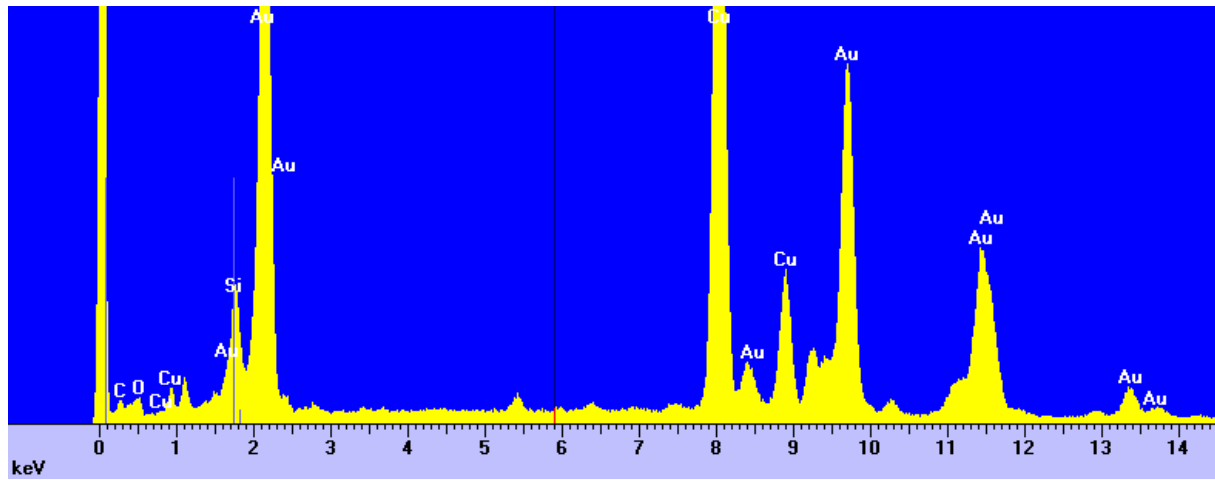
Tout d'abord il faut synthétiser le **2,2'-biimidazole**. La procédure de Fiesemann, B.F. ; Stucky, G.D. ; *Inorg. Chem.* 1978, 17, 2078. a été modifiée en substituant le gaz d'ammoniac par du NH_4OH concentré (28-30 %). Dans une solution de 40% glyoxal dans l' H_2O (101.2 g, 1.74 mol) introduite dans un ballon, refroidit dans un bain d'eau et de glace, placé sous agitation magnétique est ajouté goutte à goutte 370 mL (2.76 mole) de NH_4OH concentrée. Le taux d'addition est contrôlé afin que la température n'excède pas 30°C. Après avoir ajoutée le NH_4OH , la mélange est agité à 40-50°C pendant 24 h, puis refroidit à température ambiante. Le précipité noir est collecté par filtration sous vide, et séché à 45-50°C sous vide pendant 24 h pour donner 24 g de 2,2'-biimidazole.

Ensuite le **N,N'-diméthyl-1,1'-biimidazole** doit être synthétisé. De l'hydrure de sodium (60% huile minérale) (2,7 g, 67.5 mmol) est ajoutée sous azote à une solution de 2,2'-biimidazole (4.6 g, 34.3 mmol) sous agitation dans 100 mM de DMF anhydre maintenu à 0°C. Après avoir mélangé à température ambiante pendant 1 heure, du méthyl p-toluènesulfonate (12.8 g, 68.8 mmol) est ajouté goutte à goutte pendant 20 min dans 5 mL de DMF, grâce à une seringue. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 h, ensuite le solvant est éliminé par distillations sous vide à 50°C et le solide noire restant est trituré avec de l'hexane (50 mL) pour éliminer l'huile minérale résiduelle. Le solide est ensuite sublimé sous vide poussé à 150/170°C. The cristal incolore (rendement de 80%) sont pures. RHMN ^1H (400MHz, DMSO-d_6) : δ 7.28 (d, 2H, $J=1.6$), 7.02 (d, 2H, $J=1.6$), 3.94 (s, 6H). Calculé pour $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4$: C, 74.97 ; H, 7.55 ; N, 17.48.

Un mélange de N,N'-diméthyl-1,1'-biimidazole (1.05g, 6.48 mmol) et de $(\text{NH}_4)\text{OsCl}_6$ (1.42g, 3.24 mmol) est introduit dans 40 mL d'éthylène glycol et est mélangé sous N_2 à 140°C pendant 24 h. Pour obtenir ce premier complexe on procède à une sublimation comme précédemment. (Le potentiel standard de ce complexe est proche de -0.64 V vs NHE). Ensuite 100 mg de ce complexe est mélangé avec 2.37 mL de 1-méthyl-imidazole dans 5mL d'éthylène glycol. Le mélange est agité sous N_2 pendant 24 h à 140°C. Pour éliminer l'éthylène glycol, il faut procéder à une précipitation du produit dans de l'éther. Le produit final, subimé sous vide à 150/170°C est ensuite testé en voltammétrie cyclique afin de déterminer son potentiel standard qui doit être proche de -0.38 V.

A 4

L'image ci-dessous résulte de l'analyse EDX de la couche de silice dopée au Nanoparticules d'or. On observe que les éléments principaux sont l'or et la silice, ce qui permet de confirmer la présence des particules d'or incorporées dans la couche d'immobilisation des biomolécules.



Résumé

Dans ce mémoire nous discutons le développement de l'électrode de travail d'un bioréacteur électrochimique, dispositif permettant de synthétiser suivant un procédé dit de « Chimie Verte » des substances chimiques à haute valeur ajoutée. L'électrode de travail étant le siège de la synthèse électrocatalytique en jeu, l'optimisation de sa structure a été étudiée dans le but de maximiser l'aire de sa surface active. L'élaboration d'électrodes macroporeuses hautement organisées et de taille définie par les dimensions du prototype du réacteur pilote, a pu être obtenue en utilisant la méthode de Langmuir-Blodgett pour assembler le cristal colloïdal servant de template. La formation de ce dépôt organisé de colloïdes est suivie de l'électrodéposition du matériau d'électrode puis de la dissolution du template afin de révéler la structure macroporeuse. L'immobilisation de l'intégralité du matériel bio-électrocatalytique à l'intérieur des pores a été investiguée dans le but de prévenir la pollution du milieu contenant le produit final d'électrosynthèse par un des constituants redox et d'augmenter la durée de vie du dispositif. Ainsi, des couches ultra-minces de silice électrogénérée et des matrices de polymère électrodéposé ont été étudiées dans le but de préserver et d'optimiser l'activité enzymatique du système qu'elles encapsulent. Une attention particulière a été portée sur la qualité des dépôts au sein des structures poreuses. La procédure d'immobilisation des protéines redox dans les matrices de silice et de polymère a été en outre associée à un jeu de construction moléculaire qui a permis par l'instauration de diverses interactions électrostatiques, de retenir toutes les espèces responsables de la catalyse à la surface de l'électrode. Enfin, dans le but d'intensifier les réactions catalytiques responsables de la synthèse à réaliser, des nano-particules d'or modifiées par une couche monomoléculaire d'un médiateur redox ont été incorporées aux différents matériaux d'immobilisation permettant de ce fait d'augmenter les interfaces d'échanges électrochimiques entre matériau conducteur et biomolécules. L'insertion de ces nano-objets combinée à la nanostructuration du matériau d'électrode a permis de multiplier par plus de 170 fois l'intensité des réactions enregistrées.

Mot clef : Electrodes poreuses, Cristaux colloïdaux, Electrocatalyse, Immobilisation Enzymatique, Bio-réacteur électrochimique

Abstract

The present work deals with the development of the working electrode of an electrochemical bioreactor. This device enables the green synthesis of high added value chemical compounds. As the electrochemical synthesis is located at the interface of the working electrode, structural optimization of this reactor key component is required in order to maximize the available active surface area. Elaboration of highly organized macroporous gold electrodes with a size required by the pilot reactor dimensions were obtained with the Langmuir-Blodgett method that was used to assemble a colloidal crystal as a template. The elaboration of the organized colloidal deposit is first followed by the electrodeposition of the electrode material, then by the dissolution of the template. The immobilization of the complete bio-electrochemical system inside the electrode pores was investigated in order to prevent pollution of the final product medium by one of the catalytic chain component. This also improves the device lifetime. Subsequently electrogenerated ultra-thin silica layers and electrodeposited polymer matrices were studied in order to preserve and optimize the catalytic activity of the redox proteins. In order to enhance the electrocatalytic synthesis, mediator

modified gold nanoparticles were incorporated in the different immobilization matrices. This allowed to increase the area of the electrochemical interface. The combination of the nano-object incorporation and electrode nano-structuring intensified by a factor of 170 the catalytic process.

Key words: Porous electrodes, Colloidal crystal, Electrocatalysis, Enzymatic immobilization, Electrochemical bioreactor

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Arbeitselektrode für einen elektrochemischen Bioreaktor, der die umweltfreundliche Synthese von wertvollen chemischen Komponenten ermöglicht. Da die elektrochemische Synthese an der Oberfläche der Arbeitselektrode stattfindet, ist es nötig, den strukturellen Aufbau der Schlüsselkomponente des Reaktors zu optimieren und die aktive Oberfläche der Elektrode zu erhöhen. Mit Hilfe der Langmuir-Blodgett Technik wurden kolloidale Kristalle erzeugt, die als Template dienten, um hochgeordnete makroporöse Goldelektroden, deren Dimensionen von dem Pilotreaktor bestimmt wurden, herzustellen. Nach dem Erzeugen von geordneten kolloidalen Filmen wurde der Zwischenraum zwischen den Partikeln mittels elektrochemischer Abscheidung gefüllt und das Template anschließend chemisch aufgelöst. In der Folge wurde die Immobilisierung des kompletten bioelektrochemischen Systems im Poreninnenraum untersucht, mit dem Ziel eine Verunreinigung des Reaktionsmediums durch eine der katalytischen Komponenten zu verhindern. Die Lebensdauer der Elektrode kann so zusätzlich erhöht werden. Es wurde untersucht, inwieweit durch elektrogenerierte ultra-dünne Silikaschichten oder durch Elektroabscheidung erzeugte Polymerfilme die katalytische Aktivität der Redoxproteine erhalten und weiter optimiert werden kann. Goldnanopartikel, die mit einem Mediator modifiziert wurden, wurden in die jeweilige Immobilisationsschicht integriert, mit dem Ziel die Effizienz der elektrokatalytischen Synthese zu erhöhen. Auf diese Weise konnte die aktive elektrochemische Oberfläche der Elektrode weiter erhöht werden. Die Kombination aus einer nanostrukturierten Elektrode und Nanoobjekten die in die Immobilisationsschicht eingebettet wurden, führte zu einer Signalerhöhung des katalytischen Prozesses um mehr als eine Größenordnung.

Schlüsselwörter: Poröse Elektroden; Kolloidale Kristalle; Elektrokatalyse; elektrochemischer Bioreaktor; Enzymimmobilisation