



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
Physique et Chimie des Matériaux

Présentée par

M. François GAL

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**NANOSTRUCTURES HYBRIDES A BASE DE
NANOPARTICULES DE PLATINE GREFFEES DE POLYMERE
ET D'ENZYMES : ELABORATION, CARACTERISATION ET
COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE.**

Thèse soutenue le 29 novembre 2010 devant le jury composé de :

Mme Géraldine CARROT	CEA Saclay	<i>Encadrante</i>
M. Eric DROCKENMULLER	Université Claude Bernard Lyon 1	<i>Examinateur</i>
M. Dominique HOURDET	Université Pierre et Marie Curie	<i>Président</i>
Mme Liliane LEGER	Université Paris-Sud	<i>Rapporteur</i>
M. Henri PEREZ	CEA Saclay	<i>Directeur de thèse</i>
M. Benoît PIRO	Université Paris Diderot	<i>Examinateur</i>
M. Daniel TATON	Université Bordeaux 1	<i>Rapporteur</i>

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé entre le Laboratoire Léon Brillouin (LLB) et le Service des Photons, Atomes et Molécules (SPAM), situés au CEA de Saclay. Je tiens donc à remercier en premier lieu Philippe Mangin puis Christiane Alba-Simionesco, directeurs successifs du LLB et Cécile Reynaud, directrice du SPAM, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Par la même occasion, je tiens également à remercier Susana Gota-Goldmann (sous-directrice du LLB) et Alain Menelle pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions.

Je suis ensuite très reconnaissant à Liliane Léger et Daniel Taton d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier Dominique Hourdet d'avoir assuré le rôle de président de mon jury de thèse, ainsi qu'Eric Drockenmuller et Benoît Piro, qui ont accepté de faire partie de ce jury.

Je souhaite ensuite exprimer toute ma gratitude à Henri Perez, mon directeur de thèse et à Géraldine Carrot qui ont tous deux encadré ce travail pendant les 3 années que j'ai passé à Saclay. Merci beaucoup Henri. J'ai beaucoup appris à tes côtés, notamment au niveau de ta rigueur scientifique et de ta précision dans le travail. Grâce à ta pédagogie, j'ai même pu m'initier aux mystères de l'électrochimie, ce qui n'était pas gagné d'avance... Un grand merci également à Géraldine qui m'a suivi depuis mon tout premier jour de stage au LLB (ça commence à faire loin maintenant...). J'ai pu ainsi découvrir l'ATRP et la DNPA ainsi que les aléas qui vont avec... Pendant ces 3 années et demie, tu es toujours restée disponible pour répondre à mes nombreuses questions ou pour discuter des résultats que nous avons obtenus et je t'en remercie.

En plus de mes deux encadrants, je souhaite également joindre à ces remerciements Vincent Noël qui a largement participé à ce travail et qui m'a donné son avis lors de la rédaction du manuscrit. Merci pour ton accueil à ITODYS (même si j'ai dû braver les tempêtes de neige pour atteindre le labo) ainsi que pour tes conseils et ta gentillesse.

Parmi les personnes qui ont occupées une place importante dans ce travail, je tiens particulièrement à remercier les étudiants qui m'ont largement aidé. Par ordre chronologique, je tiens à commencer par Marie Barré qui, pendant mes premiers mois au LLB, a partagé mon bureau. Merci également à Céline Roddier, Nora Boughilas pour leur contribution. Et enfin, je tiens à remercier Lylian Challier pour son aide très précieuse et efficace sur la partie électrochimie mais également pour sa bonne humeur.

D'autres personnes ont également participé ponctuellement à ce travail. Parmi ces dernières, je tiens à remercier Pierre Tran-Van pour les analyses AFM réalisées et Christopher Plummer pour les nombreux clichés MET qu'il nous a fait parvenir et Pierre-Antoine Albouy pour les mesures de RX. Par la même occasion, je tiens à remercier Arnaud Hély et Didier Lairez pour l'aide qu'ils m'ont apportée lors des expériences réalisées sur PACE. Enfin, même si les expériences d'ellipsométrie se sont avérées peu fructueuses, je tiens à remercier Gilbert Zalcer et Frédéric Restagno de les avoir tentées.

Je tiens ensuite remercier José Teixeira, Annie Brûlet et Lay-Tengh Lee pour avoir accepté de relire certains chapitres de ce manuscrit mais également pour les nombreux conseils qu'ils ont pu me donner au détour d'un couloir pendant ces 3 années passées en leur compagnie.

Je souhaite également remercier Fabrice « M. » Cousin. Bien qu'il m'ait donné de nombreux conseils scientifiques ou qu'il m'ait beaucoup aidé lors de expériences menées sur Eros, c'est surtout pour son implication dans les pauses café qu'il restera dans ma mémoire. Merci d'avoir remis à jour mes connaissances musicales des années 80. Ton interprétation de « Bad » restera gravée dans ma mémoire.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à Chantal Marais qui, grâce à sa gentillesse, sa disponibilité et son efficacité, m'a facilité la vie en gérant l'aspect administratif parfois un peu indigeste d'une thèse au CEA. Je lui souhaite d'ailleurs de profiter pleinement de sa retraite.

Au cours de ma thèse, j'ai pu rencontrer beaucoup de doctorants, de post-doctorants ou encore de stagiaires qui m'ont permis de passer ces 3 ans dans une excellente ambiance, que ce soit au SPAM ou au LLB. Du côté du SPAM, je tiens donc à remercier Ana, Florence, Joao, Xi, Gregory, Fabien et encore Bertrand pour leur accueil et leur bonne humeur lors de mes passages plus au moins long dans ce laboratoire. Je vais ensuite continuer par ceux avec qui j'ai partagé de nombreuses pauses café mais également plusieurs soirées mémorables (même si il doit manquer quelques souvenirs à certains...). Je remercie en premier lieu Christophe qui a eu la dure tâche de partager mon bureau pendant 3 ans. Ta bonne humeur sans faille va me manquer, mais tes jeux de mots, je n'en suis pas sûr. Pense à resserrer le filtre de temps en temps. Merci ensuite à Nicolas, même si tu as parfois du mal à assumer tes blagues, Clémence, je me souviendrai longtemps de toi mimant le « crowding » mais je pense également écrire un roman sur toutes tes aventures. Je tiens un best-seller... Je souhaite ensuite remercier Super-Chloé, tes supers blagues de superman et les histoires de ton super chat vont me manquer. Merci également à Anne-Sophie, la reine du tunning, même s'il te manque encore les néons sous la voiture et Anne-Laure, la doctorante qui essaie de visiter tous les continents pendant sa thèse. Je tiens également à remercier Alexandros, Karine, Sindhu, Cynthia, Gilbert, Cédric, Guillaume, Jawhar, Caroline, Vincent, Céline, Zineb, Isabelle, Lucie, Carole, Perrine, Prixilia et Camila ainsi que ceux que j'aurais malencontreusement oubliés.

J'ai également rencontré et pu discuter avec de nombreux chercheurs pendant ces trois ans. Je tiens donc à remercier ceux que je n'avais pas encore cités : Nathalie, Giulia, François

B., François M., Alain, Jacques, Jean Marc et Stéphane.

Pour terminer, je tiens également à remercier certaines personnes extérieures à cette thèse à qui je dois beaucoup. Je tiens à remercier mon père pour son soutien depuis à peu près la maternelle et aussi Lucille pour son support de tous les instants, surtout pendant la rédaction (et ce n'est pas peu dire).

Table des matières

Introduction générale	11
I Contexte de l'étude	17
I.1 Nanoparticules et biotechnologies	18
I.1.1 Généralités	18
I.1.2 Domaines d'applications	19
I.1.3 Réalisation de structures hybrides nanoparticules-biomolécules	23
I.2 Synthèses de systèmes nanoparticule/polymère	26
I.2.1 Stratégies de synthèse de systèmes nanoparticule/polymère	26
I.2.2 PRC à la surface de nanoparticules	31
I.3 Nanoparticules et biocapteurs enzymatiques	39
I.3.1 Biocapteurs électrochimiques	39
I.3.2 Biocapteurs enzymatiques ampérométriques à glucose	40
I.4 Positionnement du sujet et objectifs de la thèse	46
II Nanoparticules de platine greffées de polymère : synthèse et étude en solution	51
II.1 Introduction	53
II.2 Synthèse de nanoparticules de platine amorçantes	53
II.2.1 Synthèse de nanoparticules de platine fonctionnalisées	53
II.2.2 Surgreffage d'un amorceur de polymérisation	54
II.2.3 Caractérisation des nanoparticules obtenues	55
II.3 ATRP en surface des nanoparticules de platine	61
II.3.1 Définition et optimisation des conditions de polymérisation	61
II.3.2 Caractérisation de la couronne polymère des nanoparticules	66
II.3.3 Tentatives de dégreffage des chaînes	72
II.4 Caractérisation par DNPA des nanoparticules greffées de polymère	74
II.4.1 Introduction à la DNPA	74
II.4.2 Contribution de la nanoparticule greffée d'amorceurs	77
II.4.3 Etude de la couronne de poly(méthacrylate de n-butyle)	80
II.4.4 Etude de la couronne de poly(méthacrylate de tert-butyle)	86
II.5 Conclusion	93

III Formation de structures hybrides platine-polymère-glucose oxydase	97
III.1 Introduction	99
III.2 Elaboration de structures hybrides Pt-PMAA-GOx en solution	99
III.2.1 Hydrolyse des chaînes greffées de PMAAtBu	100
III.2.2 Elaboration des structures hybrides Pt-PMAA-GOx en solution	104
III.3 Elaboration de structures Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince	116
III.3.1 Films de Langmuir-Blodgett de nanoparticules greffées de polymère	117
III.3.2 Structures en film ultra-mince à partir de films LB de Pt-PMAA	125
III.3.3 Brosses polymères à base de films LB de nanoparticules amorçantes	133
III.3.4 Structures hybrides Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince	143
III.4 Conclusion	146
IV Etude des propriétés électrochimiques des structures hybrides Pt-PMAA-GOx	151
IV.1 Introduction	153
IV.2 Conditions et mesures électrochimiques	155
IV.2.1 Dispositif expérimental et types de mesure	155
IV.2.2 Sondes redox utilisées	156
IV.3 Etude préliminaire du comportement électrochimique des films précurseurs sans GOx	157
IV.3.1 Comportement de la structure à base de films LB de Pt-PMAA	157
IV.3.2 Comportement de la structure de type brosse PMAA vis-à-vis de H ₂ O ₂	165
IV.4 Etude des nanostructures hybrides Pt-PMAA-GOx en configuration biocapteur	169
IV.4.1 Etude de la structure à base de films LB de Pt-PMAA en configuration biocapteur	170
IV.4.2 Etude de la structure de type brosse en configuration biocapteur	174
IV.4.3 Etude des structures hybrides obtenues en solution en configuration biocapteur	175
IV.5 Conclusion	179
Conclusion générale	181
ANNEXES	187
A Protocoles de synthèse	187
A.1 Synthèse des nanoparticules amorçantes	187
A.1.1 Synthèse des nanoparticules fonctionnalisées	187
A.1.2 Sursgreffage de l'amorceur	188
A.2 Polymérisation en solution sur les nanoparticules et hydrolyse	188
A.2.1 Synthèse	188
A.2.2 Détermination du taux de conversion par mesures gravimétriques	189
A.3 Synthèse de brosses de PMAAtBu	190

B Diffusion de Neutrons aux Petits Angles	191
B.1 Les neutrons	191
B.2 Interaction neutron-matière	192
B.3 Contraste et variation de contraste	194
B.3.1 Contraste	194
B.3.2 Variation de contraste	195
B.4 Mesure et traitement	196
B.4.1 Mesure	196
B.4.2 Traitement	197
B.5 Intensité diffusée	197
B.5.1 Facteur de forme $P(q)$	198
B.5.2 Facteur de structure $S(q)$	198
B.5.3 Calcul de la masse de l'objet diffusant	198
C Réflectivité de neutrons	201
C.1 Principe de la réflectivité de neutrons	201
C.2 Mesure et traitement	203
D Film de Langmuir-Blodgett	205
D.1 Isotherme de compression	205
D.1.1 Allure de l'isotherme de compression	205
D.1.2 Calcul de la distance inter-particule	206
D.2 Transfert du film de Langmuir	207
D.2.1 Transfert vertical	207
D.2.2 Transfert horizontal	208
E Mesure d'activité enzymatique	209
E.1 Principe de la mesure	209
E.2 Protocole	210
E.2.1 Calibration	210
E.2.2 Détermination de la quantité d'enzymes actives d'un échantillon	211
Bibliographie	212
Résumés	225

Introduction générale

Les 20 dernières années ont été marquées par l'émergence puis le développement des nanosciences et des nanotechnologies. Ces domaines portent sur l'élaboration et l'étude d'objets dont les dimensions varient de quelques nanomètres à une centaine de nanomètres. L'engouement sans précédent pour ces matériaux est lié aux propriétés originales, différentes des matériaux massifs, qui apparaissent dans cette gamme de taille. En effet, à ces dimensions, des effets de confinement apparaissent et les effets de surfaces deviennent prépondérants par rapport aux effets de volume, ce qui modifie grandement les propriétés des matériaux. L'évolution des techniques de synthèses permet aujourd'hui de disposer de nanoparticules de tailles contrôlées, de polydispersité faible, de formes et/ou de compositions variées. Cette versatilité a permis d'envisager leur utilisation dans des domaines d'applications très variés parmi lesquels les biotechnologies.

La convergence des biotechnologies et des nanotechnologies permet le développement de structures hybrides qui associent les propriétés uniques des nanoparticules aux propriétés de reconnaissance spécifique des biomolécules (ADN, protéines, anticorps). Cette combinaison est utilisée pour développer de nouveaux systèmes de vectorisation de médicament, d'agents de contraste ou encore de biocapteurs électrochimiques. C'est à ces derniers que nous nous sommes intéressés dans le cadre de cette thèse. L'utilisation de nanomatériaux pour réaliser des biocapteurs soulève plusieurs questions, notamment l'impact de la composition et de la nanostructuration du système sur les transports de charge ou encore de matière au sein de la structure, et par extension sur le comportement global du capteur.

Dans le cadre de cette thèse, nous proposons de réaliser à partir de nanoparticules de platine et d'enzymes (glucose oxydase) des structures modèles pouvant permettre d'étudier l'effet conjoint de la structuration et de la composition du système sur des phénomènes se produisant à l'échelle nanométrique et influençant directement le comportement électrochimique macroscopique du système. Pour former ces systèmes de façon contrôlée, nous avons adopté une approche « bottom up » qui consiste à former des nanostructures à partir de

briques élémentaires préalablement synthétisées. Les briques élémentaires que nous avons élaborées sont des nanoparticules de platine greffées de chaînes polymères. Ces chaînes vont avoir deux rôles. Elles vont permettre de moduler l'organisation des nanoparticules dans la structure finale et également permettre l'immobilisation covalente des enzymes. Pour relier l'effet de la structuration et le comportement global du biocapteur, il est nécessaire que les briques élémentaires soient synthétisées de la façon la plus contrôlée possible, puis précisément caractérisées. A partir de ces objets, il est alors envisageable d'élaborer plusieurs architectures hybrides platine-polymères qui auront vraisemblablement des comportements électrochimiques différents.

Compte tenu du contexte et des objectifs de cette thèse, les travaux rapportés possèdent un caractère pluridisciplinaire marqué. Le manuscrit s'articule autour de 4 parties. Le premier chapitre de ce manuscrit présente le contexte de notre étude ainsi que les motivations qui ont mené à ce travail. Nous abordons notamment l'intérêt des nanoparticules dans les biotechnologies, ainsi que les diverses stratégies permettant d'obtenir de manière contrôlée des nanoparticules greffées de polymères. Dans une dernière partie, le fonctionnement d'un biocapteur enzymatique électrochimique et les principaux axes de développement dans ce domaine sont abordés. Les développements les plus récents nous permettent de préciser nos choix et nos approches.

Le deuxième chapitre présente l'élaboration des briques élémentaires de notre système. Nous y décrivons tout d'abord la synthèse en plusieurs étapes des nanoparticules greffées de polymère, depuis la formation des nanoparticules jusqu'à la polymérisation de monomères à leur surface par polymérisation radicalaire contrôlée. Les études cinétiques de ces polymérisations ainsi que les caractérisations chimiques des objets synthétisés sont également présentées. La seconde partie de ce chapitre est consacrée à la caractérisation détaillée des nano-objets obtenus, effectuée par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).

Le troisième chapitre présente la formation de structures hybrides platine-polymère-enzyme. Deux types de systèmes ont été élaborés. La première partie du chapitre est dédiée à la formation de structures hybrides élémentaires en solution, après modification chimique des chaînes polymères, ainsi qu'à leur caractérisation. La seconde partie du chapitre est consacrée à l'élaboration de structures en films minces *via* l'utilisation de la technique de Langmuir-Blodgett, qui ont été greffées d'enzymes *a posteriori*. Deux architectures différentes ont été visées selon cette stratégie. L'étude des caractéristiques de ces structures par plusieurs techniques (réflectivité de neutrons, AFM) ainsi que la détermination de la quantité d'enzymes

immobilisées sont également présentées dans cette deuxième partie du chapitre.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude du comportement électrochimique des différentes structures hybrides dont l'élaboration est présentée dans le chapitre III. Il est divisé en deux parties. La première présente une étude préliminaire des systèmes précurseurs (sans enzymes) en film mince, vis-à-vis de l'eau oxygénée, espèce qui sera générée par l'action de l'enzyme sur son substrat (glucose). La seconde partie présente les études menées en configuration biocapteur puisque nous y abordons le comportement des structures hybrides comportant l'enzyme glucose oxydase, vis-à-vis du glucose.

CHAPITRE I

Chapitre I

Contexte de l'étude

Contents

I.1	Nanoparticules et biotechnologies	18
I.1.1	Généralités	18
I.1.2	Domaines d'applications	19
I.1.3	Réalisation de structures hybrides nanoparticules-biomolécules . .	23
I.2	Synthèses de systèmes nanoparticule/polymère	26
I.2.1	Stratégies de synthèse de systèmes nanoparticule/polymère	26
I.2.1.1	Utilisation de copolymères à blocs comme nanoréacteurs .	26
I.2.1.2	Greffage de chaînes polymères à la surface de nanoparticules	28
I.2.2	PRC à la surface de nanoparticules	31
I.2.2.1	Principe de la PRC	31
I.2.2.2	Polymérisation Radicalaire par Transfert d'Atome (ATRP) en surface	32
I.2.2.3	Polymérisation Radicalaire Controlée par les Nitroxydes (NMP) en surface	35
I.2.2.4	Polymérisation par transfert de chaîne réversible par ad- dition - fragmentation (RAFT) en surface	37
I.3	Nanoparticules et biocapteurs enzymatiques	39
I.3.1	Biocapteurs électrochimiques	39
I.3.2	Biocapteurs enzymatiques ampérométriques à glucose	40
I.3.2.1	Principe de fonctionnement	40
I.3.2.2	Principaux axes de développement	42
I.3.2.3	Biocapteurs à glucose et nanoparticules	44
I.4	Positionnement du sujet et objectifs de la thèse	46

Ce chapitre d'introduction vise à situer le contexte et les motivations qui ont conduit à ce travail de thèse et comporte des éléments de bibliographie permettant de situer le sujet. Compte tenu du caractère multidisciplinaire de celui-ci, une bibliographie exhaustive des différents domaines concernés ne se justifiait pas. L'élaboration de nanostructures hybrides à base de nanoparticules, de polymère et d'enzyme est au cœur de ce travail, qui se situe donc à l'interface des nanosciences et des biotechnologies. Ce domaine en plein essor comporte différents aspects qui sont brièvement évoqués dans la première partie de ce chapitre, en mettant l'accent sur les approches utilisées pour combiner des objets biologiques et des nanoparticules. La seconde partie de chapitre présente différentes stratégies permettant de synthétiser des systèmes nanoparticules -polymère et permet d'introduire l'approche que nous avons utilisée dans notre travail. Enfin, avant de présenter la genèse du sujet et les objectifs poursuivis au cours de ce travail, nous présentons succinctement la problématique des biocapteurs ampérométriques enzymatiques en considérant les capteurs à glucose. C'est en effet ce type de capteur qui sert de support à la réalisation des différentes nanostructures hybrides modèles développées dans nos travaux.

I.1 Nanoparticules et biotechnologies

I.1.1 Généralités

Grâce aux progrès importants réalisés depuis une quinzaine d'années sur la synthèse de nanoparticules, les scientifiques disposent aujourd'hui de nanoparticules stables, de nature diverses (métalliques, oxydes métalliques ou semi-conducteurs) dont la taille peut être ajustée de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres. Ces nano-objets présentent ainsi des propriétés uniques et ajustables différentes de celles du matériau massif en raison des effets de confinement spatial et quantique. Même si d'autres techniques de synthèse existent, les développements les plus importants sont issus des voies développées en solution (approche bottom-up) qui utilisent des précurseurs moléculaires et des agents stabilisants. Ces derniers, sur lesquels nous reviendrons, peuvent être moléculaires ou polymères et posséder des caractéristiques variables selon la manière dont ils interagissent avec la surface des nanoparticules. Le rôle des agents stabilisants est en général de contrôler la taille (et parfois la forme) des nano-objets, d'éviter leur agrégation irréversible et enfin de permettre leur manipulation en solution comme des molécules. Cependant, comme nous le verrons, ces agents stabilisants constituent aussi un moyen de maîtriser les caractéristiques de surface des nanoparticules pour, par exemple, les rendre compatibles avec des milieux aqueux ou biologiques et/ou introduire à leur surface une réactivité chimique particulière.

Selon les précurseurs utilisés, les chimistes peuvent donc réaliser des nano-objets possédant des propriétés optiques, magnétiques ou catalytiques et qui peuvent être manipulés en milieu liquide aqueux dans lequel ils sont individualisés. Ces nanoparticules ont des dimensions similaires à celles des biomolécules (ADN, protéines, anticorps). Ainsi l'association de ces deux types d'objets permet d'envisager la réalisation de systèmes hybrides qui conjuguent, au sein d'un même édifice nanométrique, une propriété physique ou chimique donnée et les propriétés spécifiques de molécules biologiques. Une telle structure hybride est suffisamment petite pour pouvoir être introduite dans le corps humain et atteindre l'intérieur même des cellules. Cette caractéristique particulière est à l'origine du domaine de recherches associé aux nano-biotechnologies qui concerne l'exploitation de telles structures *in-vivo*. Nous pouvons ainsi citer l'imagerie médicale, la vectorisation de médicament ou la thérapie ciblée au sein d'un organisme vivant. Outre ces développements qui ont des visées plutôt thérapeutiques, un second domaine associé aux nano-biotechnologies concerne la réalisation de biocapteurs utilisant des systèmes hybrides nanoparticules-biomolécules.

I.1.2 Domaines d'applications

Les possibilités offertes par l'association contrôlée de nanoparticules et de biomolécules sont nombreuses et diverses. Plusieurs revues publiées dans la littérature sont consacrées à ce sujet.^{1,2} Les exemples présentés ci-dessous ne constituent pas une liste exhaustive des applications envisageables et de leur développement mais ils permettent d'illustrer les principaux champs de recherche. Cependant, comme le montrent les exemples présentés dans le paragraphe suivant, les systèmes hybrides élaborés aujourd'hui sont de plus en plus complexes et jouent plusieurs rôles à la fois. Les nanoparticules sont par exemple utilisées en même temps comme agent de contraste dans l'imagerie médicale et comme agent de vectorisation.

En raison de leur propriétés super-paramagnétiques, les nanoparticules d'oxydes de fer (magnétite Fe_3O_4 ou maghémite $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) sont aujourd'hui largement étudiées comme agent de contraste pour l'imagerie à résonance magnétique (IRM).^{3,4,5} Une approche développée par Kohler et coll. consiste à modifier la surface des nanoparticules en y greffant du polyéthylène glycol (PEG).⁶ Ce polymère est intéressant car il rend les nanoparticules non-immunogènes ce qui permet d'augmenter la durée de présence des nanoparticules dans le sang. Les auteurs ont ensuite utilisé le PEG pour greffer une molécule possédant à la fois des vertus thérapeutiques et des propriétés de reconnaissance de cellules cancéreuses (méthotrexate).⁷ Celle-ci est utilisée pour traiter diverses formes de cancer mais de manière limitée à cause de sa toxicité et de sa rapide élimination par l'organisme. En liant cette molécule au

PEG greffé, les auteurs ont ainsi pu augmenter la durée de présence du médicament dans le sang et ont réussi à augmenter sa sélectivité vis-à-vis des cellules malades. La présence de la nanoparticule permet d'exalter le signal enregistré par résonance magnétique et de visualiser les zones tumorales.

Ces mêmes nanoparticules magnétiques peuvent être également utilisées pour traiter des tumeurs par hyperthermie.^{5,8} En effet, la chaleur permet de traiter un certain nombre de maladies et notamment certains cancers. Des études ont ainsi montré que les cellules cancéreuses sont détruites au-delà de 43 degrés alors que les cellules saines peuvent survivre à des températures plus élevées.⁹ L'hyperthermie magnétique consiste à exposer les tissus cancéreux à un champ magnétique alternatif. Ce champ magnétique n'a pas d'effet sur les tissus vivant et peut-être appliqué en profondeur dans l'organisme. Lorsque les nanoparticules magnétiques sont soumises à un tel champ magnétique, elles vont s'échauffer. La quantité de chaleur produite va dépendre des caractéristiques des nanoparticules, du champ magnétique mais également de l'environnement des nanoparticules. En contrôlant la quantité de chaleur produite localement, il est donc théoriquement possible de détruire plus spécifiquement les cellules cancéreuses. Plusieurs études montre que cette approche, couplée à d'autres techniques thérapeutiques, permet d'obtenir des résultats encourageants.^{10,11}

La vectorisation de médicaments est un autre domaine où l'utilisation de nanoparticules s'est fortement développée. L'objectif dans ces travaux, est de pouvoir contrôler précisément le relargage localisé des molécules à visée thérapeutique afin de pouvoir en diminuer la quantité utilisée et par conséquent d'en limiter les effets secondaires. Les études de Rotello et son équipe ont notamment montré qu'il était possible d'utiliser des nanoparticules d'or en tant qu'agent de vectorisation.^{12,13} Ces dernières sont particulièrement utilisées dans ce domaine car elles sont faiblement toxiques,¹⁴ leur taille est suffisamment réduite et la biocompatibilisation de leur surface assure des temps de présence longs dans l'organisme. Les travaux de Rotello et son équipe constituent un bel exemple d'édifice nanométrique hybride sophistiqué qui exploite à la fois les caractéristiques de l'enrobage des nanoparticules et les propriétés de celles-ci. L'enrobage comporte en effet une zone hydrophobe qui permet à la fois le piégeage d'une molécule fluorescente et d'une molécule à visée thérapeutique, une zone assurant la biocompatibilité (motif polyéthylène glycol) et enfin une zone terminale constituée de zwitterion qui assure la solubilité du système en milieu aqueux.¹³ Lorsque la molécule fluorescente est piégée dans la zone hydrophobe aux abords de la nanoparticule sa fluorescence est « quenchée ». Les études effectuées ont montré que le relargage des molécules piégées dans les zones hydrophobes s'effectuait au niveau de la membrane cellulaire et que

ces molécules diffusent à travers cette membrane sans que la nanoparticule soit adsorbée. Les molécules fluorescentes sont libérées en même temps que les molécules actives comme en témoigne la mesure de leur fluorescence au sein des cellules visées (figure I.1).

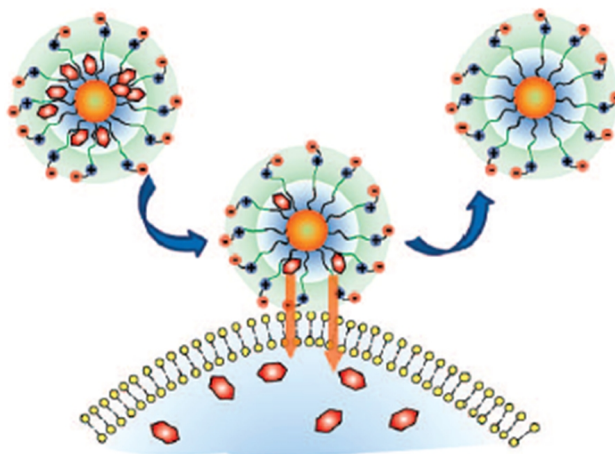


Figure I.1 – Relargage des molécules actives à travers la couche membranaire.¹³

D'autres approches ont également été menées pour vectoriser et cibler précisément le relargage des molécules actives *via* l'utilisation de nanoparticules et de polymères thermosensibles. Par exemple, Sershen et son équipe ont utilisé des nanoparticules d'or associées à un copolymère thermosensible (poly(isopropyl acrylamide)/poly(acrylamide)).¹⁵ Ce copolymère présente la particularité de se contracter brutalement au-delà d'une certaine température, appelée LCST (Lower Critical Solution Temperature). Ce phénomène permet ainsi de contrôler le relargage des espèces hydrophobes contenues dans les gels et donc, des médicaments préalablement emprisonnés. Le changement de température est contrôlé par l'irradiation infrarouge des nanoparticules d'or qui convertissent alors ce rayonnement en chaleur. Misra et coll. ont également développé cette stratégie en enrobant des nanoparticules de magnétite dans un polymère thermosensible.¹⁶ Dans cette étude, les molécules anticancéreuses ont été immobilisées à la surface des nanoparticules par le biais d'une fonction labile. Le relargage des molécules dépend donc ici de 2 facteurs : la température et le pH. Ce dernier paramètre est important car certaines cellules cancéreuses ont un pH légèrement plus acide que les cellules saines.¹⁷ Misra et son équipe ont ainsi montré que le relargage des molécules anticancéreuses causé par la montée de la température au-delà de la LCST du polymère, est efficace seulement en milieu légèrement acide (pH 5.3). Cette stratégie permet donc un ciblage encore plus précis du relargage des molécules actives.

Si nous nous intéressons maintenant aux aspects biocapteurs, nous pouvons citer deux exemples qui exploitent des propriétés optiques, électroniques ou catalytiques de nanoparticules, associées à des molécules biologiques. Dans ces systèmes la molécule biologique est utilisée comme élément de reconnaissance de l'espèce à détecter, tandis que la nanoparticule permet de mesurer un signal qui reflète cette interaction. Ainsi les propriétés optiques des nanoparticules d'or ont également été utilisées pour former des biocapteurs optiques. Ces dernières présentent un pic d'absorbance intense entre 500 et 550 nm correspondant à une résonance du plasmon de surface.¹⁸ Cette bande d'absorption est sensible à la taille et également à l'environnement des nanoparticules. Beaucoup de travaux publiés dans la littérature, exploitent cette caractéristique pour former des biocapteurs colorimétriques.¹⁹ Mirkin et son équipe ont par exemple utilisé des nanoparticules d'or pour tester la présence d'une séquence d'ADN spécifique.²⁰ Ces derniers ont exploité des nanoparticules d'or de 13 nm de diamètre sur lesquelles sont fixées des brins d'ADN complémentaires de ceux que l'on cherche à détecter. Dans ce système, l'astuce consiste à utiliser deux types de nanoparticules d'or, chacune possédant seulement la moitié de la séquence cible à reconnaître.

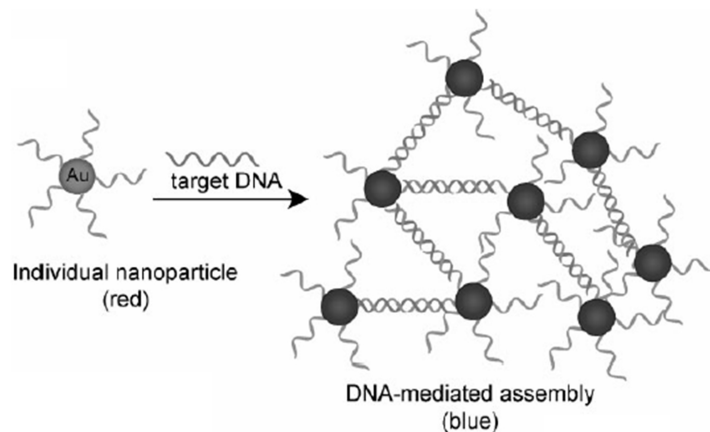


Figure I.2 – Principe de biocapteur à base de nanoparticules d'or, élaboré par Mirkin et son équipe.²⁰

Comme l'illustre la figure I.2, en présence de la séquence cible, il se forme des agrégats de nanoparticules d'or dont les propriétés optiques changent par rapport à celles des nanoparticules isolées, et une modification de la couleur de la solution est alors observée. Nous pouvons noter que des nanoparticules de semi-conducteur (CdSe) ont également été utilisées pour élaborer des biocapteurs optiques.^{21,22} Ces biocapteurs se basent sur les propriétés de fluorescence des nanoparticules semi-conductrices.

Les nanoparticules métalliques, particulièrement celles constituées d'or ou de platine, possèdent des conductivités et des propriétés catalytiques qui les rendent très intéressantes

pour l'élaboration de biocapteur électrochimiques.^{23,24,25,26} Pour ce type d'application, des structures hybrides à base de nanoparticules et de biomolécules, souvent des enzymes, sont élaborées. Les travaux de Willner^{23,24} notamment, présentent la réalisation de biocapteurs électrochimiques basés sur la formation de structures hybrides glucose oxydase (GOx)- nanoparticule de platine ou d'or. Les nanostructures hybrides réalisées dans notre travail sont similaires à celles-ci, le fonctionnement et les caractéristiques de tels biocapteurs seront présentés plus en détail à la fin de ce chapitre.

A travers les exemples présentés dans ce paragraphe, nous voyons que l'utilisation des nanoparticules dans le domaine des biotechnologies laisse entrevoir le développement de nanostructures hybrides sophistiquées utiles à la fois à la réalisation et la compréhension de systèmes à visée thérapeutique, de diagnostique, ou de détection. Un paramètre important dans ces structures concerne la méthode utilisée pour associer molécules biologiques et nanoparticules. Cet aspect est abordé dans le paragraphe suivant, dans lequel nous considérons essentiellement le cas des nanoparticules métalliques.

I.1.3 Réalisation de structures hybrides nanoparticules-biomolécules

Les biomolécules possèdent à leur surface différentes fonctions chimiques de type amine (NH_2), acide (COOH) ou encore thiol (SH), permettant leur association à des nanoparticules métalliques. Il existe deux stratégies différentes pour associer des biomolécules à des nanoparticules. La première consiste à utiliser des interactions électrostatiques. La seconde vise à créer un lien covalent entre la biomolécule et la nanoparticules. Dans les deux cas, ce sont les molécules stabilisant la nanoparticule qui vont être utilisées. Ces deux approches sont schématisées dans la figure I.3

Nous avons vu précédemment que les nanoparticules métalliques sont principalement synthétisées par réduction de sels précurseurs en solution en présence d'agents stabilisants. Ces derniers peuvent être de nature ionique et stabiliser électrostatiquement les nanoparticules, ou encore neutre (molécules de faibles poids moléculaires ou chaînes polymères) et générer une stabilisation stérique. Les stabilisants les plus utilisés sont des molécules bifonctionnelles présentant une fonction thiol. Cette dernière permet un véritable lien chimique avec la surface des nanoparticules métalliques. La seconde fonction présente sur la molécule peut être de nature variée. Ce choix va déterminer la stratégie d'immobilisation de la biomolécule. Les molécules bifonctionnelles peuvent être introduites au moment même de la synthèse des nanoparticules. Mais il existe de nombreux exemples dans lesquels l'introduction de la molécule bifonctionnelle se fait après la synthèse des nanoparticules, par simple réaction

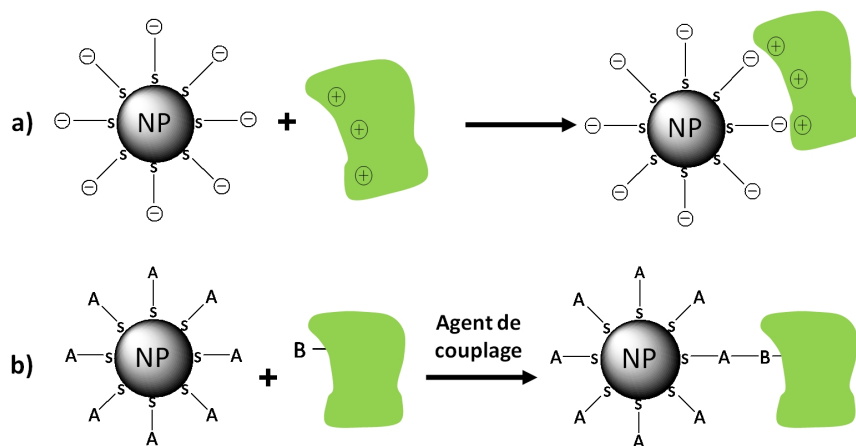


Figure I.3 – Illustration de l’adsorption électrostatique (a) et du greffage covalent de molécules biologiques à la surface de nanoparticules.

d’échange avec le stabilisant utilisé lors de la synthèse. Il est également possible de modifier *a posteriori* les molécules stabilisantes par des réactions chimiques (réaction de surgreffage) afin d’introduire une fonction réactive plus adaptée à l’introduction de la molécule biologique.

Plusieurs études^{27,28} rapportent ainsi l’association de biomolécules avec des nanoparticules par interaction ionique. (figure I.3a). Rotello et son équipe ont par exemple immobilisé des protéines sur des nanoparticules stabilisées par thiols possédant une fonction carboxylate.²⁸ Des brins d’ADN chargés négativement ont également été immobilisés sur des nanoparticules stabilisées par des molécules présentant une fonction ammonium quaternaire.²⁷ Il faut noter que le pH joue ici un rôle déterminant car il va permettre de contrôler la nature des charges présentes sur les biomolécules en se plaçant au dessus ou au dessous de leur point isoélectrique.

La seconde stratégie, la plus développée, consiste à créer une liaison covalente entre les nanoparticules et les biomolécules. Dans ce cas le lien entre les deux objets n’est plus dépendant du pH ou de la force ionique du milieu. Les réactions chimiques sont réalisées à l’aide d’agents de couplage^{29,30} (figure I.3b) qui permettent de travailler dans des conditions douces (température ambiante, pH physiologique). La plupart de ces méthodes ont été développées pour les besoins des biologistes et biochimistes, en particulier pour le marquage des biomolécules. Un résumé de ces méthodes et des agents utilisés est présenté dans le tableau I.1.

Fonctions chimiques couramment présentes à la surface des NP	Groupes fonctionnels des biomolécules utilisés pour le couplage	Exemples d'agents de couplage
COOH	NH ₂	NHS
NH ₂	COOH	NHS
NH ₂	NH ₂	glutaraldéhyde
NH ₂	SH	SMCC
SH	NH ₂	SMCC
OH	NH ₂	CDI

Table I.1 – Exemples de couplage possible entre la surface d'une nanoparticule inorganique et les fonctions disponibles de la biomolécule à greffer. Agent de couplage : NHS (N-hydroxysuccinimide), SMCC (succinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate), CDI (carbonyl diimidazole).

Enfin, une autre approche permettant de lier de façon covalente des biomolécules à la surface de nanoparticules métalliques consiste à exploiter directement les fonctions thiols présentes à la surface des biomolécules. De telles fonctions peuvent en effet être présentes nativement (résidus cystéine) ou être introduites chimiquement sans dénaturer les biomolécules. Même si cette approche est moins développée que l'utilisation d'agents de couplage, elle est parfois utilisée pour immobiliser des biomolécules de faibles poids moléculaires^{20,31} à la surface de nanoparticules d'or.

Malgré l'intérêt du greffage covalent il faut signaler que celui-ci peut engendrer des problèmes d'instabilité et de dénaturation³² de la molécule biologique, notamment si le lien entre la protéine et la nanoparticule est trop court. Ce problème reste une limitation importante dans la plupart des applications citées précédemment. Pour y remédier, Rotello et son équipe³³ ont par exemple utilisé des oligomères d'éthylène glycol pour espacer nanoparticules et protéines.

Les techniques de formation des nanostructures hybrides à partir de biomolécules et de nanoparticules sont donc très variées et vont dépendre principalement de la nature des objets et de leur utilisation potentielle. Les exemples présentés ci-dessus concernent des nanoparticules stabilisées par des molécules de faible poids moléculaire. Dans le cas d'une couronne polymère, les stratégies de couplage permettant d'immobiliser une biomolécules seront identiques. Une telle couronne présente plusieurs avantages. La présence de chaînes polymères va permettre d'augmenter les dimensions de la couronne organique des nanoparticules et de disposer d'un grand nombre de fonctions réactives. Les nano-objets particule/polymère vont aussi permettre de combiner les propriétés du cœur inorganique aux propriétés physico-chimiques particulières des polymères. Dans ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler

avec des nanoparticules dont la surface comporte une composante polymère. Dans le paragraphe suivant nous présentons les différentes stratégies permettant l'élaboration de ce type de système.

I.2 Synthèses de systèmes nanoparticule/polymère

I.2.1 Stratégies de synthèse de systèmes nanoparticule/polymère

Plusieurs stratégies ont été développées au cours des 15 dernières années pour synthétiser des objets de type nanoparticules-polymères. La première stratégie, qui est aussi la plus ancienne, consiste à générer une matrice polymère pour l'utiliser ensuite comme « template » pour synthétiser des nanoparticules. La seconde utilise une approche opposée dans laquelle le point de départ est une nanoparticule préalablement synthétisée et fonctionnalisée sur laquelle le polymère est introduit dans un second temps. Ces deux stratégies sont présentées ci-dessous.

I.2.1.1 Utilisation de copolymères à blocs comme nanoréacteurs

La synthèse de nanoparticules à l'aide de copolymères à blocs repose sur la formation de micelles dans lesquelles les nanoparticules sont formées, limitant ainsi leur agrégation. Les copolymères à blocs sont composés de deux parties « incompatibles », généralement un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe, qui dans un solvant sélectif (qui solubilise seulement l'un des blocs), vont s'autoassembler pour former des structures micellaires.

Généralement, ces micelles sont formées en milieu organique (micelles inverses) en présence des précurseurs inorganiques de la nanoparticule qui vont s'accumuler dans la partie hydrophile, c'est à dire le cœur des micelles. Ces dernières constituent donc des nanoréacteurs qui vont servir de « templates » et de stabilisants lors de la formation des nanoparticules par addition d'un agent réducteur (figure I.4). Cette stratégie est intéressante car elle permet d'obtenir des nanoparticules dont les caractéristiques sont définies par le copolymère utilisé. En jouant sur la longueur des différents blocs et sur la quantité de précurseur, il est possible de contrôler la taille des nanoparticules mais également leur espacement.

Cette stratégie a été développée par Antonietti et son équipe³⁴ qui ont utilisé des copolymères polystyrène-poly(4-vinylpyridine) dans du toluène pour synthétiser des nanoparticules de métaux nobles. Le poly(4-vinylpyridine) ayant un fort pouvoir chélatant, permet de fixer un grand nombre de précurseurs au cœur de la micelle. Les auteurs ont également montré

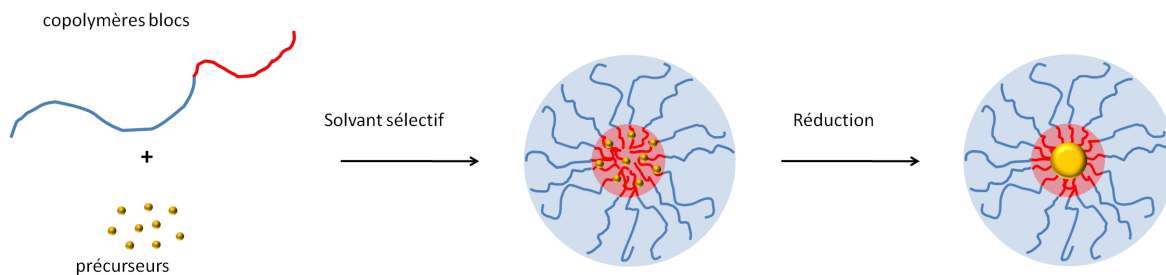


Figure I.4 – Synthèse de nanoparticules *via* l'utilisation de copolymères blocs

que le choix du réducteur régissait les caractéristiques des nanoparticules obtenues : l'utilisation d'agents réducteurs forts (type NaBH_4) entraîne des nucléations rapides et multiples et génère donc la croissance de plusieurs nanoparticules dans une même micelle. Une réduction plus lente permet au contraire d'obtenir une seule nanoparticule de taille plus élevée par micelle. Cette méthode a été également utilisée en solvant aqueux (micelle directe) par la même équipe³⁵ pour synthétiser des nanoparticules métalliques *via* l'utilisation de copolymères à blocs poly(4-vinylpyridine)-poly(oxyéthylène).

Néanmoins, il n'y a pas ici de liaison forte entre la nanoparticule et la couronne polymère qui est seulement adsorbée à la surface à la fin de la synthèse. La dispersion des nanoparticules va dépendre de la stabilité des micelles qui sont sensibles à de nombreux paramètres (solvant, pH, force ionique. . .). Pour éviter de déstabiliser les micelles lors de l'ajout de réducteur, Carrot et coll.³⁶ ont utilisé un rayonnement UV pour induire la réduction d' AuCl_3 et former des nanoparticules dans une micelle poly(acide acrylique)-polystyrène. Une autre méthode permettant d'augmenter la stabilité du système est d'utiliser non pas des micelles mais des copolymères blocs en forme d'étoile qui s'apparentent à des micelles unimoléculaires. Youk et coll.³⁷ ont ainsi utilisé une étoile possédant un centre constitué de poly(4-vinylpyridine) et des branches de polystyrène pour synthétiser des nanoparticules avec une stabilité accrue. Dans ce cas, le système est figé car les zones hydrophyles sont reliées entre elles de manière covalente (pas d'échange possible comme avec les micelles). Aujourd'hui cette approche unimoléculaire s'est développée en utilisant également des dendrimères³⁸ au lieu de copolymères avec pour effet l'obtention de systèmes ayant des stabilités de plusieurs mois.

Même si ces approches sont très intéressantes pour obtenir des nanoparticules stables et de taille contrôlée, elles possèdent cependant un inconvénient majeur si l'on veut exploiter la synergie des propriétés provenant de chaque composante du système. Il est en effet difficile de faire varier les propriétés de la composante polymère sans faire varier les caractéristiques

de la nanoparticule synthétisée. La taille de la nanoparticule va, par exemple, dépendre de la longueur des blocs dans le cœur de la micelle, mais surtout la nature du polymère est très limitée à cause de son rôle de nanoréacteur : le copolymère doit pouvoir former des micelles stables en solution. L'introduction de nouvelles fonctions sur les chaînes polymères risque de modifier les caractéristiques des micelles ou même d'empêcher leur formation.

I.2.1.2 Greffage de chaînes polymères à la surface de nanoparticules

Ainsi, une seconde stratégie vise à utiliser des nanoparticules préalablement synthétisées et d'introduire *a posteriori* des chaînes polymères à leur surface. Une des approches envisageables pour immobiliser des chaînes sur des nanoparticules correspond à l'adsorption de polymères, généralement de copolymères à blocs, à la surface. Wang et coll.³⁹ ont par exemple stabilisé des nanoparticules de CdSe en utilisant des copolymères polystyrène/poly(acide acrylique). Néanmoins, avec cette approche, les chaînes polymères sont seulement immobilisées par des liaisons faibles (liaisons électrostatiques de type Van der Waals ou hydrogène). Nous retrouvons les mêmes problèmes de stabilité et donc les mêmes limites que dans le cas des nanoréacteurs à base de micelles. Cette stratégie ne sera donc pas évoquée plus en détail ici. Nous nous intéressons davantage au greffage covalent des chaînes polymères sur les nanoparticules, seule approche possible permettant ensuite de manipuler facilement les nano-objets formés.

Le greffage covalent de chaînes polymères nécessite d'avoir des fonctions chimiques réactives à la surface des nanoparticules. Ces fonctions réactives peuvent être introduites selon les méthodes décrites dans le paragraphe I.1.3. Cette approche permet d'utiliser des nanoparticules dont les caractéristiques sont parfaitement définies et indépendantes de celles du polymère et des conditions de son greffage. Ceci permet donc de disposer d'une plus grande liberté dans le choix de la composante polymère pour exploiter en synergie les propriétés des nanoparticules et de la composante organique.

La partie suivante présente, à travers quelques exemples, les différentes méthodes utilisées dans la littérature pour greffer de façon covalente des chaînes polymères à la surface de nanoparticules préalablement synthétisées. Deux stratégies sont généralement utilisées (figure I.5). La première, appelée « grafting to », correspond au greffage de chaînes polymères pré-synthétisées. La seconde, la technique du « grafting from » est une polymérisation de monomères directement à partir de la surface de la nanoparticule. Ces méthodes de synthèse ont été généralement développées sur des surfaces planes (wafer de silicium...), avant d'être progressivement appliquées sur des nano-objets dispersés en solution.

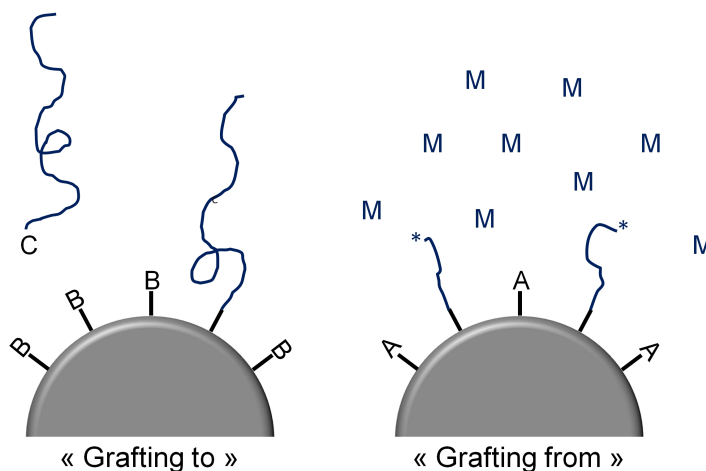


Figure I.5 – Greffage de chaînes polymères par « grafting from » et « grafting to »

I.2.1.2.a Technique du « Grafting to »

La technique du « Grafting to » correspond au greffage covalent de polymères fonctionnalisés en bout de chaîne, sur des fonctions réactives pré-existantes ou générées à la surface d'un substrat. L'avantage de cette méthode est que les chaînes polymères sont préalablement synthétisées en solution par n'importe quelle méthode de polymérisation. Cette technique peut donc être utilisée avec tout type de polymère, qui sont en plus généralement parfaitement caractérisés, ce qui n'est pas toujours le cas lorsque que l'on utilise le « grafting from ».

Le « Grafting to » a été utilisé très tôt pour fonctionnaliser des nanoparticules de silice en solution car ces dernières présentent nativement des fonctions Si-OH réactives à leur surface. Dès les années 70, Krenler et coll.⁴⁰ ont été les premiers à décrire le greffage de polystyrène et poly(méthacrylate de méthyle) sur des particules de silice, *via* la condensation d'un chlorosilane en bout de chaîne. Plus récemment, sur des nanoparticules de silice ont été greffées des chaînes de poly(diméthylsiloxane) terminées par une fonction hydroxyle (Auroy et coll.⁴¹), ou encore par des chaînes de poly(éthylène glycol) ayant une fonction N-succinimide en bout de chaîne (Zhang et coll.⁴²). Dernièrement, Hubner et coll.⁴³ ont greffé du polybutadiène et du polystyrène sur des nanoparticules de silice greffées de chlorosilanes et ont obtenu des densités de greffage allant jusqu'à 1 chaîne/nm², densités largement supérieures à ce qui avait été précédemment observé. Ils ont notamment synthétisé pour cela du polybutadiène par voie anionique et ont obtenu des chaînes de 13 000 à 589 000 g/mol avec des polydispersités très réduites (< 1.04). Pour obtenir des densités si élevées, le greffage des chaînes a été effectué sur des silanes multifonctionnels préalablement greffés sur les nanoparticules de silice de 10 nm de rayon.

Après la silice, d'autres types de nanoparticules ont été ainsi greffées de chaînes polymères. Ces travaux ont été initiés par le développement des techniques de fabrications de monocouches auto-assemblées sur des surfaces planes de différentes natures : wafers de silicium^{44, 45} substrats d'or^{46,47} ou encore de quartz.⁴⁸ Par exemple, Mansky et coll.⁴⁴ ont greffé des copolymères polystyrène/poly(méthyl méthacrylate) terminés par une fonction hydroxyle sur des monocouches de silanols introduits à la surface de wafers de silicium. La forte affinité existant entre l'or et les fonctions thiols a également été utilisée par Kousos et coll.^{46,47} pour greffer du polystyrène, synthétisé par voie anionique et terminé par une fonction thiol. Cette technique a ensuite été transposée sur des nanoparticules d'or. Ainsi, depuis les travaux de Wueffling et coll.⁴⁹ qui ont été les premiers à greffer du poly(éthylène glycol) fonctionnalisé par des thiols sur des nanoparticules d'or, beaucoup d'autres polymères ont été utilisés : poly(isopropylacrylamide),⁵⁰ copolymère poly(diméthylaminoéthyl méthacrylate)/poly(oxyéthylène)⁵¹ etc. ...

Généralement, par la technique du « Grafting to », seule une faible quantité de polymère peut être greffée sur une surface. En effet le greffage progressif des chaînes induit une gêne stérique qui limite l'accès à la surface pour d'autres chaînes. Cet accès est d'autant plus difficile lorsque le nombre de chaînes greffées et leur longueur augmentent. L'épaisseur de la couche ainsi que la densité de greffage sont donc limitées. Néanmoins, depuis peu, cette technique connaît un regain d'intérêt avec le développement de la « chimie click » qui permet, grâce à l'efficacité de la réaction, d'accéder à des densités de greffage assez élevées. White et coll.⁵² ont par exemple utilisé la cycloaddition d'un alcyne et d'un azoture pour greffer des chaînes de poly(acrylate de ter-butyle) et de polystyrène sur des nanoparticules d'oxyde de titane avec des densités de greffage proche de 0.5 chaîne/nm². Brittain et son équipe⁵³ ont également synthétisé par polymérisation radicalaire contrôlée, des chaînes de poly(acrylamide) et ont introduit en fin de chaîne une fonction alcyne. Ils ont ainsi pu greffer ces dernières par « chimie click » sur des nanoparticules de silice possédant des fonctions azotures et ont obtenu des densités de greffage de 0.3 chaîne/nm².

I.2.1.2.b Technique du « Grafting from »

La technique du « grafting from » permet de pallier aux limitations inhérentes au « grafting to », et d'obtenir des densités de greffage élevées. Cette technique consiste à mener directement la polymérisation à partir de la surface. Pour cela, un amorceur est préalablement immobilisé en une ou plusieurs étapes sur celle-ci. La polymérisation est alors conduite à partir de cet amorceur et seule la diffusion des monomères, et non plus des polymères, est limitante. Prucker et Rühle⁴⁵ ont été les premiers à utiliser cette approche, couplée à la

polymérisation radicalaire classique. Depuis, beaucoup se sont inspirés de ce travail et ont optimisé cette technique en l'associant à des techniques de polymérisations contrôlées pour obtenir des objets les mieux définis possibles. On trouve quelques exemples dans la littérature de polymérisations anioniques^{54,55} ou cationiques^{56,57} à la surface de nanoparticules, mais dans la majorité des cas, ce sont les polymérisations radicalaires contrôlées (PRC), plus facile à mettre en oeuvre, qui sont utilisées. Les principaux résultats concernant la combinaison du « grafting from » et des PRC à la surface de nanoparticules sont décrits dans le paragraphe suivant.

I.2.2 PRC à la surface de nanoparticules

Avant d'aborder les différents travaux publiés dans la littérature sur le greffage de nanoparticules en solution par des méthodes combinant « grafting from » et PRC, le principe de cette dernière ainsi que le mécanisme de chacune des trois principales méthodes, sont présentés dans les paragraphes suivants.

I.2.2.1 Principe de la PRC

Bien qu'elle soit facile d'utilisation et applicable à une large gamme de monomères, la polymérisation radicalaire « classique » ne permet pas de contrôler la taille et la polydispersité des chaînes greffées, à cause de la grande réactivité des radicaux alkyles, propices aux terminaisons irréversibles. Au contraire, une polymérisation « vivante » telle que la polymérisation anionique, permet d'obtenir des structures parfaitement définies mais les conditions de synthèse sont beaucoup plus strictes et rendent sa mise en oeuvre plus difficile. C'est pourquoi depuis une dizaine d'années, la technique du « grafting from » a été associée majoritairement à des polymérisations radicalaires contrôlées qui combinent les avantages des deux techniques précédentes (polymérisation radicalaire classique et polymérisation anionique).

Une polymérisation est dite vivante si le groupe terminal maintient sa réactivité suffisamment longtemps pour permettre une propagation continue sans réactions de terminaison irréversibles, et ce tout au long de la polymérisation. Dans le cas d'une PRC, il subsiste toujours des réactions de terminaison (même si elles sont limitées), c'est pourquoi elle est dite « contrôlée » et non pas « vivante ». La réactivité du radical est maintenue en piégeant de manière réversible les macroradicaux en croissance, permettant ainsi de travailler à une concentration en radicaux suffisamment faible pour que les réactions de terminaison irréversibles restent négligeables. Les caractéristiques principales d'une polymérisation contrôlée sont les suivantes :

- L'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ (où $[M]$ est la concentration en monomère au temps t et $[M]_0$ la concentration initiale) est linéaire en fonction du temps (ou en fonction de $t^{2/3}$ selon les conditions de polymérisation).
- La masse molaire du polymère (M_n) varie linéairement avec la conversion et son évolution suit une courbe théorique $M_n = DP_n \times M_{mono} = ([M]_0 - [M]) / [A]_0$ (M_{mono} est la masse molaire du monomère, $[M]$ la concentration en monomère, $[A]_0$ la concentration initiale en amorceur et DP_n le degré de polymérisation).
- L'indice de polydispersité I_p , défini par le rapport de la masse molaire en masse (M_w) et la masse molaire en nombre (M_n), doit diminuer avec le temps pour tendre vers une distribution de Poisson ($I_p = 1 + 1/DP_n$).

L'emploi de ces techniques pour introduire les chaînes polymères sur des surfaces (planes ou nanoparticules) repose généralement sur une étape préalable d'immobilisation d'un amorceur de polymérisation, dont la nature va dépendre de la technique de polymérisation choisie. Dans la partie suivante, les trois principales techniques de PRC sont présentées : la RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer), la NMP (Nitroxide Mediated Polymerization) et l'ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization) ainsi que les principaux travaux concernant leur utilisation pour greffer des polymères à la surface de nanoparticules.

I.2.2.2 Polymérisation Radicalaire par Transfert d'Atome (ATRP) en surface

L'ATRP est aujourd'hui la plus utilisée des PRC. Dans cette technique, une espèce dormante (halogénure d'alkyle noté $P_n\text{-X}$) réagit avec un activateur (complexe métallique à faible degré d'oxydation, noté $M_t^n\text{-Y/Ligand}$), pour former de manière réversible une espèce active d'une part (chaîne en croissance, notée P_n^\bullet) et un désactivateur (complexe métallique à un degré d'oxydation plus élevé, noté $X\text{-}M_t^{n+1}\text{-Y/Ligand}$) d'autre part. Le mécanisme de cette réaction est présenté sur la figure I.6. L'équilibre de cette réaction est fortement déplacé vers la formation de l'espèce dormante, ce qui permet de garder une concentration en espèce radicalaire toujours faible. Comme pour la NMP, la cinétique est régie par l'effet radical persistant.⁵⁸

Les équipes de Matyjaszewski⁵⁹ et de Sawamoto⁶⁰ ont été les premières à développer cette technique en utilisant respectivement des complexes à base de cuivre et de ruthénium. Le choix du ligand, du métal de transition, ainsi que leur proportions respectives vis-à-vis de l'amorceur et du monomère sont des facteurs déterminants, tant du point de vue du contrôle de la réaction, de sa vitesse que du taux de conversion.⁶¹ Une revue présentant le rôle de ces

wafer de silicium, sur lequel ont été immobilisés au préalable des amorceurs déposés en utilisant la technique Langmuir-Blodgett. La polymérisation a été menée en présence de CuBr et d'un ligand dérivé de la bipyridine mais également d'amorceurs libres en solution, pour avoir une concentration suffisante en espèce désactivante et permettre ainsi le contrôle de la polymérisation. Une conséquence de cette méthode est la formation de chaînes non greffées en solution. Matyjaszewski et coll.⁶⁷ ont eu une autre approche pour assurer le contrôle de la polymérisation. Au lieu d'ajouter de l'amorceur en solution, ils ont utilisé directement une espèce désactivante. Le métal de transition sous sa forme oxydée (ici CuBr₂) a été introduite en faible quantité et a permis le contrôle de la polymérisation, sans nécessiter la présence d'amorceur sacrificiel.

Le passage d'une surface plane à une nanoparticule engendre les mêmes questions sur la nécessité d'ajouter ou non de l'amorceur ou des espèces désactivantes en solution. Patten et Von Werne⁶⁸ ont été les premiers à utiliser l'ATRP pour greffer des nanoparticules de silice. Ils ont également étudié l'influence du monomère et de la taille des nanoparticules sur le contrôle de la polymérisation⁶⁹ afin de déterminer si il était possible de ne pas recourir à l'ajout d'amorceur sacrificiel en solution. Cette étude a montré que la polymérisation du styrène dans du xylène à 110°C sur des particules de 75 nm de diamètre en présence du couple métal/Ligand CuBr/dNbipy, est contrôlée sans amorceur libre. Par contre, la polymérisation du méthacrylate de méthyle dans les mêmes conditions ne présente pas un bon contrôle et nécessite l'ajout d'une faible quantité d'amorceur libre. Dans le cas de nanoparticules de taille plus importante (300 nm), quelque soit le monomère, la polymérisation n'est pas contrôlée et l'ajout d'amorceur libre est indispensable. Les différences observées entre des nanoparticules possédant des diamètres de 75 nm et 300 nm s'expliquent par les différences de concentration moyenne en amorceur greffé. En effet, cette concentration passe de 10^{-4} mol.L⁻¹ dans le cas des nanoparticules de 300 nm de diamètre à 10^{-3} mol.L⁻¹ pour des nanoparticules de 75 nm de diamètre (pour une concentration en silice identique). Seul le dernier cas permet d'obtenir des concentrations en Cu(II) (10^{-3} mol.L⁻¹ à 10^{-4} mol.L⁻¹)⁷⁰ assurant des vitesses de désactivation des chaînes en croissance suffisantes. Des ajouts d'espèces désactivantes (CuBr₂) ont également été effectués mais ils n'ont pas amélioré de manière significative le contrôle de la polymérisation.

Dans la plupart des travaux postérieurs à cette étude, une faible quantité d'amorceur a donc généralement été rajoutée en solution. Une conséquence de cet ajout est la présence de chaînes libres en solution qui peuvent ensuite être caractérisées pour mesurer la longueur et la polydispersité des chaînes greffées. Cependant, il est alors nécessaire d'ajouter une étape

supplémentaire de purification pour séparer chaînes greffées et non greffées.

Les travaux originaux menés sur les nanoparticules de silice ont été étendus à d'autres types de nanoparticules au fil des progrès réalisés dans leur synthèse. Ainsi, « grafting from » et ATRP ont été appliqués sur des nanoparticules d'or,^{71,72,73,74,75} d'oxydes métalliques (TiO₂,^{76,77} Fe₃O₄,^{78,79} ZnO⁸⁰...), ou de CdSe.⁸¹ Quel que soit le type de nanoparticule, l'unique différence dans la méthode de synthèse réside dans l'immobilisation de l'amorceur à la surface de la nanoparticule. Sur la silice, le greffage peut se faire en une seule étape comme l'ont montré Patten et son équipe,⁶⁸ par condensation d'un silane greffé par un amorceur, préalablement fonctionnalisé, ou bien en deux étapes comme l'ont effectué El Harrak et coll.,⁸² en greffant tout d'abord un silane ayant une fonction thiol, suivi d'un surgreffage d'amorceur directement à la surface des nanoparticules. Sur les nanoparticules d'oxyde métallique, la même méthode en une ou deux étapes a été employée par différentes équipes en utilisant la réactivité des groupes M-OH vis à vis des silanes.^{80,78,79}

Le cas des nanoparticules d'or est celui qui ressemble le plus au cas présenté dans cette thèse (nanoparticules de platine). Généralement, sur une surface d'or, le greffage d'amorceurs est effectué à nouveau en tirant profit de la forte affinité entre les thiol et ce métal. L'introduction de l'amorceur est possible selon les différentes voies évoquées dans le paragraphe I.1.3 pour l'introduction de molécules bifonctionnelles à la surface des nanoparticules. On peut ainsi exploiter des réactions d'échange de molécules stabilisantes,^{73,74} utiliser directement des thiols dotés de fonctions amorçantes lors de la synthèse des nanoparticules,^{71,72} ou encore procéder par surgreffage.⁷⁵ Ces différentes approches laissent un large choix pour fonctionnaliser les nanoparticules d'or. Le paragraphe suivant la seconde technique de PRC utilisée, qui est la NMP.

I.2.2.3 Polymérisation Radicalaire Controlée par les Nitroxydes (NMP) en surface

De même que l'ATRP, la Polymérisation aux Nitroxydes (Nitroxide-Mediated Polymerization, NMP) repose sur un équilibre réversible entre espèces dormantes et espèces actives (macroradi-caux en croissance). L'équilibre est fortement déplacé vers les espèces dormantes. Le mécanisme est fondé sur la rupture homolytique de la liaison C-ON, libérant un radical alkyle qui va s'ajouter sur un monomère pour donner une chaîne de polymère en croissance et un radical nitroxyde qui joue ici le rôle de contrôleur. Cette réaction est résumée sur la figure I.9. Les premiers travaux utilisant des alcoxyamines comme contrôleur ont été publiés dans les années 80 par Rizzardo et son équipe.⁸³ Georges et coll.⁸⁴ ont par la suite

développé cette technique et montré qu'il était possible de contrôler la polymérisation du styrène en utilisant du TEMPO (figure I.8).

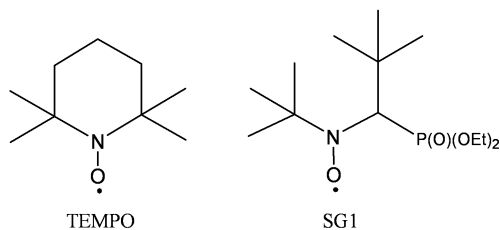


Figure I.8 – Exemples de nitroxydes utilisés en NMP

Néanmoins, l'utilisation de cette alcoxyamine est limitée aux monomères de type styrénique. Les principaux développements de la NMP concernent la synthèse de nouvelles alcoxyamines^{85,86} permettant d'élargir l'éventail de monomères compatibles avec cette technique. Une revue présentant les différentes possibilités offertes par la NMP a été publiée par Hawker et son équipe⁸⁷ en 2001.

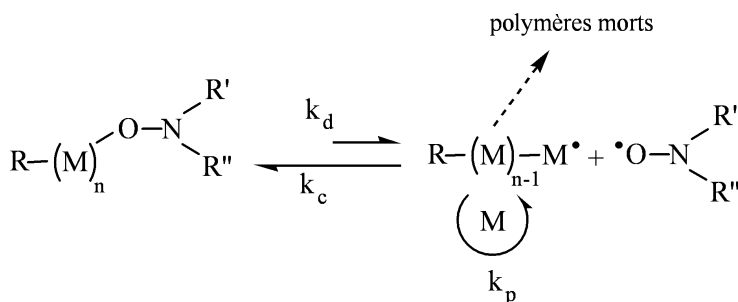


Figure I.9 – Mécanisme réactionnel de la NMP

Le principal avantage de la NMP est sa facilité de mise en œuvre ainsi que sa tolérance aux impuretés du milieu réactionnel. De plus, le contrôleur (l'alcoxyamine) peut jouer également le rôle d'amorceur, ce qui simplifie le système. Néanmoins, ces fonctions alcoxyamines sont instables à haute température et les plus efficaces ne sont pas encore disponibles commercialement, comme le SG1 (figure I.8). Enfin, par rapport à l'ATRP, l'éventail de monomères pouvant être utilisés est plus restreint.

Les premiers travaux utilisant la NMP pour greffer des chaînes polymère sur une surface ont été publiés par Hawker et son équipe.⁸⁸ Ces derniers ont polymérisé du styrène à partir d'une alcoxyamine dérivé du TEMPO préalablement greffé sur un wafer de silicium. Comme pour l'ATRP, se pose la question de l'ajout ou non de contrôleur en solution pour avoir une concentration suffisante en espèces désactivantes. De leur côté, Husseman et coll. ont travaillé en présence d'alcoxyamines libres en solution (amorceur sacrificiel) pour obtenir un

utiliser dans le cas de l'ATRP. Cette polymérisation est simple à mettre en œuvre, il n'existe cependant pas d'agent de transfert universel, et la plupart d'entre eux ne sont pas commerciaux. De plus, la présence d'une extrémité soufrée peut poser des problèmes de toxicité ou de réactivité, dans certains cas.

La RAFT étant une technique de polymérisation relativement récente, son utilisation pour greffer des polymères sur des surfaces est peu répandue. Deux stratégies différentes ont été décrites dans la littérature. La première stratégie, présentée par Brittain et coll.,⁹⁵ a été utilisée pour greffer du polystyrène et du poly(méthacrylate de méthyle) sur des wafers de silicium. Brittain et son équipe ont montré qu'il était possible de contrôler la polymérisation à partir d'une surface fonctionnalisée par des amorceurs azoïques par ajout en solution à la fois d'amorceurs sacrificiels et d'agents de transfert. Dans ce travail, les auteurs ont montré que la polydispersité des chaînes augmentait avec la quantité d'amorceur sacrificiel, et également que les caractéristiques des chaînes greffées sont très proches des chaînes libres présentes en solution. Cette stratégie a été principalement utilisée sur des surfaces planes.

La seconde possibilité évoquée dans la littérature consiste à immobiliser, directement à la surface, un agent de transfert en le greffant par le biais d'un des atomes de soufre, soit en exploitant le groupement noté Z sur la figure I.10. Li et coll.⁹⁶ ont ainsi fonctionnalisé des nanoparticules de silice à l'aide d'agents de transferts greffés par un organo-silane et ont étudié l'influence de la densité de greffage sur la polymérisation de styrène et d'acrylate de butyle. Cette technique a également été utilisée pour fonctionnaliser des nanoparticules d'or,⁹⁷ d'oxyde de titane⁹⁸ ou de CdSe.⁹⁹ Néanmoins, dans le cas du greffage de l'agent de transfert par l'atome de soufre, la liaison formée est labile et implique obligatoirement un détachement de l'agent de transfert durant la polymérisation. Dans le cas d'un greffage par le groupement noté Z, ce phénomène est évité mais le système peut être comparé à du « grafting to » car au fur et à mesure que les chaînes croissent, l'agent de transfert est de moins en moins accessible à cause d'une gêne stérique. La RAFT appliquée au « grafting from » présente également un certain nombre d'inconvénients par rapport à l'ATRP. La synthèse et le greffage d'agents de transfert en surface restent difficiles, et cette méthode s'accompagne obligatoirement de la formation chaînes libres en solution.

Il apparaît donc à la suite de cette étude bibliographique que la combinaison ATRP et « grafting from » permet d'obtenir plus facilement des nanoparticules densément greffées. C'est cette méthode qui sera utilisée pour introduire un enrobage polymère à la surface des nanoparticules de platine utilisées dans ce travail. Parmi les objectifs de notre travail figure

la réalisation de systèmes hybrides nanostructurés modèles, actifs vis-à-vis de la détection électrochimique du glucose. Avant d'en venir à ces aspects et de présenter globalement nos objectifs nous revenons dans le paragraphe suivant sur la présentation succincte des dispositifs de type biocapteurs enzymatiques.

I.3 Nanoparticules et biocapteurs enzymatiques

Nous avons évoqué précédemment que la réalisation de biocapteurs constitue un domaine des biotechnologies dans lequel l'association de nanoparticules et biomolécules est une voie prometteuse. Avant d'aborder la présentation des travaux publiés mettant en jeu de telles nanostructures hybrides et les axes de recherche principaux, nous présentons le fonctionnement des biocapteurs enzymatiques ampérométriques.

I.3.1 Biocapteurs électrochimiques

Les biocapteurs sont des systèmes analytiques permettant la détection et le dosage de substances d'intérêt biologique. Le fonctionnement d'un biocapteur est basé sur l'association d'un composant biologique appelé biorécepteur, et d'un transducteur physico-chimique. Le biorécepteur assure la reconnaissance de l'espèce à détecter grâce à des sites spécifiques donc sélectifs. Sa nature va dépendre de la molécule cible à identifier (enzymes, anticorps, peptide...). Le transducteur permet de transformer cette interaction spécifique en un signal aisément mesurable qui constitue la réponse du biocapteur. La figure I.11 illustre différents types de récepteurs et de mode de transduction proposés dans la littérature.

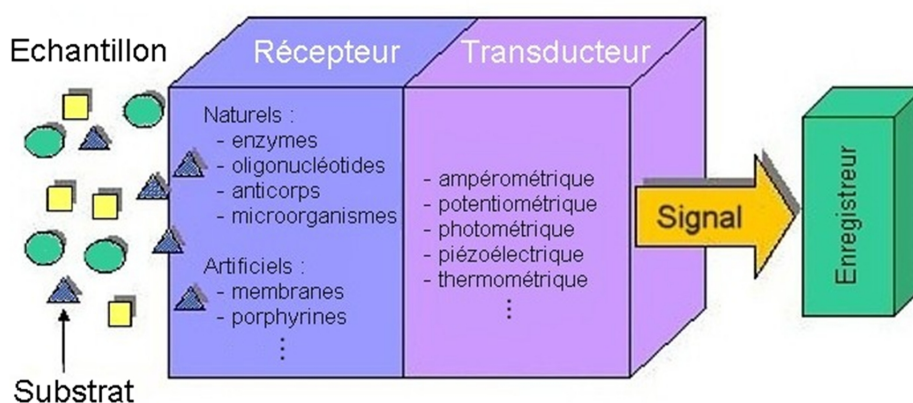


Figure I.11 – Schéma de principe du biocapteur

Ainsi, parmi les différents types de biocapteurs, il est possible d'effectuer une classifica-

tion en fonction du mode de transduction utilisé. On distingue ainsi quatre grandes classes de biocapteurs : optiques, gravimétriques, calorimétriques et électrochimiques. C'est à ce dernier type de capteur que nous allons nous intéresser particulièrement.

Dans un biocapteur de type électrochimique, l'information biologique liée à la reconnaissance de la molécule est directement convertie en signal électrique. En fonction de leur mode de fonctionnement, les capteurs électrochimiques peuvent être répartis en 3 groupes principaux.

- Les biocapteurs électrochimiques potentiométriques qui reposent sur une mesure de variation de potentiel mesurée par rapport à une électrode de référence.
- Les biocapteurs électrochimiques conductimétriques qui détectent un changement de conductivité entre deux électrodes.
- Les biocapteurs électrochimiques ampérométriques qui mesurent le changement du courant entre deux électrodes à potentiel constant.

Les capteurs les plus utilisés sont aujourd'hui les capteurs ampérométriques. Dans le paragraphe suivant, nous allons détailler leur fonctionnement à travers l'exemple des biocapteurs à glucose.

I.3.2 Biocapteurs enzymatiques ampérométriques à glucose

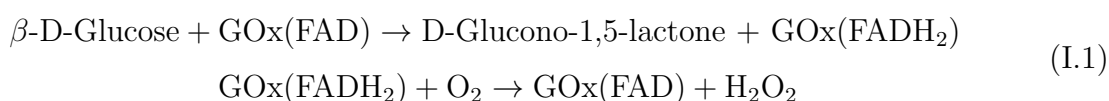
I.3.2.1 Principe de fonctionnement

Les biocapteurs ampérométriques ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études, en particulier ceux utilisant des enzymes. Ils reposent sur la mesure d'un courant à potentiel imposé constant. Un montage à trois électrodes permet de polariser la bioélectrode et de mesurer simultanément le courant résultant de la réaction de détection du substrat biologique. Dans un tel système, il est en général indispensable que les enzymes consomment ou produisent une molécule qui soit électroactive. Ce type de biocapteur présente généralement un temps de réponse court et une bonne sensibilité, mais la nécessité de polariser l'électrode peut dans certains cas, être la cause de problèmes de sélectivité. En effet, si la bioélectrode nécessite un potentiel élevé pour fonctionner, il est possible d'oxyder certains composés présents dans le milieu biologique, avec pour conséquence une perte de sélectivité.

En fonction de l'enzyme utilisée dans de tels systèmes, il est possible de cibler précisément la détection d'une molécule. Dans cette partie, nous nous consacrerons exclusivement à l'étude de biocapteurs ampérométriques à glucose. Ces biocapteur ont été les premiers

capteurs élaborés en immobilisant des enzymes sur une électrode de platine.¹⁰⁰ Ils restent encore aujourd'hui les plus étudiés,^{101,102} notamment à cause de l'importance du marché que représente le contrôle de la glycémie des personnes souffrant de diabète. Les capteurs à glucose représentent aujourd'hui environ 85% de marché total des biocapteurs.¹⁰¹

Depuis les premiers travaux de Clark et Lyons dans les années 60,¹⁰⁰ l'élaboration de biocapteur à glucose est basée sur l'immobilisation de glucose oxydase (GOx) sur une électrode (généralement en platine). La glucose oxydase est une enzyme dimérique qui catalyse l'oxydation du glucose en gluconolactone¹⁰³ en présence d'oxygène dissous dans le milieu réactionnel (équation I.1).



Au cours de la réaction, le site actif de la GOx, la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) oxyde le glucose en gluconolactone. Sa forme réduite (FADH₂), est ensuite régénérée en réduisant l'oxygène dissous dans le milieu en H₂O₂. L'activité enzymatique de la GOx se traduit donc par une augmentation de la concentration locale en H₂O₂, ainsi que par la diminution de la concentration d'oxygène dans le milieu.

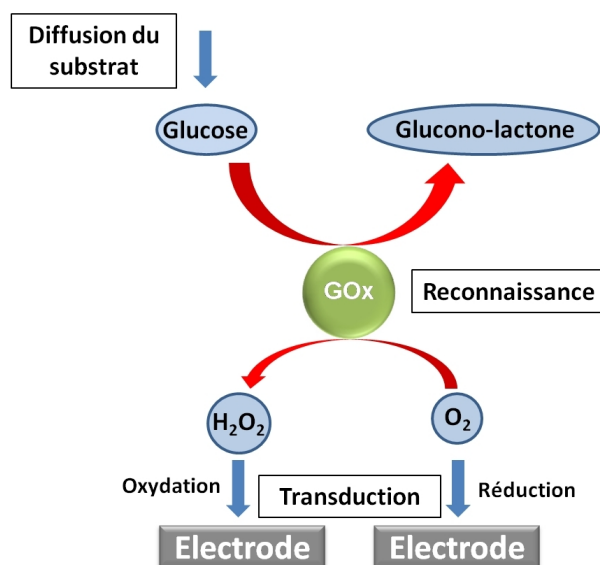


Figure I.12 – Schéma de fonctionnement d'un biocapteur à glucose

Le processus global de détection du glucose est schématisé sur la figure I.12. Ce processus comprend plusieurs étapes. La première correspond à la diffusion du glucose jusqu'à la GOx. La seconde est la reconnaissance du substrat par l'enzyme qui émet alors une information

de nature chimique (consommation de O_2 et production de H_2O_2). Pour que cette information chimique soit convertie en courant électrique, il est alors nécessaire que les molécules produites ou consommées diffusent entre le transducteur et l'enzyme. Ces deux molécules étant électroactives, deux possibilités existent pour suivre l'activité de la GOx : la réduction d' O_2 ou l'oxydation d' H_2O_2 . Au cours des 50 dernières années, les deux voies ont été utilisées et d'autres stratégies ont également été explorées afin d'améliorer la sensibilité et la sélectivité des capteurs à glucose. Ces principaux axes de développement sont présentés dans le paragraphe suivant.

I.3.2.2 Principaux axes de développement

Pour réaliser le tout premier biocapteur à glucose, Clarck et Lyons¹⁰⁰ ont utilisé une membrane de dialyse semi-perméable pour immobiliser la GOx sur l'électrode en platine. La sélectivité de la membrane (assurant par ailleurs le blocage d'espèces interférentes) permet la diffusion de l'oxygène en solution jusqu'à la cathode où il est réduit selon l'équation suivante :



Une électrode de platine est ici utilisée car ce métal permet de catalyser la réaction d'oxydation de l'oxygène et de mesurer un courant significatif au potentiel utilisé. Le courant mesuré à l'état stationnaire est proportionnel à la concentration en substrat (glucose) dans des conditions où la quantité de dioxygène n'est pas limitante. Cependant, la quantité d'oxygène présente dans le milieu est susceptible de varier indépendamment de la réaction catalytique, (à cause de la température par exemple). Pour résoudre ce problème, Updike et Hicks¹⁰⁴ ont introduit une seconde électrode permettant de mesurer ces éventuelles variations de concentration de l'oxygène. Il est en fait plus simple d'exploiter la production de H_2O_2 . Ainsi, en 1973, Guilbault et Lubrano¹⁰⁵ ont été les premiers à utiliser l'oxydation de H_2O_2 (équation I.3) pour suivre l'activité enzymatique de la GOx. Cette stratégie permet d'obtenir des biocapteurs offrant une bonne précision.



Toutefois, cette méthode de détection est pénalisée par la forte surtension requise pour oxyder H_2O_2 . Dans ces conditions des courants parasites dus à d'autres espèces électroactives potentiellement présentes dans les milieux complexes (milieux biologiques), telles que l'acide ascorbique, peuvent apparaître. L'utilisation de membranes de dialyse de faible porosité permet de limiter voire d'empêcher la diffusion de tels interférents jusqu'à l'électrode. Cependant, elle a pour conséquences une augmentation du temps de réponse et une élévation

du seuil de détection.

Afin d'améliorer la sensibilité et la sélectivité des biocapteurs à glucose, une deuxième génération de biocapteur a été développée. L'objectif est ici d'abaisser le potentiel de travail afin de limiter l'oxydation d'espèces annexes. L'un des moyens d'y parvenir est de remplacer l'oxygène, dont le rôle est de réactiver le site actif de l'enzyme, par d'autres accepteurs d'électrons dont le potentiel redox est plus bas. Ces espèces sont appelés « médiateurs ». Le principe de cette stratégie est résumé dans la figure I.13.

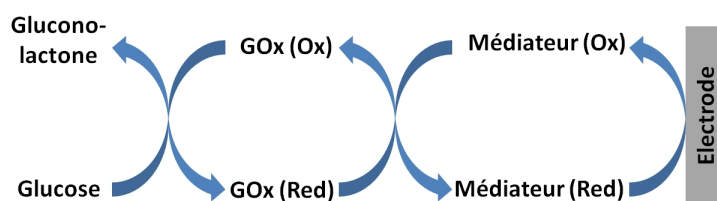


Figure I.13 – Schéma du fonctionnement d'un biocapteur utilisant un médiateur.¹⁰¹

Les médiateurs peuvent être de nature organique ou inorganique, et sont ajoutés en solution dans le milieu. Les plus fréquemment employés sont des complexes de métaux de transition (ferrocène,¹⁰⁶ ferricyanure¹⁰⁷ ou encore complexe de ruthenium¹⁰⁸) ou les dérivés de quinones.^{109,110} Ces espèces doivent être capables de diffuser jusqu'à l'enzyme afin de la régénérer à la manière de l'oxygène et doivent assurer le transfert électronique entre le site actif de celle-ci et l'électrode. Leur potentiel redox doit être à la fois suffisamment élevé par rapport à celui du site actif de l'enzyme pour permettre sa réoxydation, et suffisamment bas pour permettre une restauration aisée du médiateur après sa réduction. La vitesse du transfert électronique *via* le médiateur doit également être suffisamment élevée par rapport à la réaction de l'enzyme avec l'oxygène, pour pouvoir minimiser la compétition entre l'oxygène et le médiateur. Par l'utilisation de médiateurs, la mesure devient indépendante de la pression en oxygène et peut être effectuée à des potentiels plus faibles.

Enfin une dernière évolution a consisté à tenter d'éviter les éventuels problèmes liés à la diffusion des médiateurs utilisés en solution et également d'améliorer le transport des charges entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode en créant un contact direct entre les deux. Elle consiste à introduire des médiateurs qui sont immobilisés dans la structure de l'électrode (figure I.14). Heller et son équipe^{111,112} ont par exemple relié l'enzyme à la surface de l'électrode avec des chaînes de poly(vinyl pyridine) ou de poly(vinyl imidazole) préalablement greffées de complexes d'osmium, servant de relais électroniques. Ceci permet de réduire

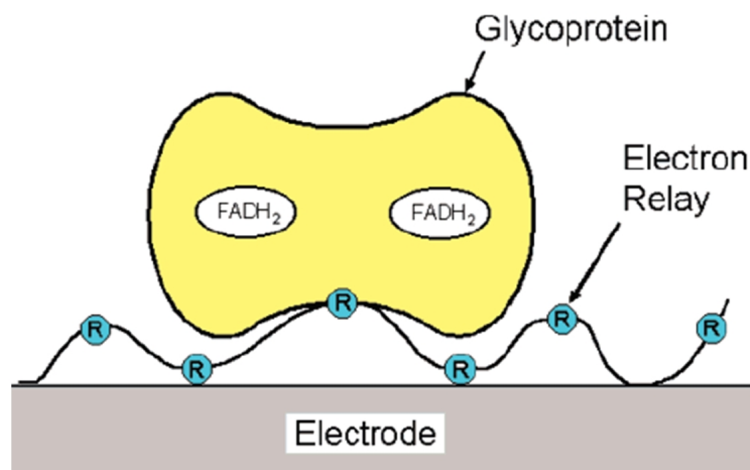


Figure I.14 – Utilisation d'un polymère redox pour relier l'enzyme à l'électrode.¹⁰¹

la distance entre le site actif de l'enzyme et les centres redox. Le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode ne se fait plus par diffusion des médiateurs mais directement dans le film conducteur, d'un relai électronique à l'autre. Des polymères conducteurs (poly(aniline), poly(pyrrole) ou encore poly(thiophène)) ont également été utilisés.¹¹³ Le polymère assure ici lui-même le rôle de médiateur et le transport des charges jusqu'à l'électrode.

I.3.2.3 Biocapteurs à glucose et nanoparticules

Plus récemment, les progrès réalisés dans la synthèse de nanoparticules (principalement d'or ou de platine) ont permis de développer de nouveaux types de biocapteurs. Dans le cas de l'or les nanoparticules ont pour rôle essentiel d'améliorer le transport des électrons depuis les enzymes jusqu'au collecteur de courant.¹¹⁴ Ainsi, plusieurs études mentionnent la formation de telles structures pour la détection de glucose.²⁶ Les nanoparticules d'or sont couramment associées à des nanotubes de carbone^{115,116} ou encore insérées dans des matrices polymères.^{117,118} Peu de travaux présentent la formation de structures basées exclusivement sur des nanoparticules et des enzymes. Willner et son équipe ont par exemple immobilisé sur une électrode des nanoparticules d'or greffées de glucose oxydase par le biais de leur site actif.¹¹⁹ Ils ont ainsi obtenu une nanostructure très particulière dans laquelle les nanoparticules d'or servent à la fois de relais électronique et assure une connection électrique directe à l'échelle moléculaire entre le site actif et le collecteur de courant. Dans cette structure le site actif est directement régénéré par l'apport d'électron *via* les nanoparticules avec une vitesse très supérieure à celle observée lors de la régénération « naturelle » de l'enzyme par l'oxygène.

Dans le cas des structures incorporant des nanoparticules de platine, ce sont à la fois le rôle de relais électronique et les propriétés catalytiques de ces nanoparticules qui sont

exploitées. Les nanoparticules de platine ont donc un rôle dans la transduction. Quelques études récentes rapportent de telles approches. Halaoui et son équipe¹²⁰ ont par exemple synthétisé des nanoparticules de platine stabilisées par des glucoses oxydases et ont montré que dans cette configuration les enzymes gardaient leur propriétés électrocatalytiques. Ce système, formé en solution, peut être déposé sur un support d'électrode (*via* un film de polyélectrolyte) et a permis la détection de glucose. Willner et son équipe²³ ont également formé des structures hybrides par électrodéposition à partir de nanoparticules de platine fonctionnalisées et de glucose oxydase chimiquement modifiée. La stratégie utilisée par ces derniers pour former ces structures, est décrite figure I.15.

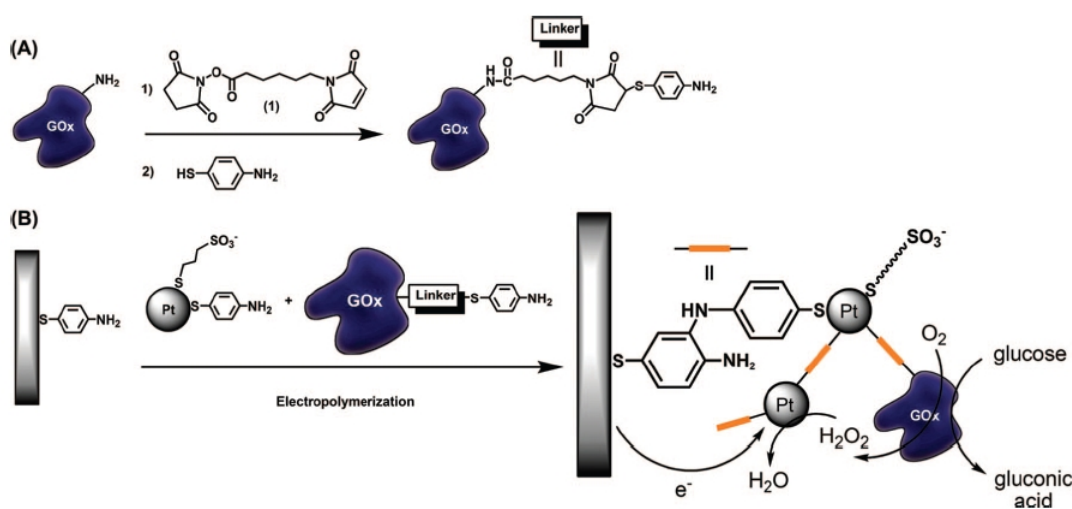


Figure I.15 – Formation de structures hybrides GOx-nanoparticules de platine par électrodéposition²³

Cette approche présente l'intérêt d'une grande versatilité. En faisant varier de manière contrôlée le rapport entre enzymes et nanoparticules de platine lors de l'électrodéposition, Willner et son équipe ont ainsi pu contrôler la quantité d'enzymes dans la couche hybride et évaluer son impact sur la sensibilité du biocapteur. La figure I.16 présente les résultats obtenus. Dans un premier temps, l'intensité du courant augmente comme attendu, avec la quantité d'enzymes car la quantité d'H₂O₂ produite croît simultanément. Cependant, au delà d'une certaine valeur, le courant décroît fortement et les auteurs expliquent que l'augmentation de la quantité d'enzymes dans la structure isole progressivement les nanoparticules les une des autres. Même si H₂O₂ est produit en quantité importante, la moindre efficacité du transport des charges électroniques induit une limitation de la réponse du capteur.

Les travaux que nous venons d'évoquer illustrent le grand intérêt de l'approche bottom-up dans le domaine des biocapteurs enzymatiques. Elle offre en effet la possibilité de contrô-

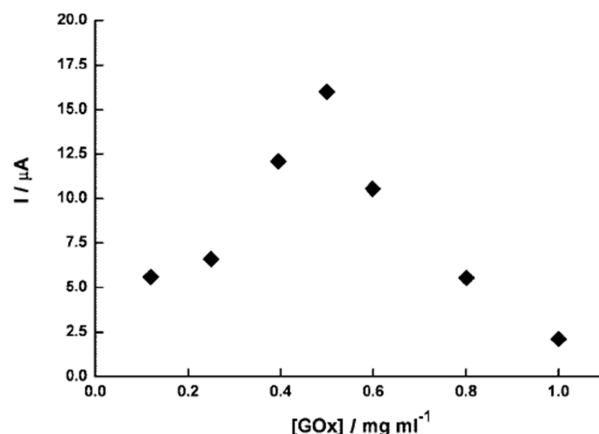


Figure I.16 – Evolution du courant en fonction de la quantité de GOx dans les structures Pt-GOx formée par Willner et son équipe.²³

ler la constitution des structures mais aussi l'organisation et la nature des briques qui les composent (nanoparticules, molécules, enzymes) et ainsi d'identifier plus facilement quels sont les paramètres les plus déterminants vis-à-vis de la réponse du biocapteur. Cette réponse résulte en effet d'une cascade de phénomènes se déroulant à l'échelle nanométrique (diffusion de matière, reconnaissance, transport des charges), dont il est difficile d'estimer les impacts respectifs sur la réponse électrochimique globale. Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans cette démarche. L'approche que nous avons adoptée est présentée ci-dessous.

I.4 Positionnement du sujet et objectifs de la thèse

Nous proposons ici de former des structures hybrides nanoparticules-polymère-enzymes par une approche bottom-up. Notre objectif est de réaliser des structures modèles, au sens où nous tenterons de contrôler de manière la plus fine possible les caractéristiques de celles-ci à l'échelle nanométrique. Ce contrôle intervient à la fois au niveau de la structures des briques élémentaires synthétisées en plusieurs étapes et puis au niveau de leur organisation.

Les nano-objets de départ utilisés dans ce travail sont constitués de nanoparticules de platine de deux nanomètres de diamètre, fonctionnalisées par des molécules de 4-mercaptoaniline. La fonction amine externe de ces nanoparticules permet de modifier à loisir les caractéristiques de l'enrobage organique. L'élément déterminant dans le choix de ces objets tient au fait que ces nanoparticules conservent des propriétés catalytiques vis-à-vis d'espèces redox spécifiques tel que l'oxygène, malgré la présence de l'enrobage organique^{121,122} (figure I.17). Ceci indique qu'il existe à la surface de ces objets des sites de platine disponibles qui le

resteront, même si l'enrobage organique initial est modifié par réaction chimique.

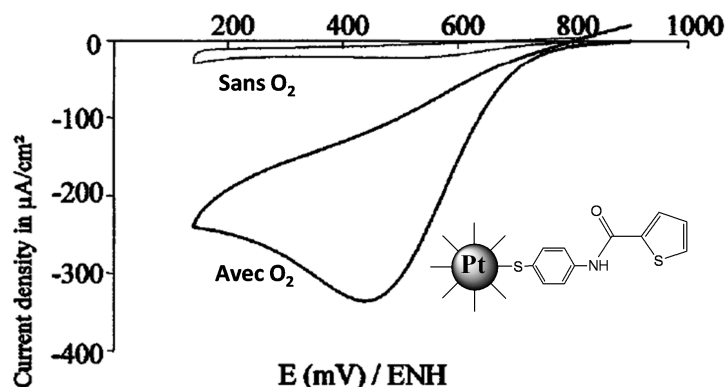


Figure I.17 – Voltampérogramme mettant en évidence l'accessibilité des sites catalytiques des nanoparticules de platine lors de la réduction d' O_2 .¹²¹

Dans ce travail, notre premier objectif est de modifier ces nanoparticules afin d'obtenir à leur surface, une couronne de polymère. Nous allons combiner la technique du « grafting from » et la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) pour obtenir des enrobages de poly(méthacrylate de tert-butyle) qui seront hydrolysés pour former du poly(acide méthacrylique). Ce choix doit nous permettre d'introduire des fonctions chimiques nécessaires au greffage ultérieur de glucose oxydase. Comme nous le verrons, les enrobages polymères de taille variable nous permettront de moduler l'organisation des nanoparticules dans des structures en film mince (figure I.18). Les objets seront finement caractérisés, en particulier par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).

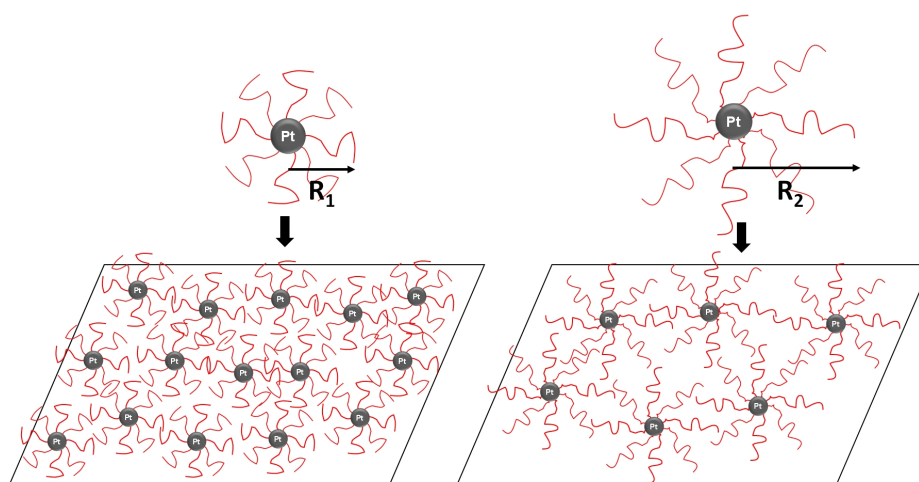


Figure I.18 – Illustration de la modulation de l'organisation des briques élémentaires en film mince en fonction de la longueur des chaînes polymères.

A partir des différentes briques élémentaires synthétisées, notre deuxième objectif est d'élaborer différentes nanostructures hybrides platine-polymère-glucose oxydase à l'état solide. Enfin, nous chercherons à évaluer le comportement électrochimique de ces différents systèmes vis-à-vis de H_2O_2 puis enfin du glucose (figure I.19).

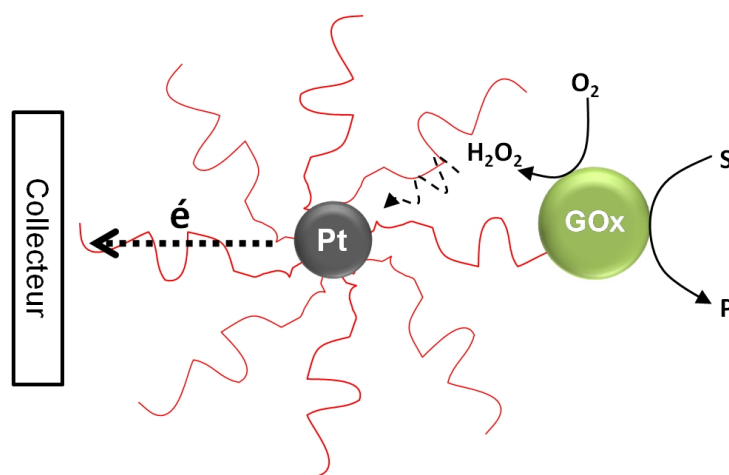


Figure I.19 – Schéma de détection du glucose *via* l'utilisation de nanostructures hybrides platine-polymère-glucose oxydase.

CHAPITRE II

Chapitre II

Nanoparticules de platine greffées de polymère : synthèse et étude en solution

Contents

II.1 Introduction	53
II.2 Synthèse de nanoparticules de platine amorçantes	53
II.2.1 Synthèse de nanoparticules de platine fonctionnalisées	53
II.2.2 Surgreffage d'un amorceur de polymérisation	54
II.2.3 Caractérisation des nanoparticules obtenues	55
II.2.3.1 Taille et polydispersité des nanoparticules de platine	55
II.2.3.2 Caractéristiques de la couronne d'amorceurs	57
II.3 ATRP en surface des nanoparticules de platine	61
II.3.1 Définition et optimisation des conditions de polymérisation	61
II.3.1.1 Monomères utilisés	62
II.3.1.2 Choix de l'amorceur, du complexe métallique et proportions respectives	63
II.3.1.3 Pertinence de l'utilisation d'amorceurs sacrificiels	64
II.3.1.4 Masses molaires théoriques visées	65
II.3.2 Caractérisation de la couronne polymère des nanoparticules	66
II.3.2.1 Suivi cinétique	66
II.3.2.2 Estimation de taille de la couronne polymère par ATG	68
II.3.3 Tentatives de dégreffage des chaînes	72
II.3.3.1 Dissolution de la nanoparticule de platine	72
II.3.3.2 Rupture de la liaison Pt-S	73
II.3.3.3 Rupture de la liaison amide	73
II.4 Caractérisation par DNPA des nanoparticules greffées de polymère	74
II.4.1 Introduction à la DNPA	74
II.4.1.1 Intensité diffusée	75

*CHAPITRE II. NANOPARTICULES DE PLATINE GREFFÉES DE POLYMÈRE :
SYNTHÈSE ET ÉTUDE EN SOLUTION*

II.4.1.2	Notion de contraste	76
II.4.1.3	Notion de variation de contraste	76
II.4.2	Contribution de la nanoparticule greffée d'amorceurs	77
II.4.3	Etude de la couronne de poly(méthacrylate de n-butyle)	80
II.4.3.1	Modélisation avec le facteur de forme d'une étoile	82
II.4.3.2	Calcul de la masse molaire de polymère par nanoparticule	84
II.4.4	Etude de la couronne de poly(méthacrylate de tert-butyle)	86
II.4.4.1	Mise en évidence d'un phénomène d'agrégation	88
II.4.4.2	Influence de la longueur des chaînes et de la redispersion des nanoparticules sur l'agrégation	88
II.4.4.3	Influence des conditions de polymérisation	90
II.5	Conclusion	93

II.1 Introduction

Ce deuxième chapitre est consacré à la synthèse des nanoparticules de platine greffées de polymères qui constituent les briques élémentaires des nanostructures que nous cherchons à élaborer. Pour synthétiser ces nano-objets, nous avons choisi de combiner la technique du « grafting from » à la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP). Cette stratégie implique plusieurs étapes : synthèse des nanoparticules de platine, surgreffage d'amorceurs de polymérisation et polymérisation en surface. Les caractéristiques des objets synthétisés à chacune de ces étapes ont été obtenues principalement par analyses thermogravimétriques (ATG) et spectroscopie infra-rouge. Ces mesures ont par la suite été complétées par une étude détaillée par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) qui a permis d'avoir accès à la taille et à la structure des nanoparticules greffées de polymères ainsi qu'à la longueur et la densité de greffage des chaînes.

II.2 Synthèse de nanoparticules de platine amorçantes

II.2.1 Synthèse de nanoparticules de platine fonctionnalisées

La synthèse de ces nanoparticules de platine fonctionnalisées par de la 4-mercaptoaniline a été publiée en 1999 par H. Perez.¹²³ Cette méthode est basée sur la réduction de sel de platine (PtCl_4) par un hydrure (NaBH_4) en présence de stabilisants (4-mercaptoaniline) introduits sous la forme de 2,2'-disulfure de diamino-diphényle (figure II.1).

Des expériences préliminaires¹²³ ont montré qu'en présence du disulfure en solution, la réduction de PtCl_4 est fortement ralentie. C'est pourquoi le disulfure est introduit seulement une vingtaine de seconde après NaBH_4 . Pendant ce laps de temps très court, il est nécessaire d'utiliser un milieu qui stabilise les nanoparticules en formation. Ce milieu est constitué d'hexylamine dont les fonctions amines interagissent avec la surface du platine. Une fois les nanoparticules formées, les stabilisants sont remplacés par les thiolates formés à partir du disulfure (car la liaison Pt-S est plus forte que la liaison Pt-N). Après un lavage à l'eau visant à éliminer les sous-produits issus de NaBH_4 , le volume du milieu réactionnel est réduit par évaporation. Du disulfure est alors à nouveau ajouté à la solution afin d'optimiser le taux de couverture de la surface des nanoparticules et le milieu est laissé sous agitation pendant 12h. Les nanoparticules sont ensuite isolées et lavées par plusieurs cycles de précipitation/centrifugation dans un mélange éther/éthanol.

Une fois séchées, ces nanoparticules ont l'avantage crucial de pouvoir se ressolubiliser

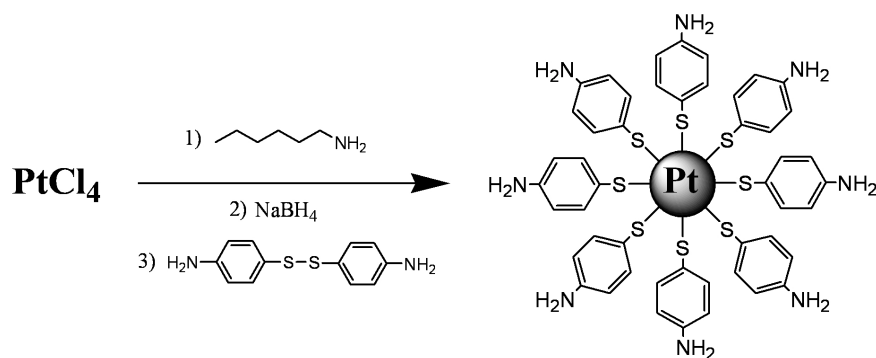


Figure II.1 – Synthèse de nanoparticules de platine.

spontanément dans un solvant aprotique et polaire tel que le diméthylacétamide (DMAc) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO). Néanmoins, cette seule fonctionnalisation ne permet pas une longue stabilité dans le temps (environ quelques semaines). La dégradation chimique de la 4-mercaptoaniline entraîne à long terme la floculation des nanoparticules¹²⁴ lorsqu'elles sont en solution, ou leur agrégation irréversible lorsqu'elles sont sous forme de poudre. Il est donc nécessaire d'exploiter la réactivité des fonctions amines disponibles, rapidement après la synthèse des nanoparticules.

II.2.2 Surgreffage d'un amorceur de polymérisation

Les fonctions amines présentes à la surface externe des nanoparticules permettent d'utiliser un large choix de molécules pour modifier l'enrobage.¹²⁴ Ces réactions de greffage utilisant l'amine de la mercaptoaniline sont appelées ici « surgreffages » (figure II.2). L'efficacité de la réaction de surgreffage va être principalement liée à un facteur stérique contrôlé par la taille de la molécule que l'on souhaite greffer, mais aussi par l'accessibilité de sa fonction réactive.¹²⁵

Dans ce travail, nous souhaitons utiliser les nanoparticules de platine comme « macro-amorceurs » lors d'une polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP). Nous avons donc décidé de greffer à leur surface du bromure de 2-bromo-isobutyryle. Cette molécule possède une fonction bromure d'acyle qui va être utilisée pour la réaction d'amidation avec la fonction amine de la mercaptoaniline et une seconde fonction halogénée qui servira d'amorceur pour l'ATRP. Pour cette étape, nous redispersons les nanoparticules de platine fonctionnalisées dans du DMAc à une concentration de 3 mg/mL. Nous ajoutons dans cette solution de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) qui permet de piéger l'acide bromhydrique libéré lors du surgreffage. Le bromure de bromo-isobutyrate est ensuite introduit en large excès (6 équivalents par rapport à la quantité de 4-mercaptoaniline). Au bout de 16 heures de réaction, les nanoparticules surgreffées sont précipitées par addition dans l'acétonitrile.

Plusieurs lavages sont effectués par des cycles de précipitation/centrifugation dans un mélange éther/acétonitrile afin d'éliminer les molécules de bromure de bromo-isobutyrate en excès et la DMAP.

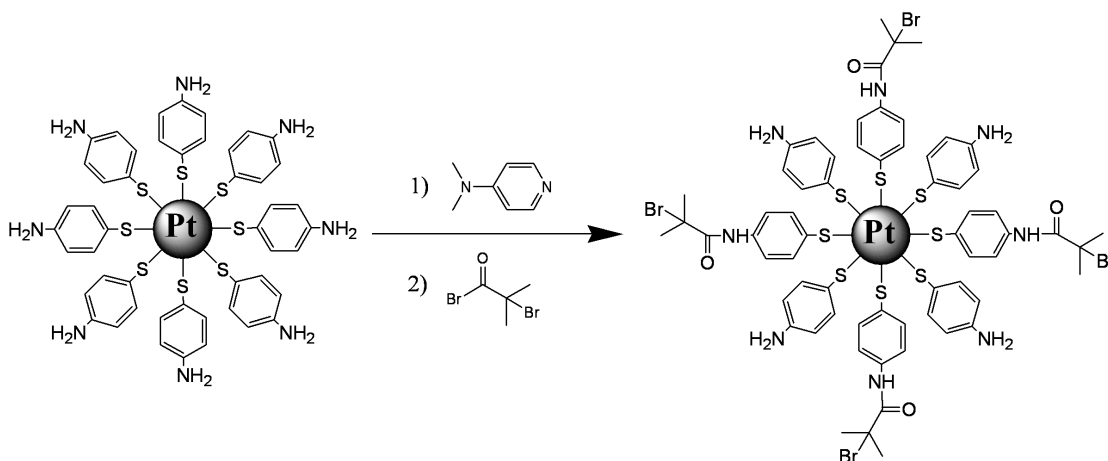


Figure II.2 – Réaction de surgreffage de l'amorceur.

A l'issue de la synthèse, nous obtenons une poudre séchée sous azote qui peut alors être caractérisée. Comme les nanoparticules fonctionnalisées, cette poudre se ressolubilise spontanément dans des solvants aprotiques polaires. Le surgreffage permet aussi de remédier à l'instabilité de la 4-mercaptoaniline. Les solutions obtenues sont alors très stables dans le temps.

II.2.3 Caractérisation des nanoparticules obtenues

Pour caractériser les nanoparticules de platine obtenues, trois techniques ont été principalement utilisées. Tout d'abord la diffraction de rayons X (DRX) qui permet d'étudier le cœur métallique, et ensuite, la thermogravimétrie (ATG) et la spectroscopie infra-rouge qui permettent de déterminer la composition de la couche organique des nanoparticules.

II.2.3.1 Taille et polydispersité des nanoparticules de platine

Les caractérisations structurales des nanoparticules de platine par diffraction de rayons X sont effectuées au Laboratoire de Physique du Solide à Orsay (P.-A. Albouy). Ces expériences peuvent être conduites aux grands angles ou aux petits angles. Aux grands angles (figure II.3a), les pics de Bragg observés correspondent à la structure CFC du platine. Le diamètre moyen des nanoparticules a été calculé à partir de la largeur à mi-hauteur du pic (111) en utilisant la formule de Scherrer ou par une procédure d'ajustement du pic 111 prenant en

compte la population de tailles de nanoparticules très voisines.¹²³ Le diamètre moyen du cœur métallique des nanoparticules ainsi obtenu est de $20,3 \pm 2 \text{ \AA}$.

Aux petits angles (figure II.3b), nous observons un pic de structure qui peut être relié à la distance inter-particule mesurée de centre à centre. L'existence de ce pic illustre la faible polydispersité en taille du cœur des nanoparticules. Ce type de caractérisation a été mise en œuvre au cours d'études précédentes sur des nanoparticules fonctionnalisées et sur des nanoparticules obtenues par différentes réactions de surgreffage.^{125, 126} Si les réactions de surgreffage effectuées sur la nanoparticule n'altèrent pas les caractéristiques du cœur de platine, elles influent cependant sur la distance inter-particules de manière plus ou moins importante selon les caractéristiques de la molécule surgreffée.¹²⁶

La poudre de nanoparticules amorçantes possède donc, pour le cœur minéral, les caractéristiques de la nanoparticule fonctionnalisée. La distance inter-particule indiquée par les RX aux petits angles est logiquement un peu plus élevée que celle des nanoparticules fonctionnalisées : 3.5 nm contre 3.2 nm pour ces dernières.

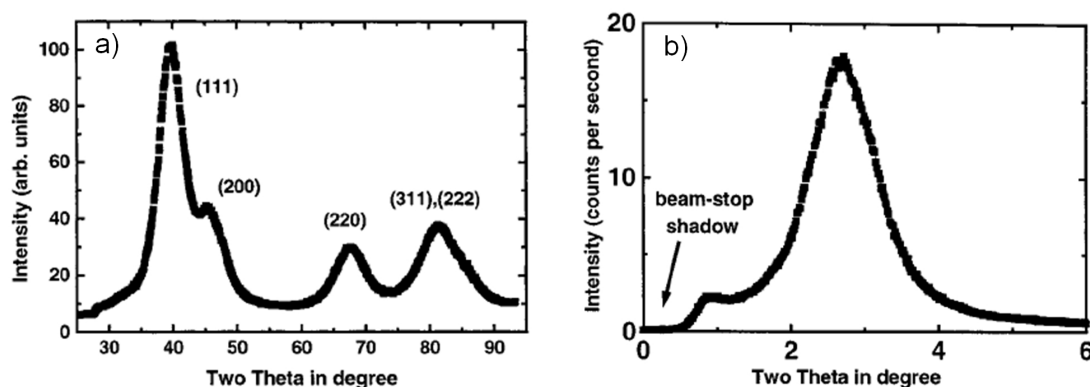


Figure II.3 – Spectre de DRX de nanoparticules fonctionnalisées¹²³ aux grands angles (a) et aux petits angles (b), l'indexation correspondant à une structure cfc.

Ces études ont permis d'estimer un nombre moyen d'atomes par particule (de l'ordre de 265) qui conduit à une masse molaire d'environ $52\,000 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse molaire sera utilisée plus tard pour calculer la quantité d'amorceurs et de polymères par nanoparticule. Les nanoparticules de platine obtenues ont été également observées par microscopie électronique en transmission (MET). Le cliché présenté ci-dessous (figure II.4) confirme la taille des nanoparticules, proche de 2 nm et également la faible polydispersité en taille.

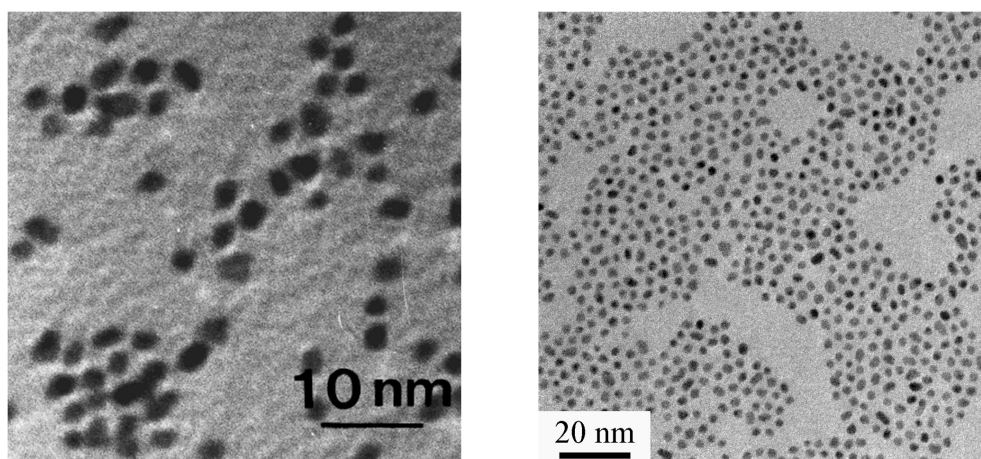


Figure II.4 – Images MET de nanoparticules de platine fonctionnalisées.¹²³

II.2.3.2 Caractéristiques de la couronne d'amorceurs

Les caractéristiques du cœur métallique étant déterminées, nous cherchons à étudier plus précisément la couronne des nanoparticules amorçantes. La spectroscopie infra-rouge nous permet dans un premier temps de vérifier que la réaction de greffage s'est bien produite. L'ATG permet d'obtenir une information quantitative sur la composition de cette couronne organique. En effet, pour pouvoir utiliser ces nanoparticules comme « macro-amorceur » lors de la polymérisation, il faut connaître précisément le nombre d'amorceurs présents par nanoparticule afin de définir les quantités de autres réactifs nécessaires. Les analyses thermogravimétriques sont un outil idéal pour cela car elles permettent de mesurer le pourcentage massique de matière organique (noté « %_wMO » dans les équations suivantes) des nanoparticules et d'en déduire un taux de surgreffage.^{125,126,127} En se basant sur des considérations structurales et géométriques (taille moyenne des nanoparticules, hypothèse sur leur forme), il est possible d'estimer les densités de molécules à la surface des nanoparticules.¹²⁸

La figure II.5 présente les spectres infra-rouge obtenus à partir des nanoparticules de platine avant et après la réaction de surgreffage. Sur le spectre a, correspondant aux nanoparticules fonctionnalisées, la bande d'absorption située à 1620 cm^{-1} est caractéristique de la vibration de déformation de la liaison N-H de la fonction amine. Les pics situés à 1585 cm^{-1} et 1488 cm^{-1} correspondent aux vibrations des liaisons C=C du cycle aromatique. Le pic caractéristique de la vibration de la liaison C-N est visible à 1290 cm^{-1} . Enfin le pic situé à 1175 cm^{-1} correspond à la vibration des liaisons C-H du noyau aromatique. Le spectre infra-rouge obtenu à partir des nanoparticules surgreffées (spectre b) est très similaire au précédent. Nous retrouvons les mêmes pics caractéristiques auxquels viennent s'ajouter d'autres pics attestant de la présence de l'amorceur greffé. Un épaulement est visible à 1680 cm^{-1} ,

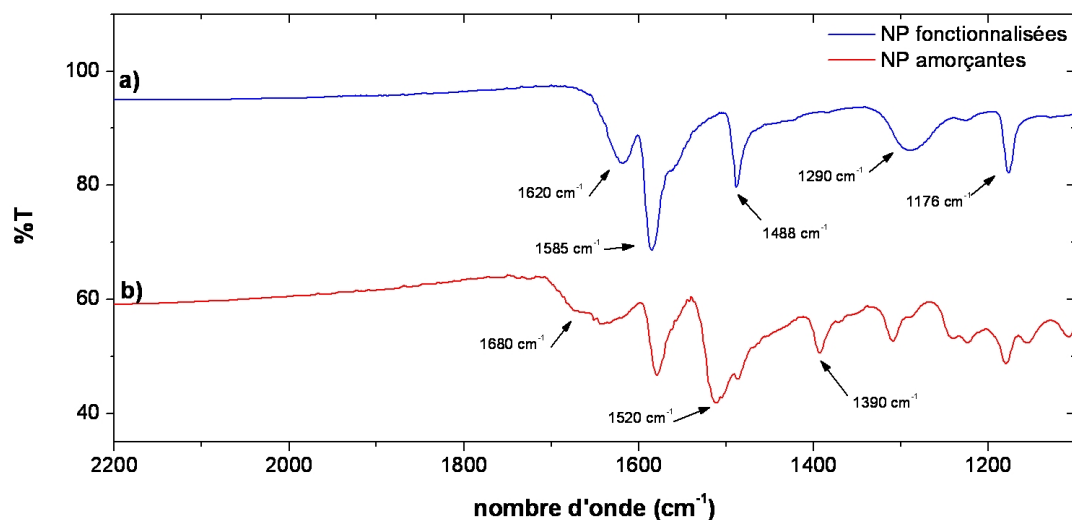


Figure II.5 – Spectres infra-rouge des nanoparticules fonctionnalisées (a) et des nanoparticules amorçantes (b).

il correspond à la liaison C=O de l'amide. Le pic apparaissant à 1393 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-H des groupements méthyles. Enfin un pic de forte intensité apparaît à 1520 cm^{-1} . Il correspond à la vibration du groupement C-N-H de la fonction amide formée. L'amorceur est donc présent à la surface des nanoparticules.

Comme nous l'avons dit précédemment, l'ATG permet d'obtenir des informations sur la proportion de matière organique par rapport au cœur de platine ($\%_w\text{MO}$) et d'en déduire la composition de la couronne. Cette technique nous a également permis de vérifier facilement la reproductibilité de la synthèse des nanoparticules et de l'étape de surgreffage en comparant les taux de matière organique mesurés. En effet, si la taille des nanoparticules varie, ou si le surgreffage échoue, les pourcentages de matière organique vont être modifiés. Un exemple d'ATG effectuée sur les deux types de nanoparticules est présenté figure II.6.

Généralement, une dizaine de milligrammes de nanoparticules sont introduits dans le four. La température reste alors constante à 100 °C pendant 15 minutes pour enlever toute trace de solvant résiduel. La température augmente ensuite de 10 °C/min jusqu'à atteindre 900 °C sous air, pour s'assurer que la totalité de la partie organique est bien éliminée. La figure II.6 montre que les deux types de nanoparticules sont stables jusqu'à approximativement 200 °C . Au delà, la couche organique est progressivement détruite jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un résidu de platine présentant l'aspect du métal massif, résultat de la fusion et de la coalescence des nanoparticules. L'analyse thermogravimétrique effectuée sur des nanoparticules fonctionnalisées montre un taux de matière organique toujours compris entre

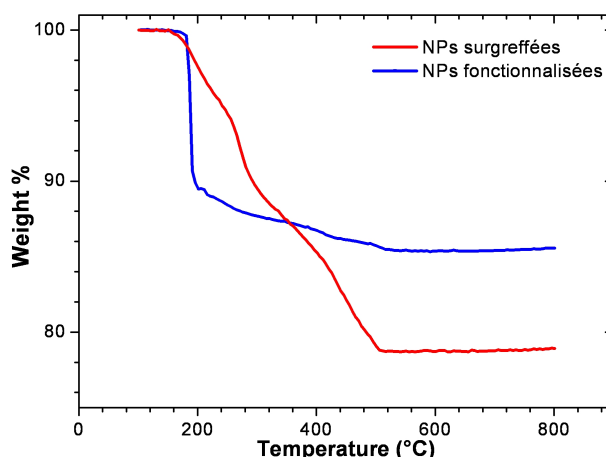


Figure II.6 – Analyses thermogravimétriques des nanoparticules fonctionnalisées et surgreffées.

14% et 15% en masse. Cette valeur correspond à la couronne de mercaptoaniline et permet de calculer un nombre de moles par gramme de platine (équation II.1). Elle va servir de référence pour calculer la quantité d’amorceurs greffés.

$$n_{aniline}/g_{platine} = \frac{\frac{\%_w aniline}{\%_w Pt}}{M_{aniline}} \quad (\text{II.1})$$

L’analyse thermogravimétrique effectuée sur les nanoparticules surgreffées donne un taux de matière organique proche de 20%, confirmant le succès de la réaction. Ce taux correspond donc à la couronne d’amorceurs, ajouté à la couronne de mercaptoaniline initialement présente. Il est donc possible de calculer à partir des analyses ATG, le nombre de moles d’amorceurs en fonction de la quantité de nanoparticules (équation II.2).

$$n_{amorceurs}/g_{platine} = \frac{\frac{\%_w MO}{\%_w Pt} - \frac{\%_w aniline}{\%_w Pt}}{M_{amorceur\ greffé}} \quad (\text{II.2})$$

A partir des valeurs calculées précédemment, nous avons déterminé l’efficacité de la réaction de surgreffage (taux de surgreffage) de l’amorceur. Ce taux correspond au rapport molaire des quantités d’amorceur et de mercaptoaniline par gramme de platine (équation II.3).

$$\%_{surgreffage} = \frac{n_{amorceurs}/g_{platine}}{n_{aniline}/g_{platine}} \times 100 \quad (\text{II.3})$$

Pour s’assurer de la reproductibilité des réactions successives, des analyses ATG ont été réalisées systématiquement. La figure II.7 résume les pourcentages de matière organique obtenus pour chaque type de nanoparticule et ce, pour l’ensemble des synthèses effectuées.

Nous pouvons observer qu’ hormis pour les synthèses 3, 9 et 15 où les résultats sont inhabi-

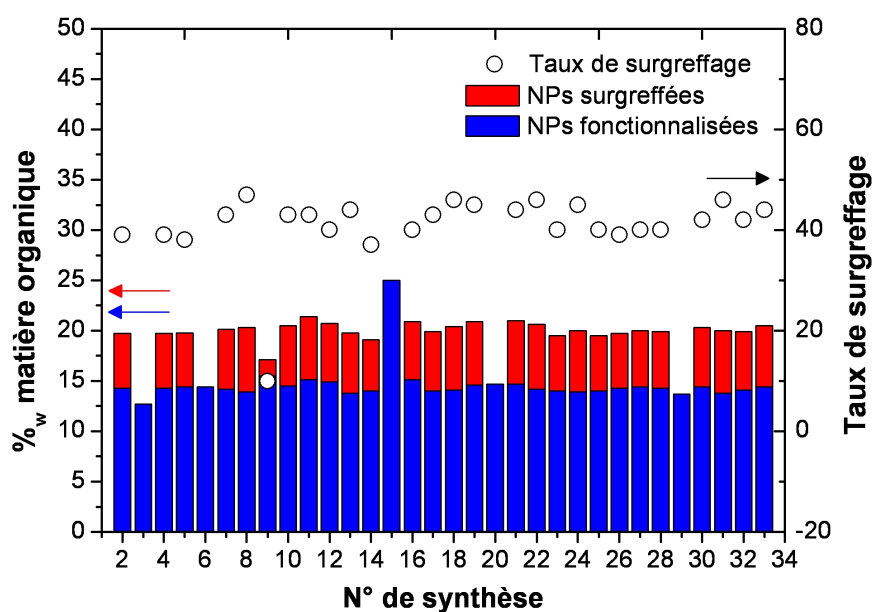


Figure II.7 – Caractérisation des nanoparticules amorçantes par ATG : mesure des %_w de matière organique et calcul du l'efficacité du greffage.

tuels, le protocole de synthèse et la réaction de surgreffage sont parfaitement reproductibles. Le taux de surgreffage mesuré est de $42\% \pm 2\%$ en fonction des synthèses. Cette valeur est tout à fait similaire à celles obtenues pour des surgreffages d'autres molécules de faibles poids moléculaires.¹²⁵

La reproductibilité des caractéristiques des nanoparticules amorçantes est essentielle, car les études de polymérisation nécessitent de réaliser de nombreuses synthèses (une synthèse de nanoparticules amorçantes fournit environ 300 mg de poudre, soit la quantité pour 1 ou 2 polymérisations seulement). La détermination de la teneur en amorceur des nanoparticules amorçantes est également cruciale pour calculer les quantités de réactifs (monomère, cuivre, ligand) utilisées lors de la polymérisation.

Il est intéressant d'exploiter les données issues de l'ATG pour obtenir des informations locales telles que la densité moyenne de molécules à la surface des nanoparticules. Pour accéder à ces valeurs, il faut considérer une taille moyenne du cœur de platine (2 nm) et faire une hypothèse sur la forme des objets afin d'estimer le nombre moyen d'atomes de platine par nanoparticule. La publication originale de la synthèse¹²³ rapporte ainsi, sur la base d'analyses élémentaires et d'une forme cubique des nanoparticules, une densité de mercaptoaniline de 7.14 molécules/nm². L'hypothèse d'une forme cubique s'avère peu réaliste pour des questions d'énergie libre de surface, et dans un second temps,¹²⁸ les nanoparticules ont été considérées

comme cuboctaédriques. En fait la microscopie électronique haute résolution montre que les nanoparticules ont différentes formes. Aussi, dans ce travail, pour calculer la densité de mercaptoaniline à la surface, nous avons considéré que les nanoparticules étaient sphériques et utilisé les valeurs de teneur organique fournies par les mesures ATG (qui restent très proches de celles fournies par les analyses élémentaires). Dans ces conditions, la surface moyenne d'une particule est estimée à 12,5 nm². Pour la particule amorçante, la densité d'amorceurs peut être calculée en utilisant le taux de surgreffage (tableau II.1).

type de NP	taux de matière organique	molécules/NP	densité de greffage (molécule/nm ²)
fonctionnalisées	14.4	71	5.7
surgreffées	20.3	30	2.4

Table II.1 – Caractéristiques de la couronne organique des nanoparticules fonctionnalisées et surgreffées.

Le protocole de greffage utilisé permet finalement d'obtenir des nanoparticules de platine possédant à leur surface des molécules d'amorceurs avec une densité de greffage élevée (2,4 molécules/nm²) de façon reproductible. Cette densité de greffage élevée est rendue possible grâce à la couronne de mercaptoaniline très dense, initialement présente. Cette valeur est beaucoup plus élevée que les densités de greffage de chaînes polymères obtenues par ATRP sur des nanoparticules données dans la littérature (généralement inférieures à 1 chaîne/nm²).^{78,71,72} Par conséquent, les densités de greffage en polymère mesurées ne sont pas limitées par la quantité d'amorceurs initiales. Il est cependant probable que l'efficacité de l'étape d'amorçage ne soit pas de 100%, c'est à dire que tous les amorceurs ne donnent pas une chaîne en croissance à cause de l'encombrement stérique.

II.3 ATRP en surface des nanoparticules de platine

II.3.1 Définition et optimisation des conditions de polymérisation

Comme nous l'avons dit dans le chapitre précédent, l'ATRP est une technique bien adaptée pour la polymérisation à la surface de nanoparticules. Dans cette partie, nous présenterons les réactifs utilisés pour effectuer la polymérisation en surface des nanoparticules de platine par ATRP, ainsi que leurs conditions d'utilisation.

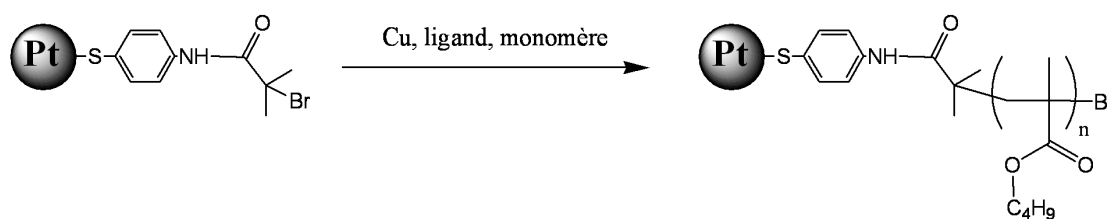


Figure II.8 – Schéma de la polymérisation par ATRP de méthacrylate de butyle à la surface des nanoparticules de platine.

II.3.1.1 Monomères utilisés

Des travaux antérieurs¹²⁹ ont été effectués au LLB sur la polymérisation de méthacrylate de n-butyle (MAnBu) (figure II.9) à la surface de nanoparticules de silice. Nous avons donc, dans un premier temps, développé un protocole de polymérisation sur les nanoparticules de platine avec ce monomère qui a l'avantage d'être facilement polymérisable par ATRP.

L'objectif de notre étude étant de greffer des molécules biologiques, nous nous sommes ensuite orienté vers le méthacrylate de tert-butyle (MAtBu) (figure II.9). Le polymère formé (PMAAtBu) à l'avantage d'être hydrolysable et de pouvoir ainsi générer le poly(acide méthacrylique) (PMAA) qui va permettre, comme nous le verrons par la suite, de greffer une enzyme *via* ses fonctions COOH. L'hydrolyse du PMAAtBu se fait très facilement et de manière totale : plusieurs travaux montrent qu'il est possible de réaliser une hydrolyse du groupement tert-butyle soit par une attaque acide, soit par un traitement thermique.^{130, 67, 131, 132} La structure du MAtBu étant très proche de celle du MAnBu, nous avons utilisé le protocole développé pour ce dernier pour mener la polymérisation de MAtBu à la surface des nanoparticules. Nous rappelons également ici que la polymérisation directe de l'acide méthacrylique n'est pas possible par ATRP à cause de la complexation parasite du complexe métallique avec le monomère pour former un carboxylate métallique, le rendant alors inefficace pour la catalyse de l'ATRP.^{61, 133}

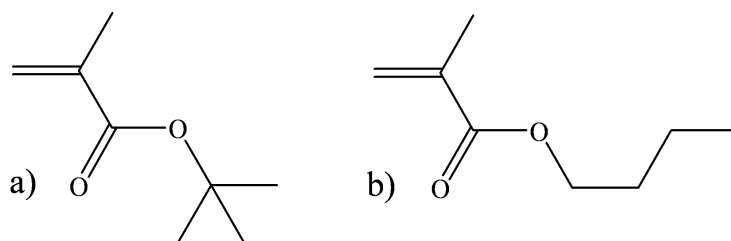


Figure II.9 – Monomères utilisés pour fonctionnaliser les nanoparticules de platine : a) méthacrylate de tert-butyle (MAtBu) b) méthacrylate de n-butyle (MAnBu).

II.3.1.2 Choix de l'amorceur, du complexe métallique et proportions respectives

Pour réaliser l'ATRP d'un monomère en solution, la nature de ce dernier va déterminer le choix des autres réactifs : métal de transition, ligand, amorceur. En effet, chaque monomère possède ses propres constantes d'activation et de propagation. Il est donc nécessaire d'ajuster la concentration en espèces radicalaires ainsi que la vitesse de désactivation pour maintenir un bon contrôle de la polymérisation. Ceci peut être ajusté en fonction de la nature des réactifs choisis et des proportions dans lesquelles ils sont introduits. Matyjaszewski et son équipe ont publié une revue qui recense les réactifs utilisés en fonction de la nature du monomère.⁶² Nous avons ainsi repris les conditions optimales de polymérisation de monomères de type méthacrylate mais en l'adaptant à la polymérisation en surface de nanoparticules.

L'amorceur utilisé a été présenté dans un paragraphe précédent. Le bromure de bromoisobutyrate a été choisi pour qu'une fois greffé sur la mercaptoaniline, la structure de l'amorceur soit la plus proche des amorceurs utilisés en solution, tel que le 2-bromoisobutyrate. Les esters bromés sont en effet les amorceurs les plus efficaces pour la polymérisation de méthacrylate.^{62,134} Ils permettent en effet un amorçage rapide par rapport à la propagation afin d'obtenir des polydispersités faibles et des structures bien définies pour cette famille de monomères.

Dans la littérature, les complexes de cuivre ont majoritairement été utilisés en raison du coût relativement faible et de la grande adaptabilité de ceux-ci. Ils ont en effet été utilisés pour polymériser un grand nombre de monomères⁶² (styrène, (méth)acrylate, ester, acrylamide et acrylonitrile). Nous l'avons utilisé sous forme de bromure de cuivre Cu(I)Br. Pour le solubiliser, il est nécessaire de ligander le cuivre en solution. Dans le cas des monomères de type méthacrylate, les ligands de type amines multidentates sont très efficaces.¹³⁵ Ils permettent d'obtenir des vitesses de polymérisation plus élevées qu'avec la bipyridine car le complexe formé avec le cuivre possède un potentiel de réduction plus faible. Nous avons donc choisi d'utiliser la pentaméthyl-diéthylène triamine (PMDETA) pour cette polymérisation. Les quantités de cuivre et de ligand sont généralement déterminées en fonction de la quantité d'amorceur. Comme nous allons le voir, les rapports ligand/cuivre/amorceur utilisés dans notre cas diffèrent des valeurs généralement utilisées pour des synthèses en conditions homogènes.

Au cours d'études antérieures,¹³⁶ des polymérisations modèles de MAnBu ont été réalisées en solution à partir d'amorceurs de structures identiques à ceux présents sur les nanoparticules amorçantes. Ces amorceurs ont été synthétisés par greffage de bromure de bromo-isobutyrate sur du 2,2'-disulfure de diamino-diphényle, obtenant ainsi un amorceur bi-fonctionnel (figure II.10).

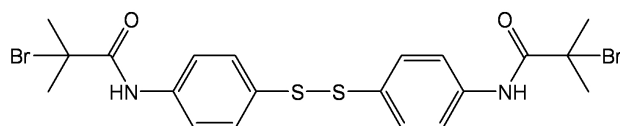


Figure II.10 – Amorceur utilisé lors des polymérisations modèles en solution.

Les polymérisations effectuées en solution avec cet amorceur ont montré que, dans le cas d'un rapport ligand/cuivre/amorceur généralement adopté (1/1/1), un fort défaut d'amorçage ainsi qu'un taux de conversion très faible étaient observés. Ceci est probablement due à une complexation parasite entre le cuivre et la fonction amide de l'amorceur. Pour réduire ce problème, un excès de ligand par rapport au cuivre a été utilisé (rapports ligand/cuivre/amorceur 3/2/1). Nous garderons donc ces proportions pour les polymérisations effectuées à partir des nanoparticules, tout en gardant à l'esprit que dans le cas d'une polymérisation en surface, l'efficacité d'amorçage peut être limitée pour des raisons d'encombrement stérique.

II.3.1.3 Pertinence de l'utilisation d'amorceurs sacrificiels

Une question récurrente liée à la polymérisation radicalaire contrôlée à la surface de nanoparticules concerne l'utilisation ou non d'amorceurs sacrificiels en solution, en plus des amorceurs greffés. La présence d'amorceur sacrificiel est intéressante car elle permet de garantir le contrôle de la polymérisation ainsi qu'une meilleure conversion quelles que soient les nanoparticules utilisées et les densités de greffage des fonctions amorçantes. Les chaînes libres synthétisées peuvent également être utilisées pour mesurer la taille des chaînes greffées à la surface. Avant de pouvoir utiliser ou caractériser les nanoparticules greffées de polymère, il est alors nécessaire d'effectuer une étape de purification supplémentaire souvent difficile, visant à séparer les chaînes greffées de celles qui sont libres. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, Patten⁶⁹ a montré que le facteur déterminant pour obtenir une polymérisation contrôlée à la surface de nanoparticules était la quantité d'amorceurs présents en solution, celle-ci étant liée à sa densité de greffage à la surface ainsi qu'à la taille des nanoparticules utilisées. D'après ce travail, une quantité d'amorceurs d'environ 10^{-3} mol/L

peut être suffisante pour conserver un bon contrôle de la polymérisation.

Compte tenu des caractérisations effectuées précédemment par ATG, nous avons calculé que des concentrations de 5 et 8 mg/mL en nanoparticules pouvaient théoriquement être suffisantes pour mener la polymérisation sans amorceur en solution. En effet, ces concentrations en nanoparticules correspondent respectivement à des concentrations en amorceurs de 2.2 et 3.6×10^{-3} mol/L. Ces valeurs sont supérieures aux concentrations utilisées par Patten⁶⁹ dans son travail. Les nanoparticules de platine utilisées sont de taille beaucoup plus réduite que les nanoparticules de silice utilisées par Patten (2 nm contre 75 et 300 nm), ce qui permet d'atteindre de telles concentrations en amorceurs. Cette taille assure également une distribution en amorceurs dans la solution plus homogène. La concentration moyenne calculée reste valable à l'échelle nanométrique et rapproche donc notre système d'une polymérisation classique en volume. En prenant en compte ces deux critères, nous avons donc décidé de réaliser la polymérisation sans amorceur sacrificiel en solution.

II.3.1.4 Masses molaires théoriques visées

Les nanoparticules ont donc été solubilisées à 5 et 8 mg/mL dans le DMAc pour réaliser les polymérisations en surface. En fonction de ces concentrations, nous avons ajouté une quantité de monomère tel que le pourcentage volumique en monomère soit compris entre 10% et 15%. Cette valeur reste faible comparée à une polymérisation classique et a limité les taux de conversion (de monomères en polymères) accessibles (plateau observé vers 30% de conversion). Ce pourcentage volumique correspond à un compromis entre la nécessité d'avoir une fraction volumique en monomère supérieure à 10% pour permettre une polymérisation contrôlée et la volonté d'obtenir des chaînes polymères de taille limitée.

Les fractions volumiques de monomère dans le milieu réactionnel (comprises entre 10 et 15%) correspondent à des masses molaires théoriques des chaînes polymères de 50 000 et de 80 000 g/mol pour le PMA_nBu et de 35 000 et de 55 000 g/mol pour le PMA_tBu, en fonction de la concentration initiale en nanoparticules amorçantes (5 et 8 mg/ml). Ces masses molaires théoriques correspondent à la masse molaire calculée pour une conversion totale et une efficacité d'amorçage de 100%. Dans le cas du PMA_tBu, des tests ont également été effectués en visant une masse molaire de 100 000 g/mol mais nous avons alors obtenu un gel non redissolvable. Pour obtenir de chaînes plus courtes, nous avons préféré stopper la polymérisation après des temps de réaction courts afin de conserver une fraction volumique en polymère supérieure à 10%.

Dans tous les cas, les réactions ont été stoppées en refroidissant rapidement le milieu réactionne, avant que le taux de conversion n'atteigne le plateau observé autour de 30%. Avant de caractériser les nanoparticules greffées de polymère ainsi formées, le cuivre a tout d'abord été extrait du milieu réactionnel par lavages successifs avec un mélange méthanol/chloroforme puis les nanoparticules ont été précipitées dans une solution composée à 90% de méthanol et 10% d'eau.

II.3.2 Caractérisation de la couronne polymère des nanoparticules

II.3.2.1 Suivi cinétique

Un suivi cinétique des différentes polymérisations a été mené en réalisant des prélèvements dans le milieu réactionnel à différents temps de réaction. Par mesure gravimétrique, nous avons déterminé la quantité de polymère formé après évaporation du solvant et du monomère, ce qui nous a permis de calculer le taux de conversion (p). Le tableau ci-dessous présente un récapitulatif des taux de conversion mesurés en fin de réaction, en fonction des conditions de polymérisation.

Echantillon	[NP] (mg/mL)	Mn théo. (g/mol)	tps de réaction (min)	taux de conversion
Pt-PMA _n Bu 1	8	50 000	50	18%
Pt-PMA _n Bu 2	5	80 000	90	14%
Pt-PMA _t Bu 7	8	35 000	21	19%
Pt-PMA _t Bu 8	8	35 000	20	18%
Pt-PMA _t Bu 14	8	35 000	20	18%
Pt-PMA _t Bu 15	8	35 000	8	6%
Pt-PMA _t Bu 16	8	35 000	20	18%
Pt-PMA _t Bu 22	5	55 000	60	19%
Pt-PMA _t Bu 24	5	55 000	90	21%

Table II.2 – Résumé des données des différentes polymérisations.

Les prélèvements effectués au cours de la réaction ont permis de suivre l'évolution du taux de conversion en fonction du temps de réaction pour les polymérisations de MAnBu (figure II.11a) et MAtBu (figure II.12a) sur les nanoparticules de platine. Nous voyons sur ces deux figures que le taux de conversion augmente jusqu'à des valeurs proches de 20% sans atteindre de plateau. Quel que soit le monomère, nous observons que la vitesse de polymérisation augmente logiquement avec la concentration en nanoparticules de platine, c'est à dire avec la concentration globale en amorceurs. Nous voyons également que pour une concentration donnée, la polymérisation est bien reproductible. Cette vitesse de polymérisation est

également plus grande pour le PMAtBu que pour le PMAAnBu. Ceci peut s'expliquer par un effet donneur plus important du groupement tert-butyle par rapport au n-butyle qui stabilise mieux le radical. L'équilibre est donc moins déplacé vers la formation des espèces dormantes, ce qui entraîne une polymérisation plus rapide.

A la vue de ces résultats, il va donc être possible, en fonction des conditions de polymérisation (monomères, concentration en nanoparticules amorçantes), d'ajuster précisément le taux de conversion du polymère en fonction de temps de polymérisation. Des nanoparticules greffées de chaînes de différentes longueurs ont ainsi été synthétisées.

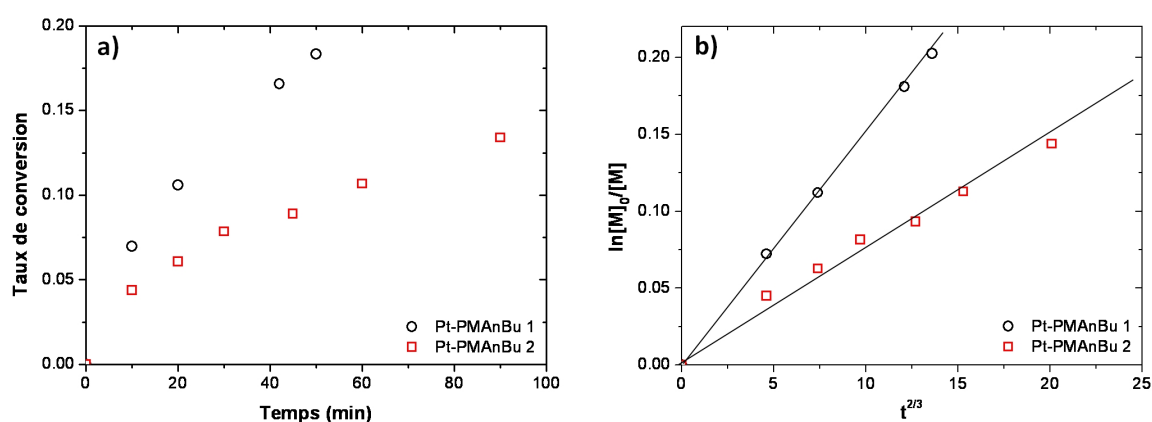


Figure II.11 – Données cinétiques de la polymérisation de PMAAnBu sur les nanoparticules de Pt : a) taux de conversion en fonction du temps - b) contrôle de la polymérisation : $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$.

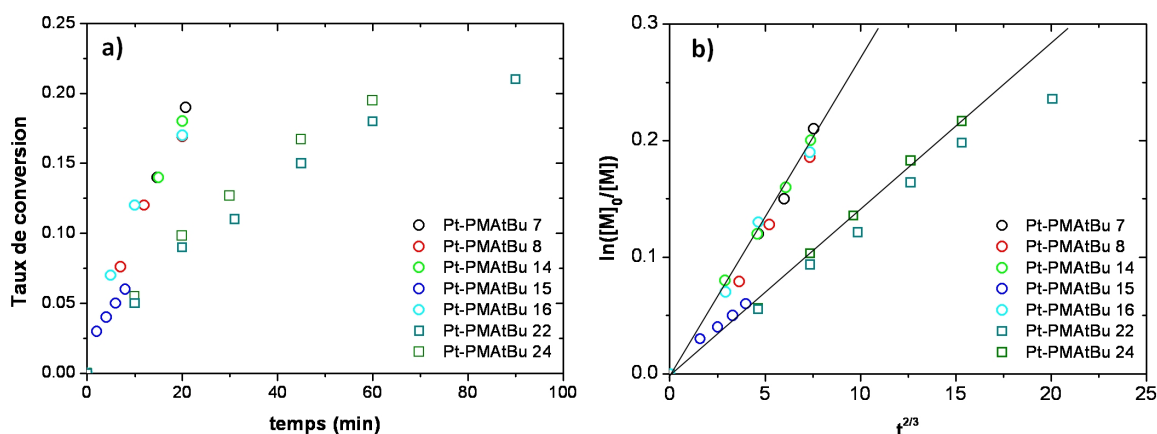


Figure II.12 – Données cinétiques de la polymérisation de PMAtBu sur les nanoparticules de Pt : a) taux de conversion en fonction du temps - b) contrôle de la polymérisation : $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$.

Fischer^{58,137} a montré qu'en tenant compte des équations régissant les cinétiques des réactions d'amorçage et de propagation qui ont lieu pendant une polymérisation par ATRP,

$[M]_0/[M]$ pouvait s'exprimer de la façon suivante :

$$\frac{[M]_0}{[M]} = \exp \left(-\frac{3}{2} k_p \left(\frac{k_a [I]_0 [C]_0}{3K_t} \right)^{1/3} t^{2/3} \right) \quad (\text{II.4})$$

Où $[M]_0$ et $[M]$ sont respectivement les concentrations en monomère à $t=0$ et à l'instant t , k_p , k_a et k_t les constantes de polymérisation, d'activation et de terminaison irréversible, $[I]_0$ et $[C]_0$ les concentrations initiales en amorceur et en cuivre(I). Si la polymérisation présente un caractère contrôlé, l'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$ sera donc linéaire car les constantes de réactions ainsi que les concentrations initiales sont toutes constantes au cours de la polymérisation. En plus de l'évolution du taux de conversion en fonction du temps, nous avons donc tracé $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$ (figures II.11b et II.12b). Quel que soit le polymère ou la concentration initiale en nanoparticules, l'évolution de ces courbes logarithmiques est linéaire. Une des conditions nécessaires pour montrer que la polymérisation est contrôlée est donc validée. Le contrôle de la masse molaire des chaînes et leur polydispersité doivent encore être vérifiés.

En fonction des polymérisations, nous avons ainsi pu mesurer des taux de conversion compris entre 10% et 20%. Cependant, il n'est *a priori* pas possible d'utiliser cette valeur pour déduire la longueur des chaînes polymérisées à la surface des nanoparticules. En effet, cette estimation supposerait que l'efficacité d'amorçage est de 100%. Nous avons vu précédemment que la densité d'amorceurs à la surface est de 2,4 molécules/nm². La densité de greffage obtenue sur des nanoparticules en utilisant l'ATRP combinée au « grafting from » est généralement inférieure à 1 chaîne/nm².^{78,71,72} Il est peu probable d'avoir une chaîne par amorceur dans notre cas. Ceci nous empêche donc d'utiliser le taux de conversion pour calculer la longueur des chaînes. Dans les paragraphes suivants, nous avons donc essayé de déterminer la longueur des chaînes greffées à la surface des nanoparticules.

II.3.2.2 Estimation de taille de la couronne polymère par ATG

Pour connaître la longueur des chaînes, la solution la plus directe consiste à dégreffer ces dernières pour pouvoir les analyser par chromatographie d'exclusion stérique. Nous reviendrons sur ce point un peu plus tard. Dans un premier temps, il est déjà possible d'estimer la masse molaire de la couronne polymère totale en utilisant l'ATG. La masse d'une nanoparticule ayant été précédemment estimée par diffraction de RX (52 000 g/mol), il est possible d'estimer la masse de la couronne polymère en connaissant le rapport massique platine/polymère.

Des analyses ATG ont donc été réalisées pour mesurer le $\%_w$ MO des différentes nanoparticules greffées de polymère. Afin d'obtenir ces informations, nous avons utilisé quasiment les mêmes conditions que celles utilisées lors de l'analyse des nanoparticules greffées d'amorceurs. Nous avons seulement effectué au départ une isotherme de 30 minutes à 130 °C pour retirer le maximum de solvant résiduel. La figure ci-dessous présente des exemples d'analyses thermogravimétriques effectuées sur deux échantillons (Pt-PMAtBu et Pt-PMAAnBu).

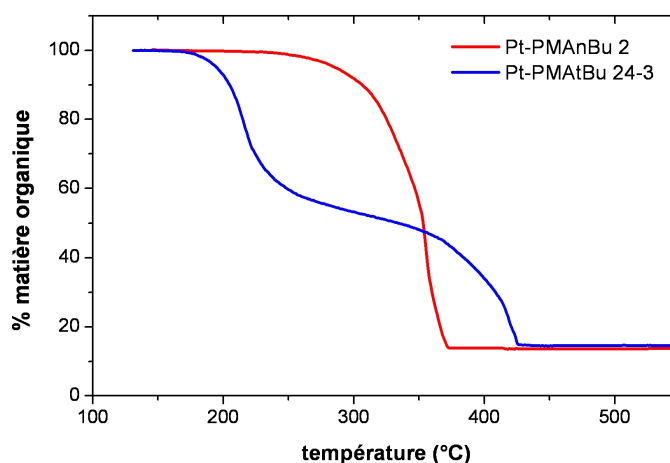


Figure II.13 – Analyses thermogravimétriques des nanoparticules greffées de polymère.

Par rapport aux nanoparticules surgreffées, le taux de matière organique passe de 20% à environ 85% dans le cas des échantillons polymérisés. Cette forte augmentation atteste de la présence de polymère sur les nanoparticules. En comparant l'évolution des échantillons de Pt-PMAtBu et Pt-PMAAnBu, une différence significative est visible. Dans le cas du Pt-PMAAnBu, la matière organique est détruite seulement à partir d'environ 300 °C alors que pour le Pt-PMAtBu, deux étapes sont visibles. La première perte de masse (à 200 °C) correspond vraisemblablement à la perte plus facile du groupe tert-butyle. Le squelette est ensuite détruit à partir d'environ 300 °C, comme les chaînes de PMAAnBu. Ces résultats d'ATG illustrent le fait que le groupe tert-butyle est un meilleur groupe partant que le n-butyle et par conséquent l'intérêt d'utiliser le méthacrylate de tert-butyle pour obtenir un polyacide.

En plus des nanoparticules obtenues en fin de polymérisation, des prélèvements importants ont également été effectués au cours de la polymérisation du Pt-PMAtBu 24 et du Pt-PMAAnBu 1 pour pouvoir observer l'évolution des masses molaires de la couronne polymère au cours d'une synthèse. Les résultats des différentes analyses ATG effectuées sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	% matière organique	$M_{couronne}$ (g/mol)
Pt-PMA _n Bu 1-1	81.0	200 000
Pt-PMA _n Bu 1-2	85.2	280 000
Pt-PMA _n Bu 1-3	86.3	305 000
Pt-PMA _n Bu 2	86.3	305 000
Pt-PMA _t Bu 7	75.1	150 000
Pt-PMA _t Bu 8	72.5	130 000
Pt-PMA _t Bu 14	77.1	165 000
Pt-PMA _t Bu 15	55.3	55 000
Pt-PMA _t Bu 16	72.7	130 000
Pt-PMA _t Bu 22	86.5	320 000
Pt-PMA _t Bu 24-1	75.2	150 000
Pt-PMA _t Bu 24-2	82.5	235 000
Pt-PMA _t Bu 24-3	85.4	295 000

Table II.3 – Résumé des données obtenues par ATG.

A partir des %_wMO mesurés, nous avons ensuite calculé la masse molaire de la couronne polymère. La première étape de ce calcul est de déterminer la quantité de polymère par gramme de platine (équation II.5).

$$m_{polymère}/g_{platine} = \frac{\%_w MO}{\%_w Pt} - \frac{\%_w amorceur}{\%_w Pt} \quad (\text{II.5})$$

A partir de cette valeur, et connaissant la masse molaire du cœur de platine (M_{NP}), il est alors possible d'estimer la masse de polymère par mole de platine, qui correspond également à la masse molaire de la couronne polymère (équation II.6).

$$M_{couronne\ polymère} = m_{polymère}/g_{platine} \times M_{NP} \quad (\text{II.6})$$

Cette estimation est cependant basée sur plusieurs hypothèses. Tout d'abord, nous supposons que les nanoparticules de platine étaient bien dispersées lors de la polymérisation, c'est à dire qu'il n'y a qu'un seul cœur de platine par objet. La seconde hypothèse correspond à l'absence totale de chaînes libres en solution. Ceci est normalement vérifié car nous n'avons pas utilisé d'amorceur sacrificiel et le MAtBu n'est pas sujet à un amorçage thermique à 60 °C. Enfin, la valeur obtenue repose sur la valeur de la masse molaire de la nanoparticule, estimée elle-même à partir des données de DRX. Ces résultats sont une première estimation de la masse molaire de la couronne polymère. Ils confirment, comme le suggérait le suivi cinétique, qu'il est possible de faire varier la proportion de polymère en jouant principalement sur deux facteurs, la masse molaire théorique et le temps de réaction.

Les prélèvements de volumes importants, effectués au cours des polymérisations du Pt-PMAtBu 24 et du Pt-PMAAnBu 2, nous ont également permis de suivre l'évolution la masse molaire de la couronne polymère par nanoparticule en fonction du taux de conversion. Nous pouvons observer sur la figure II.14 que la masse molaire de la couronne évolue linéairement avec le taux de conversion. En supposant que le nombre de chaînes par nanoparticule est constant au cours de la polymérisation (hypothèse vérifiée par DNPA dans la partie suivante), cela correspond à une évolution linéaire de la masse molaire des chaînes greffées en fonction du taux de conversion. Une deuxième condition concernant le contrôle de la polymérisation est donc satisfaite.

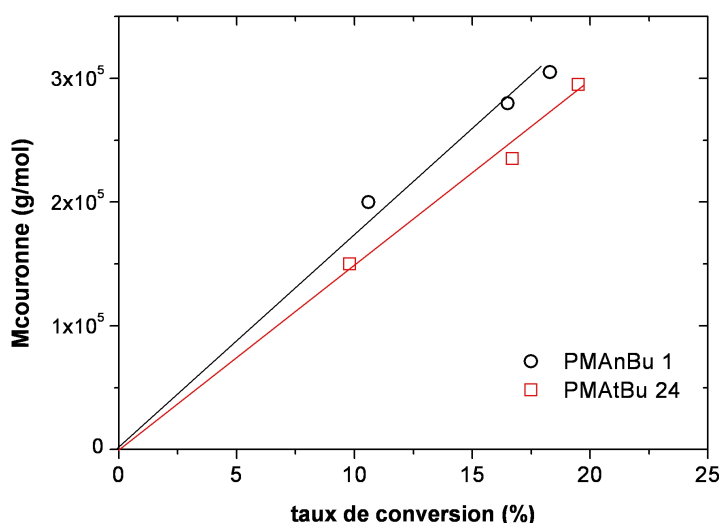


Figure II.14 – Evolution de la masse molaire de la couronne polymère en fonction du taux de conversion pour les échantillons Pt-PMAtBu 24 et Pt-PMAAnBu 1.

Les analyses thermogravimétriques ont donc permis d'estimer la masse molaire de la couronne polymère et de voir que son évolution est linéaire avec le taux de conversion. Cependant, cette technique ne permet pas de mesurer directement la masse molaire des chaînes greffées, ni de connaître leur indice de polydispersité afin d'être certain du contrôle de la polymérisation. Le seul moyen direct pour obtenir ces informations consiste à dégreffer ces dernières de la surface de la nanoparticule et de les caractériser par chromatographie d'exclusion stérique. C'est ce que nous avons tenté de réaliser.

II.3.3 Tentatives de dégreffage des chaînes

Nous avons envisagé plusieurs stratégies qui sont schématisées sur la figure II.15 afin de tenter de dégreffer les chaînes polymères de la surface des nanoparticules de platine :

1. Dissolution de la nanoparticule de platine dans un mélange acide nitrique/chlorhydrique.
2. Rupture de la liaison platine-soufre par réaction avec de l'iode.
3. Rupture de la liaison amide entre l'amorceur et la mercaptoaniline par réaction avec de l'acide toluène sulfonique.

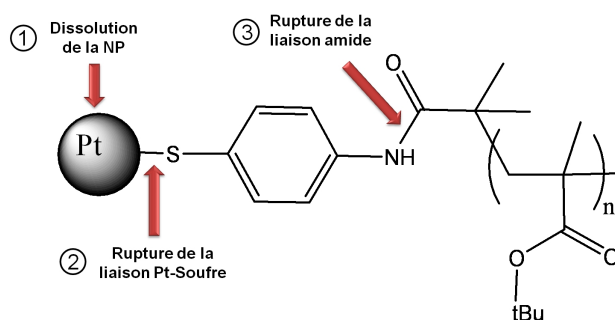


Figure II.15 – Stratégies de dégreffage des chaînes polymères de la nanoparticule de platine.

II.3.3.1 Dissolution de la nanoparticule de platine

La dissolution du platine, comme celle de l'or est possible *via* l'utilisation d'un mélange de solutions d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique concentrées, appelé eau régale. Les nanoparticules de platine fonctionnalisées ou surgreffées peuvent être dissoutes en utilisant des solutions acides (rapport molaire acide nitrique/acide chlorhydrique de 1 pour 4) dans le DMSO ou dans le DMAc. Les solutions de nanoparticules prennent alors une teinte jaune pâle due à la formation d'ions platine. Cependant, tandis que cette réaction est effectuée en quelques heures dans le cas des nanoparticules fonctionnalisées, elle prend plusieurs jours une fois qu'elles ont été surgreffées par des enrobages de faible poids moléculaire. Ceci est probablement dû à une accessibilité de la surface de platine plus réduite après le surgreffage.

Nous avons néanmoins tenté de dissoudre des nanoparticules de platine greffées de PMAtBu ainsi que de sa forme hydrolysée (poly(acide méthacrylique), Pt-PMAA). Pour cela, nous avons dispersé des échantillons de Pt-PMAtBu et de Pt-PMAA à 2.5 mg/ml dans une solution acide de DMAc ($[\text{HNO}_3]=0.2$ mol/L, $[\text{HCl}]=0.5$ mol/L). Les échantillons sont restés plusieurs semaines sous agitation sans qu'aucun changement de coloration de la solution ne soit visible. Des mesures d'ATG ont été effectuées sur le Pt-PMAtBu avant et après le traitement acide. Le pourcentage de matière organique passe de 79 à 75%. Ceci indique que la

proportion de platine ne varie quasiment pas, la légère baisse étant probablement due à une hydrolyse des groupes tert-butyle. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le surgreffage d'une molécule courte allonge déjà considérablement le temps nécessaire pour dissoudre les nanoparticules. Dans le cas de nanoparticules greffées de polymère, l'encombrement stérique est encore plus important. L'accessibilité de la surface de platine étant encore réduite après polymérisation, la dissolution des nanoparticules est en pratique inefficace.

II.3.3.2 Rupture de la liaison Pt-S

Les équipes de Ohno⁷¹ et Kim¹³⁸ ont montré qu'il était possible de dégreffer des chaînes polymères terminées par un thiol sur des nanoparticules d'or en utilisant de l'iode. En suivant leur protocole, nous avons dispersé un échantillon de Pt-PMA_tBu et un de Pt-PMA_nBu à 5 mg/mL dans une solution d'iode à 5 mol/L dans du dichlorométhane. Dans le cas des nanoparticules d'or, une précipitation a lieu après 12h d'agitation et seul le polymère reste en solution. Nous avons laissé les solutions sous agitation pendant une semaine sans observer le moindre changement. Cette difficulté à dégreffer les chaînes polymères de la surface vient de la liaison soufre-platine qui serait plus forte que la liaison soufre-or.

II.3.3.3 Rupture de la liaison amide

Khire et son équipe¹³⁹ ont utilisé de l'acide toluène-sulfonique agissant au niveau d'un groupement ester afin d'isoler les chaînes polymères greffées sur des particules de silice. Pour cela, les auteurs ont dispersé 0.5 g de nanoparticules greffées dans 100 mL de chloroforme contenant 50 mg d'acide toluène-sulfonique et ont chauffé à reflux pendant 18h. Pour éviter le problème d'hydrolyse du PMA_tBu, nous avons réalisé ce test sur sa forme hydrolysé (PMAA) dans du méthanol dans les mêmes concentrations que Khire et son équipe. La solution a été chauffée à reflux pendant une semaine sans observer de précipitation des nanoparticules. La plus grande stabilité d'une liaison amide comparée à une liaison ester peut expliquer que ce protocole n'ait pas permis de dégreffer les chaînes de la surface de platine, malgré la présence de l'acide et la température élevée.

Quel que soit le protocole utilisé, nous n'avons donc pas réussi à dégreffer les chaînes des nanoparticules de platine. Nous n'avons donc pu mesurer par ce moyen ni la longueur des chaînes polymères, ni leur polydispersité. Même si des analyses ATG nous ont permis d'estimer la masse molaire des couronnes polymères, des mesures complémentaires sont nécessaires pour caractériser la taille des objets synthétisés ainsi que la longueur et la densité de greffage des chaînes. Ces informations ont été obtenues par une étude de la couronne

polymère par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA), qui est présentée dans les paragraphes suivants.

II.4 Caractérisation par DNPA des nanoparticules greffées de polymère

Cette partie est consacrée à la caractérisation des nanoparticules greffées de polymères en solution. Ce système présente trois composantes : les chaînes polymères, la nanoparticule de platine et le solvant. Pour pouvoir l'étudier en séparant les contributions de chaque composante, nous avons utilisé la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA). Cette technique est particulièrement bien adaptée à ce type de problématique de part la gamme de taille caractérisable et les possibilités offertes par la variation de contraste. Le principe de cette technique est présenté dans un premier paragraphe, suivi des caractérisations effectuées sur les nanoparticules greffées d'amorceurs puis de polymères : poly(méthacrylate de n-butyle) (cf. II.4.3) et poly(méthacrylate de tert-butyle) (cf. II.4.4). Dans cette partie, nous étudierons en détail le signal dû aux chaînes polymère en justifiant l'utilisation du modèle d'étoile choisi et en allant jusqu'à des analyses quantitatives poussées (rayons de giration, nombre et masse molaire des chaînes greffées). Avant d'entrer dans le cœur de cette étude, nous nous sommes également attachés à comprendre et expliquer la présence d'une oscillation supplémentaire due *a priori* au cœur de platine et à sa couronne initiale d'amorceurs.

II.4.1 Introduction à la DNPA

Les techniques de diffusion du rayonnement (lumière, RX, neutrons) sont des outils très puissants pour caractériser la forme et l'organisation de polymères, ou plus généralement de nano-objets, dispersés dans un milieu homogène. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la DNPA pour étudier plus particulièrement les chaînes polymères greffées sur les nanoparticules de platine. Dans cette partie, nous décrirons brièvement la DNPA dans le domaine d'étude qui nous intéresse (structure macromoléculaire). Une description plus détaillée est présentée dans l'annexe B. Elle peut être complétée par des informations disponibles dans la littérature.^{140, 141}

Une expérience de DNPA consiste à envoyer sur l'échantillon à étudier, un faisceau de neutrons préalablement collimaté et monochromatique de longueur d'onde λ . On mesure alors sur un détecteur plan, la variation de l'intensité $I(q)$ en fonction du vecteur de diffusion q . Ce vecteur de diffusion est relié à l'angle de diffusion θ et à la longueur d'onde λ du

faisceau de neutrons par la relation suivante :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{II.7})$$

Dimensionnellement, q est homogène à l'inverse d'une longueur. Expérimentalement, la longueur d'onde des neutrons utilisés, est comprise entre 4 et 25 Å. Les distances échantillon-détecteur des spectromètres disponibles au LLB vont de 1 à 5 m, permettant de couvrir en fonction des configurations, une gamme de q allant de 10^{-3} à 0.5 \AA^{-1} . Dans ces conditions, il est possible d'étudier des objets dont les dimensions caractéristiques $R \sim 1/q$ vont approximativement de 10 à 1000 Å.

II.4.1.1 Intensité diffusée

Une fois le traitement du signal effectué et la contribution du solvant soustraite, la courbe de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde, $I(q)=f(q)$ est obtenue. Dans le cas d'objets centrosymétriques, cette intensité diffusée peut s'écrire sous la forme suivante :

$$I(q) = \Phi V_{\text{objet}} (\Delta\rho)^2 P(q) S(q) \quad (\text{II.8})$$

L'intensité diffusée est fonction de $\Delta\rho$, qui est la différence entre les densités de longueur de diffusion de l'objet diffusant et du solvant, également appelé facteur de contraste (explicité dans le paragraphe suivant), de Φ la fraction volumique en objets diffusants, de V_{objet} le volume de l'objet diffusant, du facteur de forme $P(q)$, décrivant la forme de l'objet diffusant, et enfin du facteur de structure $S(q)$, décrivant les corrélations spatiales entre les centres des masses des objets. Dans le cadre de notre étude, nous avons travaillé en solution suffisamment diluée pour pouvoir négliger les interactions entre les objets. Nous considérerons donc, dans la suite, le facteur de structure $S(q)$ comme égal à 1. En fonction des objets étudiés, nous avons utilisé plusieurs facteurs de forme. Ceux-ci seront présentés au fur et à mesure qu'ils sont utilisés. Néanmoins, pour des valeurs de q tel que $qR_g < 1$, le facteur de forme ne dépend plus de la forme de l'objet mais seulement de son rayon de giration (R_g). Dans ce domaine de q , appelé domaine de Guinier, le facteur de forme prend la forme suivante :

$$P(q) \approx \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (\text{II.9})$$

En traçant, $\ln(I)=f(q^2)$, il est ainsi possible, dans ce domaine, de déterminer le rayon de giration des objets étudiés à partir de la pente à l'origine de la courbe obtenue.

II.4.1.2 Notion de contraste

Pour obtenir une intensité diffusée suffisamment élevée, il est nécessaire d'avoir un bon contraste entre les objets diffusants et le solvant (ou la matrice). Le contraste est défini par la différence des densités de longueur de diffusion (ρ) de l'objet diffusant et du solvant. Le ρ d'un composant se calcule à partir des longueurs de diffusion cohérente b_i des atomes composant l'objet diffusant (équation II.10).

$$\rho = \frac{N_A d}{M} \sum_i a_i b_i \quad (\text{II.10})$$

Où d est la densité du composé en g.cm^{-3} , M sa masse molaire en g.mol^{-1} , N_A le nombre d'Avogadro et a_i le nombre d'atomes de longueur de diffusion b_i dans l'objet.

Les valeurs de b_i varient d'un atome à l'autre mais également d'un isotope à l'autre. Elles peuvent être aussi bien positives que négatives. Il est important de noter la différence des b_i entre un atome d'hydrogène ($b_H = -0.374 \times 10^{12}$ cm) et un atome de deutérium ($b_D = 0.667 \times 10^{12}$ cm). Cette différence se retrouve sur les densités de longueur de diffusion (ρ) des composés et solvants utilisés, selon qu'ils sont deutérés ou hydrogénés. Le tableau II.4 présente un résumé des valeurs de ρ pour les composés utilisés dans ce travail.

composé	ρ (10^{10} cm^{-2})
DMAc deutéré	6.60
DMAc hydrogéné	0.52
Toluène deutéré	5.60
D ₂ O	6.39
H ₂ O	-0.56
Platine	6.34
PMAAtBu hydrogéné	0.54
PMAAnBu hydrogéné	0.56
PMAA hydrogéné	1.30

Table II.4 – Densités de longueur de diffusion ρ des composés utilisés.

Dans le cas d'un système simple tel qu'un polymère hydrogéné en solution, pour obtenir un contraste maximum, il faudra travailler dans un solvant deutéré. A l'inverse, l'étude d'un composé deutéré sera faite dans un solvant hydrogéné.

II.4.1.3 Notion de variation de contraste

Dans le cas d'un système plus complexe tel que celui des nanoparticules greffées de polymère, nous ne sommes plus en présence d'un composant (en plus du solvant) mais de deux : les nanoparticules et les chaînes polymères. L'intensité diffusée va alors dépendre de

la fraction volumique de chacun ainsi que de leur contraste respectif avec le solvant. Il est alors difficile d'interpréter le spectre obtenu. Le grand intérêt de la DNPA est de pouvoir se ramener à l'étude d'un système plus simple à un composant, en annulant la contribution de l'un des deux composants. Ceci est réalisé en ajustant la densité de longueur de diffusion du solvant par mélange d'espèces hydrogénées et deutérées, à celle du composé dont on veut « éteindre » la contribution. Le contraste entre le composé et le solvant étant alors nul, l'étude revient donc à étudier un système simple à un composant en plus du solvant. Cette méthode, souvent utilisée en DNPA, est appelée « variation de contraste » (voir figure II.16). Dans le cas de nanoparticules de platine greffées de PMA_tBu, il est possible d'étudier sélectivement la couronne polymère en se plaçant dans un mélange 95,7% DMAc D, 4,3% DMAc H, alors que dans du DMAc H, seul le cœur de platine pourra diffuser.

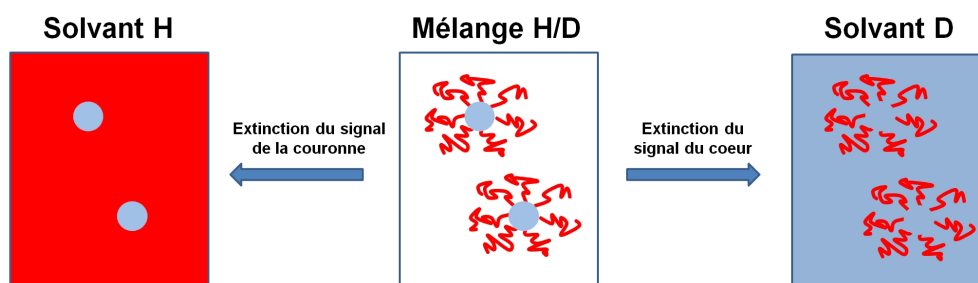


Figure II.16 – Illustration de la technique de variation de contraste dans le cas de nanoparticules de platine greffées de polymère.

II.4.2 Contribution de la nanoparticule greffée d'amorceurs

Les premières études par DNPA ont été effectuées sur les nanoparticules greffées de PMAnBu dans le mélange présenté précédemment (95,7% DMAc D, 4,3% DMAc H). Le signal typique d'une couronne polymère greffée sur des nanoparticules, est représenté figure II.17a, avec un plateau bien visible aux petites valeurs de q et une décroissance en $q^{-2.7}$. Ce signal typique sera ajusté par un modèle d'étoile, plutôt que par un modèle de couronne dense. Avant de revenir en détail sur cette étude (paragraphe II.4.3), nous nous sommes intéressés à une oscillation supplémentaire non liée à la couronne polymère, qui est visible sur le spectre dans le domaine des grands q ($q > 0.1 \text{ \AA}^{-1}$).

Pour mettre cette dernière en évidence, nous avons tracé le spectre dans une représentation dite de Kratky ((figure II.17b), en traçant $Iq^{-2.7} = f(q)$, $q^{-2.7}$ étant donc la pente mesurée aux valeurs de q intermédiaires sur le spectre du Pt-PMAnBu. L'oscillation, située vers 0.15 \AA^{-1} , est ici nettement visible. Cette valeur de q correspond à une longueur de corrélation de l'ordre de $R = 1/q = 7 \text{ \AA}$. Cette valeur entre dans la gamme de taille de la nanoparticule

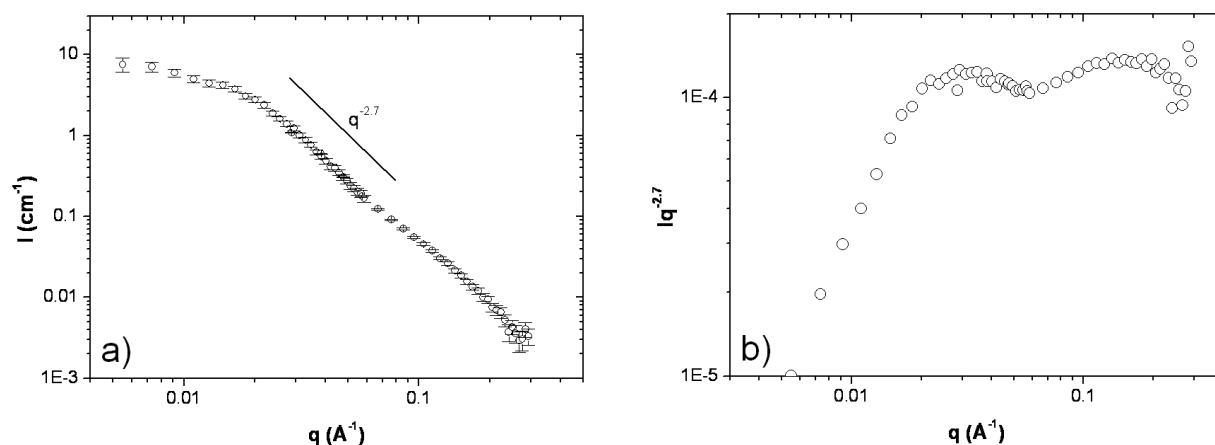


Figure II.17 – a) Spectre DNPA du Pt-PMAnBu 2 à 5 mg/mL dans un mélange 95,7% DMAc D / 4,3% DMAc H et b) sa représentation en $Iq^{-2.7}=f(q)$.

amorçante. Pour approfondir cette question, nous avons étudié par DNPA des nanoparticules greffées seulement d’amorceurs. Lors de cette étude, il était donc intéressant de caractériser distinctement le cœur métallique d’une part et la couronne organique d’amorceur d’autre part. Pour cela, nous avons donc travaillé à une concentration de 5 mg/mL en nanoparticules dans du DMAc hydrogéné pour observer le platine, et dans un mélange 95,3% deutéré / 4,7% hydrogéné, pour étudier la couronne d’amorceurs. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure II.18.

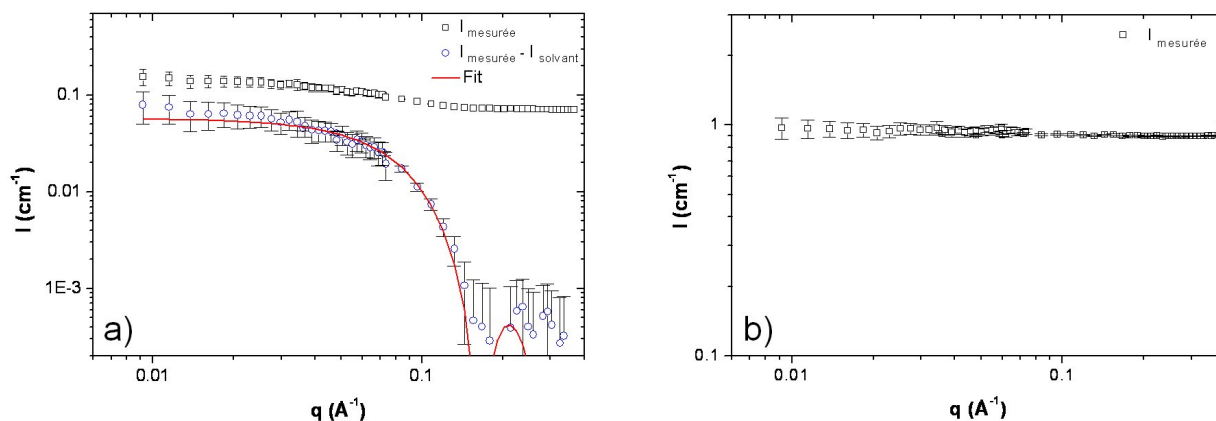


Figure II.18 – Spectres DNPA des nanoparticules greffées d’amorceurs à 5 mg/mL : a) dans un mélange 95,7% DMAc D / 4,3% DMAc H et b) dans du DMAc hydrogéné.

Dans le cas de l’étude des nanoparticules faite dans le DMAc H, le signal de la couronne est éteint et seul le cœur de platine contribue à l’intensité diffusée. Néanmoins, la figure II.18b) montre que le signal du cœur de platine n’est pas distinguable de celui du solvant, même si le contraste est maximum. Ceci vient du fait qu’une concentration en na-

noparticules de 5 mg/mL correspond à une fraction volumique en platine de moins de 0.02% (car la densité du platine est élevée, 21.4 g.cm^{-3}). Dans ces conditions, l'intensité diffusée par le platine est négligeable par rapport à la diffusion incohérente due au solvant hydrogéné.

L'analyse des nanoparticules effectuée en solvant deutéré (95,7% DMAc D, 4.3% DMAc H), permet d'obtenir un signal comportant une contribution distincte de celle du solvant (figure II.18a). Ce signal est vraisemblablement due à la couronne d'amorceurs greffés de manière dense à la surface de la nanoparticule de la couronne. Même si son intensité reste faible, ce signal peut-être ici distingué de celui du solvant pour deux raisons. Tout d'abord, en supposant, à partir de sa composition chimique, une couronne d'environ 1 nm d'épaisseur, la fraction volumique occupée par la couronne organique est environ 8 fois supérieure à celle du cœur métallique (2 nm de diamètre), ensuite, le signal incohérent dû au solvant est ici beaucoup plus faible que lors de l'étude du cœur métallique car le solvant utilisé est en grande partie deutéré.

Une fois l'intensité du solvant soustraite, nous avons comparé le signal obtenu à celui d'une sphère. Nous avons donc modélisé ce signal avec le facteur de forme d'une sphère de rayon R (équation II.11). Nous aurions pu réaliser cet ajustement avec un modèle cœur-couronne, mais le diamètre du cœur métallique est ici trop petit pour que l'ajustement soit précis.

$$P_{\text{sphère}}(q, R) = \left[3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2 \quad (\text{II.11})$$

Le rayon ainsi mesuré est de $2,6 \pm 0.2$ nm. Cette valeur correspond au rayon extérieur de la couronne d'amorceurs, c'est à dire à l'épaisseur de la couronne d'amorceurs ajoutée au rayon du cœur de platine (figure II.19). Cette valeur est cohérente avec la distance inter-particules déterminée sur la poudre de nanoparticules amorçantes par diffraction de RX (3.5 nm). Ceci confirme donc que les objets sont bien individualisées en solution.

Cependant, le rayon ainsi mesuré (2.6 nm) est supérieur à celui déterminé par la position de l'oscillation (0.7 nm) sur la figure II.18. Il est donc possible que l'oscillation visible à grand q sur le spectre des nanoparticules greffées de polymère ne corresponde pas au rayon extérieur de la couronne d'amorceur mais plutôt à son rayon intérieur (interface entre le platine et la couronne d'amorceurs). Le rayon extérieur de la couronne d'amorceurs n'est plus visible une fois le polymère est greffé. Il est possible en effet que cette interface soit alors plus diffuse, ce qui peut expliquer l'absence d'oscillation correspondant à cette distance caractéristique sur la figure II.18.

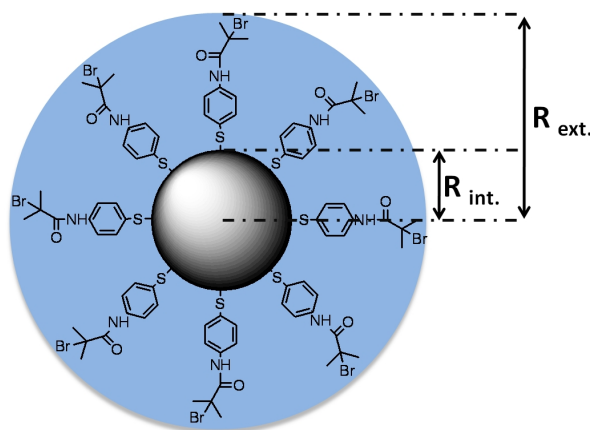


Figure II.19 – Schéma d'une nanoparticule de platine greffée d'amorceurs.

II.4.3 Etude de la couronne de poly(méthacrylate de n-butyle)

Les échantillons ici étudiés correspondent à deux synthèses différentes (Pt-PMANBu 1 et 2). Dans le cas de la synthèse n°1, des prélèvements ont été effectués au cours de la réaction (Pt-PMANBu 1-1, 1-2 et 1-3) pour permettre l'étude des échantillons ayant une couronne de masse croissante issus d'une même polymérisation. Les caractéristiques de ces échantillons sont récapitulées dans le tableau II.5.

Echantillon	% matière organique	M_{couronne} (ATG) (g/mol)
Pt-PMANBu 1-1	81.0	200 000
Pt-PMANBu 1-2	85.2	280 000
Pt-PMANBu 1-3	86.3	305 000
Pt-PMANBu 2	86.3	305 000

Table II.5 – Résumé des données des échantillons de Pt-PMANBu.

Les échantillons de Pt-PMANBu ont été étudiés dans le toluène deutéré car ce dernier solubilise plus rapidement les nanoparticules greffées, même si dans ce cas, le contraste est moins important. Les spectres sont présentés figure II.20b). Dans le cas du Pt-PMANBu 1, les spectres ont été décalés pour améliorer la lisibilité de la figure. Nous pouvons tout d'abord observer que, quel que soit l'échantillon, les spectres sont très similaires. Dans tous les cas, en plus de l'oscillation évoquée dans le paragraphe précédent, un plateau est visible aux petites valeurs de q . L'apparition de ce plateau montre que les objets ont une taille finie, et permet également d'évaluer cette taille : plus le plateau s'étend vers les grandes valeurs de q , plus l'objet diffusant est petit. Nous voyons que, dans le cas des prélèvements issus de la même synthèse Pt-PMANBu 1, le plateau est progressivement décalé vers les petites valeurs q pour des %_wMO croissants. Ceci montre que, comme attendu, la taille de l'objet augmente au fur

et à mesure de la polymérisation.

Sur le spectre correspondant au Pt-PMAnBu 2 (figure II.20a), nous retrouvons les mêmes caractéristiques que celles observées sur les autres échantillons. Nous notons tout de même que le plateau situé aux petites valeurs de q est plus marqué, traduisant une taille inférieure à celle des échantillons de Pt-PMAnBu 1 bien que la masse molaire de sa couronne soit supérieure ou égale à celles de ces derniers. Ceci vient du fait que l'étude a été effectuée dans du DMAc, qui est un moins bon solvant des chaînes que le toluène.

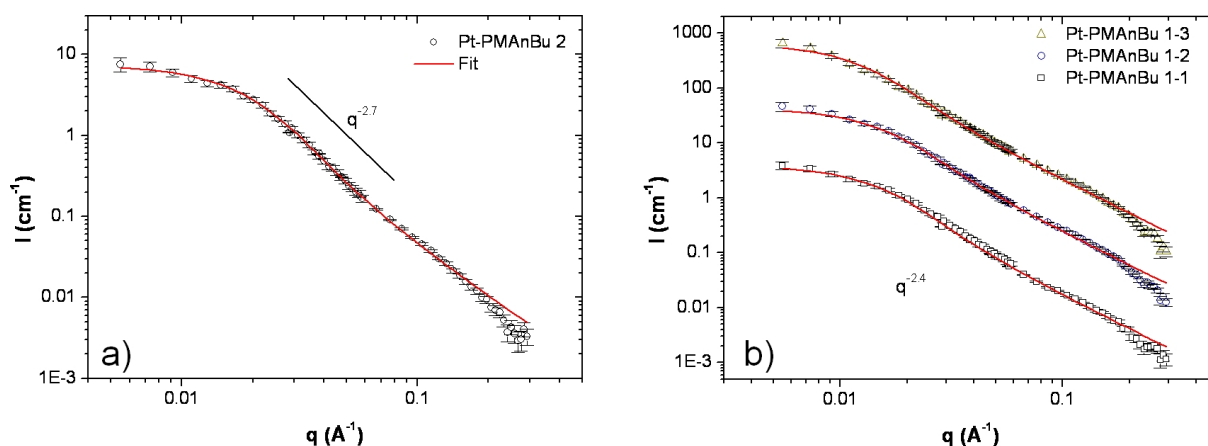


Figure II.20 – Spectres DNPA du a) Pt-PMAnBu 2 dans un mélange 95,7% DMAc D / 4,3% DMAc H b) Pt-PMAnBu 1-1), 1-2(intensité $\times 10$) et 1-3(intensité $\times 100$) dans du toluène deutéré.

Pour déterminer la taille de ces objets, nous avons utilisé tout d'abord l'approximation de Guinier (équation II.9). Comme nous l'avons dit précédemment (paragraphe II.4.1.1), il est possible de calculer directement le rayon de giration de l'objet en traçant $\ln(I)$ en fonction de q^2 dans le domaine des petites valeurs de q ($qR_g < 1$). Un exemple de cette mesure est présenté figure II.21. Les rayons de giration obtenus pour chaque échantillon sont résumés dans le tableau II.6. Les valeurs obtenues sont de l'ordre de 10 nm et confirment les influences du taux de conversion et du solvant sur la taille des objets.

Dans le domaine des q intermédiaires ($0.02 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.06 \text{ \AA}^{-1}$), la décroissance du spectre donne également des informations sur la forme des objets. L'exposant de q mesuré est caractéristique de la géométrie de l'objet étudié, la décroissance est en q^{-2} pour une chaîne gaussienne (chaîne polymère libre en solution), ou en q^{-4} , pour une interface nette (une sphère par exemple). Les pentes observées sur les deux échantillons sont proches (décroissance en $q^{-2.7}$ pour le Pt-PMAnBu 2 et $q^{-2.4}$ pour le Pt-PMAnBu 1). Cet exposant est intéressant car il ne correspond pas à une pente en q^{-4} , généralement observée sur des na-

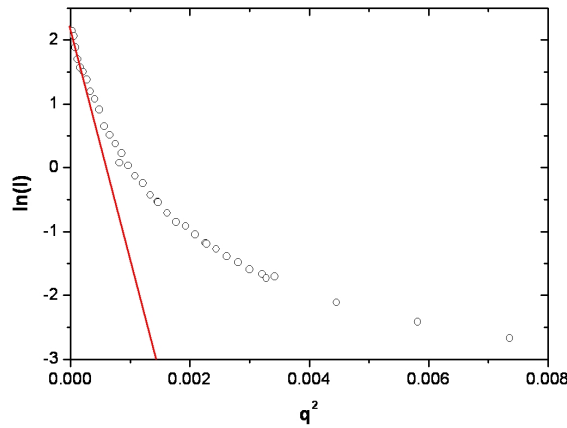


Figure II.21 – Représentation de Guinier de l'échantillon Pt-PMAAtBu 2.

Echantillon	% matière organique	$R_g^{Guinier}$ (nm)
Pt-PMAAnBu 2	86.3	9.1 ± 1.2
Pt-PMAAnBu 1-1	86.3	10.9 ± 1.1
Pt-PMAAnBu 1-2	81.0	11.8 ± 1.2
Pt-PMAAnBu 1-3	85.2	13.3 ± 1.4

Table II.6 – Résumé des rayons de giration des échantillons de Pt-PMAAnBu déterminés *via* l'approximation de Guinier.

noparticules de taille supérieure, greffées par une couronne compacte.^{142,129} L'exposant ne correspond pas non plus au q^{-2} d'une chaîne gaussienne. Nous pouvons donc en déduire que nous avons un système intermédiaire entre les deux géométries décrites précédemment. La décroissance n'étant pas en q^{-4} , nous pouvons déduire que la couronne polymère observée est peu compacte. Le rayon de la nanoparticule est en effet trop petit par rapport à la longueur des chaînes greffées pour pouvoir obtenir une telle couronne. La géométrie qui correspond le mieux à notre système serait donc plus proche d'une étoile. Le paragraphe suivant présente l'analyse des spectres de DNPA en utilisant un tel modèle.

II.4.3.1 Modélisation avec le facteur de forme d'une étoile

Pour modéliser le signal obtenu, nous avons donc utilisé le modèle d'étoile de Zimm-Stockmayer-Benoit¹⁴³ pour lequel le facteur de forme s'écrit (équation II.12).

$$P_{\text{étoile}}(q, R) = \frac{2}{x^2} \left[\frac{f}{2}(f-1)\exp\left(-2\frac{x}{f}\right) - f(f-2)\exp\left(\frac{x}{2}\right) + x + \frac{f}{2}(f-3) \right] \quad (\text{II.12})$$

$$\text{avec } x = (qR_g^L)^2 = (qR_g^B)^2 f = (qR_g^E)^2 \frac{f^2}{3f-2}$$

où R_g^E représente le rayon de giration d'une étoile de fonctionnalité f (f étant le nombre de branches), R_g^L celui d'une chaîne gaussienne de masse identique à celle de l'étoile et R_g^B celui d'une branche.

Ce modèle reste un modèle simplifié car il suppose qu'il n'y a aucune interaction entre les monomères appartenant à une même branche ou à deux branches distinctes. Cependant, l'ajustement des spectres nous a permis de déterminer le rayon de giration de l'étoile (R_g^E) ainsi que le nombre de branches de l'étoile (f), c'est à dire le nombre de chaînes polymères greffées par nanoparticule. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II.7.

Echantillon	$R_g^{Guinier}$ (nm)	R_g^{Etoile} (nm)	f	$d_{greffage}$ (chaîne/nm ²)
Pt-PMAnBu 2	9.1±1.2	9.5±1.3	12±1	0.95±0.5
Pt-PMAnBu 1-1	10.9±1.1	11.2±1.2	9±1	0.70±0.5
Pt-PMAnBu 1-2	11.8±1.2	11.8±1.1	8±1	0.65±0.5
Pt-PMAnBu 1-3	13.3±1.4	14.6±1.4	8±1	0.65±0.5

Table II.7 – Caractéristiques déterminées à partir des spectres de Pt-PMAnBu *via* l'approximation de Guinier et l'ajustement avec le modèle d'étoile.

Les rayons de giration obtenus sont d'environ 9 nm pour le Pt-PMAnBu 2 dans le DMAc et de 11 à 15 nm pour le Pt-PMAnBu 1. Ces rayons sont très proches des valeurs mesurées précédemment, en utilisant l'approximation de Guinier sur les petites valeurs de q . Ceci, en plus de valider partiellement le modèle en étoile, confirme les premières observations que nous avons faites, à savoir un rayon de giration augmentant avec le taux de conversion lors d'une même polymérisation, ainsi qu'un rayon de giration plus grand dans le toluène que dans le DMAc, pour des taux de matière organique équivalents. En outre, les nombres de chaînes par nanoparticule restent identiques à l'incertitude près, pour des échantillons issus d'une même synthèse (cas du Pt-PMAnBu 1), ce qui est un argument pour valider le modèle d'étoile choisi. Le nombre de chaînes obtenu pour le Pt-PMAnBu 2 est légèrement supérieur. Ceci n'est à priori pas un effet dû au solvant différent utilisé : un échantillon de Pt-PMAtBu présenté dans le paragraphe suivant présente le même nombre de branches dans les deux solvants.

Le nombre de chaînes déterminé par l'utilisation du modèle d'étoile permet de calculer la densité de greffage des chaînes à la surface des nanoparticules. Comme dans le cas des nanoparticules amorçantes, la surface des nanoparticules est calculée en prenant l'hypothèse d'une forme sphérique (12.5 nm²). Nous en avons déduit des densités de greffage des

chaînes polymères comprises entre 0.65 et 0.95 chaînes/nm². Ces valeurs sont élevées et correspondent à un greffage dense à la surface du platine. Elles sont néanmoins plus faibles que celles obtenues pour l'amorceur (2.4 molécules/nm², soit 30 molécules par nanoparticule), traduisant donc un défaut d'amorçage. L'efficacité d'amorçage (rapport entre le nombre de chaînes polymérisées et le nombre d'amorceurs initialement présents) a été ainsi déterminée. Cette efficacité est comprise entre 0.3 et 0.4 selon les échantillons. Compte tenu des densités de greffage élevées en chaînes polymères, il est possible que ce défaut d'amorçage soit dû à l'encombrement stérique qui limite le nombre de chaînes en croissance à la surface des nanoparticules.

II.4.3.2 Calcul de la masse molaire de polymère par nanoparticule

La DNPA permet également de calculer la masse molaire de l'objet diffusant à partir d'études en concentration. La détermination de la masse molaire de l'objet, M_w , se fait en mesurant l'intensité diffusée par les chaînes à différentes concentrations. Ces concentrations doivent être suffisamment faibles pour pouvoir supposer un facteur de structure égal à 1. A chaque concentration, l'intensité extrapolée à $q=0$ (I_0) est mesurée. A partir de ces valeurs, il est alors possible de déterminer la masse de l'objet diffusant en utilisant l'équation suivante :

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I_0}{c} \right) = K^2 M (1 - 2M \cdot A_2 \cdot c + \dots) \text{ avec } K^2 = \left(\frac{b_1 - b_0 \frac{\nu_1}{\nu_0}}{m_1} \right) \quad (\text{II.13})$$

où I_0 correspond à l'intensité diffusée extrapolée à $q=0$ d'une macromolécule homogène de masse M , de longueur de diffusion b , de volume spécifique ν , à la concentration c , dans un solvant de longueur de diffusion b_0 et de volume spécifique ν_0 . Si la macromolécule est composée de N diffuseurs élémentaires de longueur de diffusion b_1 , de masse m_1 de volume ν_1 , alors $M=Nm_1$, $\nu=\nu_1$ et $b=Nb_1$. A_2 correspond au second coefficient du viriel, qui traduit les interactions entre objets diffusants.

Pour obtenir la masse de l'objet diffusant, il faut donc tracer la masse apparente de l'objet ($M_{app} = \left(\frac{I_0}{K^2 c} \right)$) en fonction de la concentration. La masse M_w de l'objet correspondra donc à l'ordonnée à l'origine, alors que la pente nous donnera des informations sur les interactions entre les objets. Si la pente est positive, alors $A_2 < 0$, ce qui correspond à des interactions attractives entre les objets. Au contraire, si la pente est négative, alors $A_2 > 0$, ce qui correspond à un système répulsif. L'avantage de cette technique est qu'elle ne repose pas sur une estimation de la masse de la nanoparticule, contrairement au calcul effectué par ATG. Elle permet d'avoir accès directement à la masse de polymère par objet diffusant, indépendamment de sa géométrie.

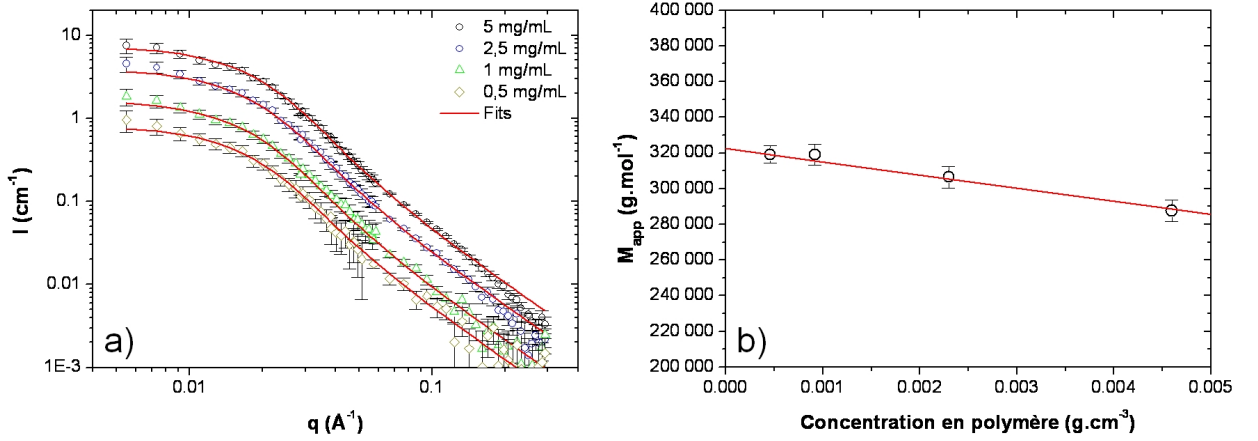


Figure II.22 – a) Etude en concentration du Pt-PMANBu 2, de 0.5 à 5 mg/mL dans un mélange 5,7% DMAc D / 4.3% DMAc H et b) détermination du M_w de la couronne polymère.

La figure II.22 présente l'étude en concentration effectuée avec l'échantillon Pt-PMANBu 2 pour calculer la masse de polymère par nanoparticule. A partir des différents spectres (figure II.22a), nous avons tracé $M_{app}=I_0/K^2c$ en fonction de la concentration. Nous voyons tout d'abord que la pente de la droite est négative ($A_2>0$) mais reste faible. Le DMAc est donc un bon solvant mais proche d'un solvant θ pour ce polymère. La valeur donnée par l'ordonnée à l'origine nous indique que la couronne polymère a une masse molaire d'environ $320\,000 \text{ gmol}^{-1}$. Cette valeur est très proche de l'estimation faite en utilisant l'ATG ($305\,000 \text{ gmol}^{-1}$). Le cœur des nanoparticules est donc bien composé d'une seule nanoparticule de platine dont la masse est proche de $52\,000 \text{ gmol}^{-1}$ puisque les masses estimées par ATG et DNPA correspondent.

Connaissant le nombre de chaînes par nanoparticule et la masse molaire de la couronne polymère, nous avons pu estimer la masse molaire des chaînes de PMANBu greffées à la surface : le calcul donne des chaînes d'environ $27\,000 \text{ gmol}^{-1}$. Connaissant l'efficacité d'amorçage ($\text{eff.}=0.4$), nous avons également pu estimer la masse des chaînes à partir du taux de conversion mesuré ($p=14\%$) et de la masse molaire théorique (correspondant à un taux de conversion et une efficacité d'amorçage de 100%) ($M_w^{théo}=80\,000 \text{ gmol}^{-1}$) visée lors de la polymérisation.

$$M_w = \frac{M_w^{théo}p}{eff.} \quad (\text{II.14})$$

Le calcul théorique donne une masse molaire M_w de $28\,000 \text{ gmol}^{-1}$, très proche de la valeur déduite de l'étude par DNPA ci-dessus. Ceci est un autre argument en faveur d'un bon contrôle de la polymérisation en surface des nanoparticules.

La DNPA nous a donc permis de déterminer le rayon de giration des nanoparticules greffées de polymère. Les résultats obtenus sont identiques qu'ils soient calculés à partir de l'approximation de Guinier ou de l'ajustement avec le modèle d'étoile. Avec ce dernier, nous avons également déterminé les densités de greffage des chaînes polymères à la surface des nanoparticules. Ces densités sont élevées et restent identiques au cours d'une même polymérisation, tout en variant légèrement d'une synthèse à l'autre. Ceci, ajouté à la constance des rayons de giration selon le mode de calcul, renforce la validité de l'utilisation du modèle d'étoile.

Les analyses effectuées par DNPA nous ont également permis de déterminer les masses molaires de polymère par nanoparticule, qui sont très proches des estimations faites auparavant par thermogravimétrie et confirment que les objets sont constitués d'une seule nanoparticule métallique au centre d'une couronne polymère

Enfin, connaissant la masse molaire de polymère et le nombre de chaînes par nanoparticule, nous avons pu déterminer la masse molaire des chaînes greffées à la surface. Les valeurs obtenues sont d'ailleurs très proches des masses molaires théoriques calculées en tenant compte de l'efficacité d'amorçage. Ceci est un argument supplémentaire en faveur du contrôle de l'ATRP à la surface des nanoparticules de platine.

Une étude similaire à celle menée sur les nanoparticules de platine greffées de poly(méthacrylate de n-butyle) (Pt-PMA_nBu) a été effectuée sur celles greffées de poly(méthacrylate de tert-butyle) (Pt-PMA_tBu). Les résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

II.4.4 Etude de la couronne de poly(méthacrylate de tert-butyle)

Les résultats présentés dans cette partie correspondent à des caractérisations effectuées sur les échantillons de Pt-PMA_tBu. Les objets obtenus étant théoriquement très proches de ceux étudiés dans les paragraphes précédents, dans un premier temps, nous avons comparé les données obtenues à celles issues de l'étude des échantillons de Pt-PMA_nBu. Dans le cas présent, les masses molaires théoriques visées sont plus faibles ($M_w^{théo}=35\ 000\ \text{gmol}^{-1}$ au lieu de $50\ 000\ \text{gmol}^{-1}$) pour les premiers échantillons analysés, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau II.8. Les %_wMO mesurés par ATG (de 55 à 75%) correspondent à des couronnes polymères de masses 2 à 6 fois plus faibles que celles obtenues pour le Pt-PMA_nBu 2. Cette différence doit se retrouver théoriquement sur les rayons mesurés, ainsi que sur les masses molaires calculées.

Le premier échantillon que nous avons étudié est le Pt-PMA_tBu 8 (figure II.23). Cet échantillon a tout d'abord été étudié à 5 mg/mL dans un mélange 95,7% DMAc D / 4,3% DMAc H, puis également dans du toluène D. Sur les spectres, nous observons que l'allure

Echantillon	% matière organique	M_{couronne} (g/mol)
Pt-PMAtBu 7	75.1	150 000
Pt-PMAtBu 15	55.3	55 000
Pt-PMAtBu 16	72.7	130 000

Table II.8 – Résumé des données des échantillons de Pt-PMAtBu 7, 15 et 16.

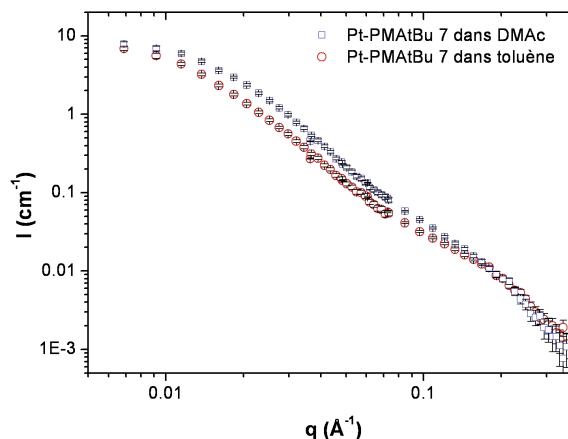


Figure II.23 – a) Spectre DNPA du Pt-PMAtBu 7, à 5mg/mL dans un mélange 95,7% DMAc D / 4,3% DMAc H et dans du toluène D.

générale est identique à celle observée avec les échantillons de Pt-PMAnBu (figure II.20). L'intensité du signal dans le DMAc est supérieure à celle obtenue dans le toluène car le contraste est plus important. Un début du plateau est clairement visible aux petites valeurs de q , celui-ci est plus marqué dans le DMAc que dans le toluène, car la solubilité du polymère est meilleure dans ce dernier. Les rayons de giration correspondants ont été mesurés en utilisant l'approximation de Guinier (tableau II.9).

Echantillon	Solvant	R_g^{Guinier} (nm)
Pt-PMAtBu 7	DMAc	10.1 ± 1.1
Pt-PMAtBu 7	Toluène	13.3 ± 1.3

Table II.9 – Résumé des rayons de giration obtenus par l'approximation de Guinier pour le Pt-PMAtBu 7.

Ils sont de 10 nm dans le DMAc et de 13 nm dans le toluène. Ces valeurs de R_g sont néanmoins surprenantes car elles sont supérieures ou égales à celles obtenues lors de l'analyse des échantillons de Pt-PMAnBu (tableau II.6) alors que la masse molaire de la couronne estimée par ATG est plus petite.

II.4.4.1 Mise en évidence d'un phénomène d'agrégation

Pour vérifier que les R_g mesurés correspondent bien à une seule nanoparticule greffée de polymère, nous avons effectué une étude en concentration de 2.5 à 10 mg/mL de nanoparticules dans le toluène, et mesuré ainsi la masse de la couronne polymère (figure II.24).

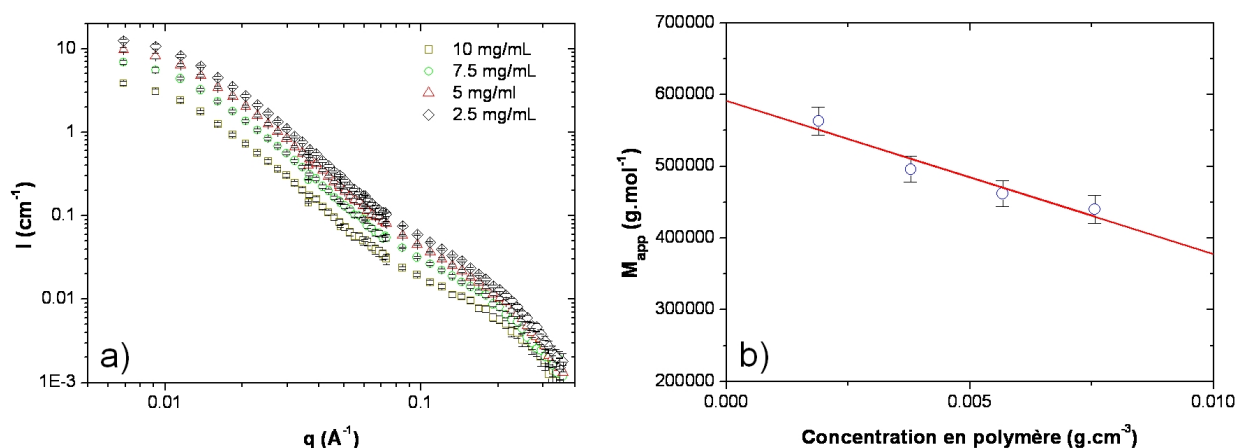


Figure II.24 – a) Etude en concentration du Pt-PMANBu 7, de 2.5 à 10 mg/mL dans du toluène deutéré et b) détermination du M_w de la couronne polymère.

La masse molaire obtenue par DNPA est de $590\,000\text{ g.mol}^{-1}$ et ne correspond pas à celle obtenue par ATG ($150\,000\text{ g.mol}^{-1}$). Il est donc possible que l'objet diffusant dans le cas de la mesure de DNPA ne soit pas une nanoparticule greffée de polymère unique, mais plutôt un agrégat de nanoparticules. Le rapport entre les masses de la couronne polymère mesurées par DNPA et ATG, donne une valeur moyenne d'environ 4 nanoparticules par agrégat. Ce phénomène d'agrégation est surprenant car il se produit dans le DMAc mais également dans le toluène qui est un bon solvant du PMANBu. Le problème ne vient donc pas *a priori* de la solubilité du polymère dans le solvant. Dans les analyses suivantes, nous travaillerons principalement dans le DMAc, qui permet d'avoir un meilleur contraste en DNPA.

II.4.4.2 Influence de la longueur des chaînes et de la redispersion des nanoparticules sur l'agrégation

Pour essayer d'obtenir des objets individuels, nous avons tout d'abord envisagé deux méthodes. La première est d'étudier des échantillons identiques mais de réaliser l'étude en concentration à partir d'une solution mère fortement diluée (Pt-PMANBu 16). Dans l'étude précédente, les différentes solutions ont été obtenues à partir de solutions mères à 10 mg/mL. Pour ces analyses, nous avons utilisé une solution mère moins concentrée, à 1 mg/mL en

nanoparticules, afin de tenter d'éviter la formation de ces agrégats, si ceux-ci se forment effectivement lors de la redispersion des nanoparticules dans le solvant.

La seconde méthode consiste à synthétiser des couronnes polymères très courtes. Pour cela, nous avons arrêté très rapidement la polymérisation (synthèse du Pt-PMAtBu 15). Le $\%_w$ MO donné par l'ATG est dans ce cas de seulement 55%, soit une couronne d'environ 55 000 $gmol^{-1}$. Cet échantillon a également été étudié à partir d'une solution mère peu concentrée. La figure II.25 présente les spectres de diffusion obtenus dans le DMAc pour ces 2 échantillons ainsi que la détermination de la masse molaire de leur couronne issue d'études en concentration.

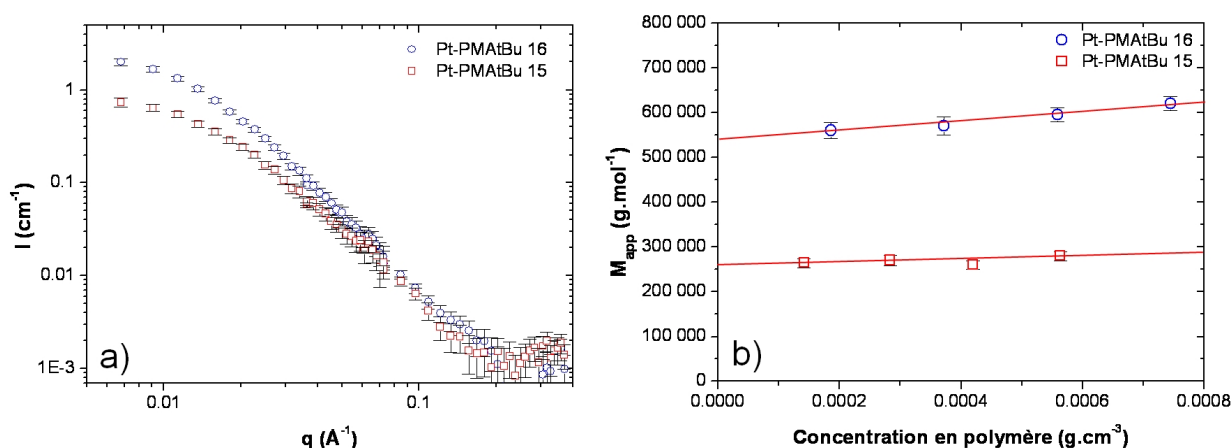


Figure II.25 – a) Spectres DNPA des Pt-PMAtBu 15 et 16, à 1mg/mL dans un mélange 95,7% DMAc D / 4.3% DMAc H et b) détermination des M_w correspondants.

Echantillon	Solvant	$R_g^{Guinier}$ (nm)	$M_w^{cour.}$ ATG ($gmol^{-1}$)	$M_w^{cour.}$ DNPA ($gmol^{-1}$)	NP par agrégat
Pt-PMAtBu 7	DMAc	10.1 ± 1.1	150 000	-	-
Pt-PMAtBu 7	Toluène	13.3 ± 1.3	150 000	590 000	4
Pt-PMAtBu 15	DMAc	10.9 ± 1.0	55 000	265 000	5
Pt-PMAtBu 16	DMAc	13.2 ± 1.4	130 000	540 000	4

Table II.10 – Résumé des données obtenues par DNPA sur les échantillons Pt-PMAtBu 7,15 et 16.

Un résumé des rayons de giration et des masses obtenues par DNPA est présenté dans le tableau II.10. Les rayons de giration mesurés sont respectivement de 11 et 13 nm pour les Pt-PMAtBu 15 et 16, valeurs toujours supérieures à celles mesurées sur les échantillons de Pt-PMAnBu alors que leur couronne polymère est plus petite que celle de ces derniers (valeurs calculées par ATG). Les masses molaires des objets diffusants, calculées pour ces

deux derniers échantillons suggèrent qu'il y a toujours un phénomène d'agrégation des objets. Quel que soit le solvant, la concentration de la solution mère utilisée ou la longueur des chaînes, l'objet diffusant en DNPA ne correspond pas, dans le cas du PMAAtBu, à une nanoparticule unique. Il est donc possible que ces agrégats se forment dès la polymérisation, soit par un pontage entre les nanoparticules, dû à un couplage entre chaînes en croissance, soit à cause d'une interpénétration très importante des couronnes polymères entre nanoparticules, qui rend l'agrégation entre les nanoparticules difficilement réversible. Il est intéressant de rappeler que des nanoparticules de platine greffées de PMAAnBu synthétisées exactement dans les mêmes conditions, donnent des objets parfaitement dispersés (cas du Pt-PMAAnbu 2).

II.4.4.3 Influence des conditions de polymérisation

Pour tenter d'obtenir des objets individuels, nous avons donc modifié les conditions de polymérisation en diminuant la concentration en nanoparticules amorçantes dans le milieu réactionnel. Nous sommes ainsi passé de 8 à 5 mg/mL. Pour garder des pourcentages volumiques en monomère légèrement supérieurs à 10%, nous avons visé une masse molaire théorique de 50 000 g/mol au lieu des 35 000 g/mol. Les échantillons Pt-PMAAtBu 22 et 24-1 et 24-3 sont issus de telles conditions de synthèse. Pt-PMAAtBu 24-1 et 24-3 correspondent à la même polymérisation durant laquelle deux prélèvements importants ont été effectués. Les caractéristiques de ces échantillons sont rappelées dans le tableau II.11.

Echantillon	% matière organique	M_{couronne} (g/mol)
Pt-PMAAtBu 22	86.5	320 000
Pt-PMAAtBu 24-1	75.2	150 000
Pt-PMAAtBu 24-3	85.4	295 000

Table II.11 – Résumé des données des échantillons de Pt-PMAAtBu 22, 24-1 et 24-3.

L'estimation des masses molaires des couronnes calculées à partir des $\%_w\text{MO}$ mesurés par ATG (autour de 85%) donne des valeurs proches de celles mesurées auparavant pour les échantillons de Pt-PMAAnBu. Nous nous attendons donc à avoir des R_g du même ordre de grandeur. Nous les avons analysé ensuite par DNPA dans la solution de DMAc habituelle, et également pour le Pt-PMAAtBu 22, dans du toluène deutéré. Les spectres obtenus pour ces échantillons ainsi que les mesures des masses effectuées, sont présentés figures II.26 et II.27.

Sur les spectres issus de l'analyse du Pt-PMAAtBu 22 (figure II.26a)) dans le toluène et le DMAc, l'intensité diffusée a été normalisée par la fraction volumique en polymère (Φ) car

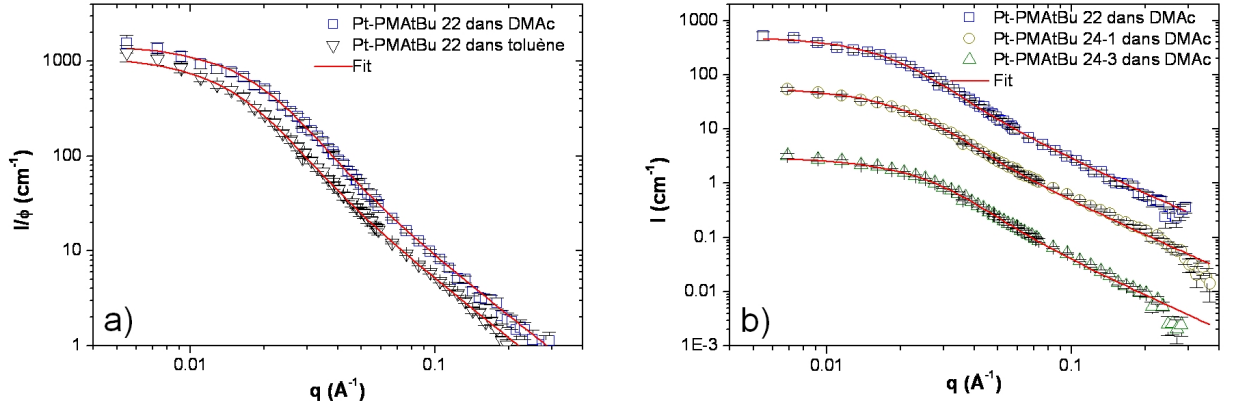


Figure II.26 – a) Spectres DNPA normalisés par la fraction volumique en polymère ϕ du Pt-PMAtBu 22 à 5 mg/mL dans un mélange 95,7% DMAc D / 4.3% DMAc H et dans du toluène deutéré b) Spectre DNPA du Pt PMAtBu 22 ($\times 100$), 24-1 et 24-3 ($\times 10$) dans un mélange 95,7% DMAc D / 4.3% DMAc H.

les mesures n'ont pas été effectuées exactement à la même concentration. Ceci permet de les comparer sans tenir compte de cette différence. Comme précédemment, l'intensité diffusée est plus élevée dans le DMAc car le contraste entre le solvant et le polymère est plus grand. Les deux spectres présentent un plateau. Nous avons ainsi pu calculer les R_g correspondants, en utilisant l'approximation de Guinier. Les valeurs obtenues sont de 10 nm dans le DMAc et de 13 nm dans le toluène. Dans le cas de la figure II.26b, les spectres ont été décalés afin d'améliorer la visibilité. Comme attendu, le plateau se décale légèrement vers les petites valeurs de q pour des $\%_w\text{MO}$ croissants, caractérisant une augmentation du rayon des objets. Les rayons de giration mesurés (résumés dans le tableau II.12) sont respectivement de 7 et 9 nm pour le Pt-PMAtBu 24-1 et 24-3. Ces valeurs sont très proches de celles obtenues pour les échantillons de Pt-PMANBu étudiés précédemment, avec des couronnes de masses similaires.

Echantillon	Solvant	R_g^{Guinier} (nm)
Pt-PMAtBu 22	DMAc	10.2 ± 1.2
Pt-PMAtBu 22	Toluène	12.8 ± 1.3
Pt-PMAtBu 24-1	DMAc	7.1 ± 0.8
Pt-PMAtBu 24-3	DMAc	9.3 ± 1.0

Table II.12 – Résumé des données obtenues par DNPA sur les échantillons Pt-PMAtBu 22,24-1 et 24-3.

Comme précédemment, nous avons réalisé une étude en concentration pour nous assurer que l'objet diffusant correspond bien à une unique nanoparticule greffée de polymère.

La figure II.27a montre le résultat de cette étude sur le Pt-PMAtBu 22 effectuée dans le toluène et dans le DMAc. On peut noter tout d'abord que les pentes sont de signe opposé. Ceci confirme que le toluène est un meilleur solvant que le DMAc, et que ce dernier est même,

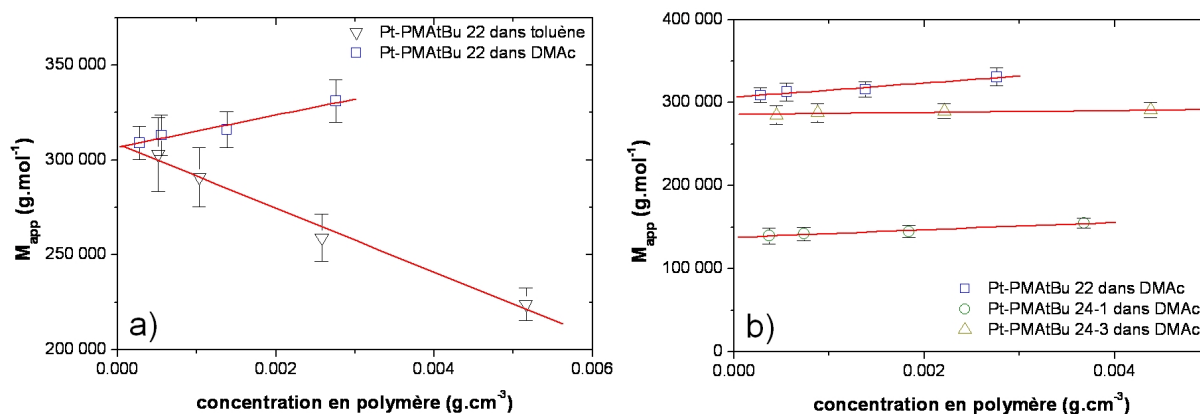


Figure II.27 – a) Détermination du M_w de la couronne polymère a) du Pt-PMAtBu 22 dans un mélange 95,7% DMAc D / 4,3% DMAc H et dans du toluène deutéré et b) des Pt-PMAtbu 22, 24-1 et 24-3 dans un mélange 95,7% DMAc D / 4,3% DMAc H.

pour le PMAtBu, un mauvais solvant, même s'il reste proche d'un solvant θ . Toutefois, ceci n'impacte pas la dispersion des nanoparticules car les masses mesurées à partir de l'ordonnée à l'origine sont les mêmes pour les 2 solvants. La masse molaire de la couronne est de 310 000 gmol^{-1} . Sur la figure II.27b, on note que la masse molaire des couronnes augmente avec le $\%_w\text{MO}$ mesuré par ATG. Les valeurs mesurées sont respectivement de 140 000 gmol^{-1} et de 290 000 gmol^{-1} pour le PMAtBu 24-1 et 24-3 (tableau II.13). Dans ces conditions de polymérisation, toutes les valeurs de masses molaires de la couronne correspondent à l'estimation faite par ATG, quel que soit le solvant. Les objets diffusants correspondent bien cette fois à des nanoparticules uniques.

Echantillon	Solvant	R_g^{Guinier} (nm)	$M_w^{\text{cour.}}$ ATG (gmol^{-1})	$M_w^{\text{cour.}}$ DNPA (gmol^{-1})	NP par agrégat
Pt-PMAtBu 22	DMAc	10.2 ± 1.2	320 000	310 000	1
Pt-PMAtBu 22	Toluène	12.8 ± 1.3	320 000	310 000	1
Pt-PMAtBu 24-1	DMAc	7.1 ± 0.8	150 000	140 000	1
Pt-PMAtBu 24-3	DMAC	9.3 ± 1.0	290 000	290 000	1

Table II.13 – Résumé des données obtenues par DNPA sur les échantillons Pt-PMAtBu 22,24-1 et 24-3.

En modifiant les conditions de synthèse (dilution de la concentration en nanoparticules amorçantes), nous avons donc réussi à obtenir une dispersion parfaite des nanoparticules greffées de polyméthacrylate de tert-butyle.

Il est donc possible d'ajuster les spectres obtenus avec le modèle d'étoile précédemment utilisé pour obtenir plus d'informations sur le système. Les ajustements effectués sont visibles sur la figure II.26. Les informations obtenues sont regroupées dans le tableau II.14.

Les résultats obtenus ici pour les nanoparticules greffées de poly(méthacrylate de tert-

Echantillon	Solvant (nm)	$R_g^{Guinier}$ (nm)	R_g^{Etoile} (nm)	f	$d_{greffage}$ (chaîne/nm ²)	M_w chaîne (gmol ⁻¹)
Pt-PMAtBu 22	DMAc	10.2±1.2	10.4 ±1.4	10±1	0.8 ±0.5	31 000
Pt-PMAtBu 22	toluène	12.8±1.3	12.5 ±1.5	11±1	0.9 ±0.5	28 000
Pt-PMAtBu 24-1	DMAc	7.1±0.8	7.4 ±0.8	10±1	0.8 ±0.5	29 000
Pt-PMAtBu 24-3	DMAc	9.3±1.0	9.1 ±1.1	10±1	0.8 ±0.5	14 000

Table II.14 – Informations obtenues avec le modèle d'étoile.

butyle) sont aussi cohérents que ceux obtenus lors de l'étude des nanoparticules greffées de poly(méthacrylate de n-butyle). Nous observons tout d'abord que les rayons obtenus en utilisant le modèle d'étoile sont quasiment identiques à ceux obtenus en utilisant l'approximation de Guinier. Le nombre de chaînes est identique dans les deux solvants à l'incertitude près, ce qui suggère à nouveau la validité du modèle. On note également que la synthèse est bien reproductible : les densités de greffage sont identiques au cours d'une même polymérisation (Pt-PMAtBu 24-1 et 24-3), mais également entre les deux synthèses. Connaissant les masses molaires des couronnes ainsi que le nombre de chaînes par nanoparticule, nous pouvons à nouveau calculer les masses molaires des chaînes, qui sont de 14 000 gmol⁻¹ pour le Pt-PMAtBu 24-1 et environ 30 000 gmol⁻¹ pour les Pt-PMAtBu 24-3 et 22. Ces valeurs sont également en accord avec les masses molaires théoriques calculées à partir des taux de conversion et de l'efficacité d'amorçage. Pour le Pt-PMAtBu 22 par exemple, un taux de conversion de 21% avec une masse molaire théorique (M_n^{theo}) de 50 000 gmol⁻¹ et une efficacité d'amorçage calculée à 0.33, donne une masse molaire théorique des chaînes de $M_n=31\,500$ gmol⁻¹, très proche de la valeur obtenue par DNPA.

II.5 Conclusion

Nous avons développé un protocole combinant « grafting from » et ATRP qui permet d'obtenir des nanoparticules de platine greffées d'une couronne polymère de caractéristiques contrôlées. Nous avons montré que nous pouvions obtenir de manière reproductible des nanoparticules de platine de 2 nm de diamètre, greffées d'amorceurs de polymérisation avec une densité de greffage de l'ordre de 2.4 molécules/nm². Cette densité de greffage combinée à la taille extrêmement réduite des nanoparticules, nous a permis de mener la polymérisation en considérant ces dernières comme des « macro-amorceurs » et en évitant ainsi l'utilisation d'amorceurs sacrificiels en solution.

Les suivis cinétiques, effectués lors des polymérisations, ont montré que ces dernières étaient également reproductibles et qu'il était possible de contrôler la quantité de polymère

greffé en jouant sur le temps de réaction et la masse molaire théorique visée. Des analyses ATG ont permis d'estimer les masses molaires des couronnes polymères obtenues et de confirmer que ces dernières augmentaient linéairement avec les taux de conversion mesurés lors de la polymérisation. La linéarité de la courbe logarithmique ainsi que l'évolution linéaire de la masse avec la conversion suggèrent aussi que la polymérisation est contrôlée. Il reste néanmoins une incertitude sur le contrôle effectif de la polymérisation car nous n'avons pas pu dégripper les chaînes polymères et ainsi mesurer directement leur longueur et leur polydispersité. La caractérisation par DNPA effectuée par la suite a permis de résoudre en partie ce problème en évaluant les masses molaires des chaînes greffées.

L'étude DNPA effectuée nous a conduit dans un premier temps de définir la géométrie de nos objets. Plutôt que des couronnes denses observées sur des nanoparticules de taille supérieure, notre système ressemble plus à une étoile composée d'un cœur de petite taille, entouré de longues chaînes polymères. L'étude faite sur les échantillons de nanoparticules greffées de PMA_nBu nous a permis de déterminer le modèle simple le plus approprié à nos objets, de valider les estimations sur la masse molaire des couronnes polymères calculées par ATG et de déterminer la masse des chaînes polymères greffées, en accord avec les valeurs théoriques, calculées en tenant compte de l'efficacité d'amorçage. Cependant, lorsque nous avons voulu appliquer les mêmes traitements aux spectres des nanoparticules greffées de PMA_tBu, les résultats obtenus ont révélé un phénomène d'agrégation. Ces agrégats se forment *a priori* dès la synthèse et comportent environ 4 nanoparticules. Après de nombreuses études, il apparaît que le facteur déterminant pour éviter la formation de ces agrégats, est la concentration initiale en nanoparticules amorçantes lors de la polymérisation en surface. En abaissant celle-ci, nous avons obtenu des nanoparticules parfaitement dispersées dont les caractéristiques sont très proches de celles obtenues sur les échantillons de Pt-PMA_nBu : des objets d'environ 10 nm de rayon avec des densités de greffage élevées comprises entre 0.70 et 0.95 chaîne/nm² et des masses molaires de chaînes de 14 000 à 30 000 gmol⁻¹. Ces dernières sont en accord avec les masses molaires théoriques calculées à partir des taux de conversion et des efficacités d'amorçage correspondantes.

L'étape suivante dans ce travail consiste à modifier les caractéristiques chimiques de la couronne polymère de type tert-butyle pour y introduire des fonctions acides carboxyliques. Celles-ci vont nous permettre de réaliser ensuite les briques comportant du platine, du polymère, et une troisième composante correspondant à un objet biologique : la glucose oxydase.

CHAPITRE III

Chapitre III

Formation de structures hybrides platine-polymère-glucose oxydase

Contents

III.1 Introduction	99
III.2 Elaboration de structures hybrides Pt-PMAA-GOx en solution	99
III.2.1 Hydrolyse des chaînes greffées de PMAAtBu	100
III.2.1.1 Réaction d'hydrolyse des chaînes greffées de PMAAtBu	100
III.2.1.2 Caractérisation de l'hydrolyse du PMAAtBu	101
III.2.2 Elaboration des structures hybrides Pt-PMAA-GOx en solution	104
III.2.2.1 Réaction de greffage de la GOx via l'utilisation du couple NHS/EDC	104
III.2.2.2 Etude du greffage de la GOx sur le Pt-PMAA par DNPA	107
III.2.2.3 Détermination de la quantité d'enzymes greffées et mesure d'activité	110
III.3 Elaboration de structures Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince	116
III.3.1 Films de Langmuir-Blodgett de nanoparticules greffées de polymère	117
III.3.1.1 Principe et caractéristiques de la technique de Langmuir-Blodgett(LB)	117
III.3.1.2 Etude des isothermes de compression des films de Langmuir des nanoparticules greffées de polymère	120
III.3.2 Structures en film ultra-mince à partir de films LB de Pt-PMAA	125
III.3.2.1 Elaboration des films mixtes Pt-PMAA/acide béhénique	125
III.3.2.2 Caractérisation de l'épaisseur des films transférés par profilométrie et réflectivité de neutrons	129
III.3.3 Brosses polymères à base de films LB de nanoparticules amorçantes	133
III.3.3.1 Elaboration des films mixtes de nanoparticules amorçantes	133
III.3.3.2 Elaboration de la brosse de PMAAtBu à la surface du film LB de nanoparticules amorçantes	135
III.3.3.3 Caractérisation de l'épaisseur des structures brosses par AFM et réflectivité de neutrons	137

III.3.3.4	Hydrolyse des brosses de PMA _t Bu	141
III.3.4	Structures hybrides Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince	143
III.3.4.1	Conditions de greffage de la GOx	143
III.3.4.2	Mesure de l'activité enzymatique des systèmes Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince	143
III.3.4.3	Mesure de l'activité enzymatique initiale des lots de GOx utilisés	144
III.3.4.4	Mesure de l'activité enzymatique des structures en film ultra-mince	144
III.4	Conclusion	146

III.1 Introduction

Ce troisième chapitre aborde la réalisation et la caractérisation de nanostructures hybrides nanoparticule-polymère-biomolécule. La biomolécule modèle que nous avons choisie est une enzyme, la glucose oxydase (GOx). Cette protéine, dont la masse molaire est de 160 000 g.mol⁻¹, possède des fonctions amines que nous allons exploiter pour assurer son greffage covalent sur la couronne polymère des nanoparticules. Les oxydases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation d'un substrat donné (le glucose dans le cas de la GOx). La régénération du site catalytique de ces enzymes est généralement assurée par de l'oxygène présent dans le milieu, avec formation parallèle de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Nous reviendrons plus en détail sur ces aspects dans le quatrième chapitre de ce manuscrit. Ce dernier abordera les mesures électrochimiques menées sur les nanostructures hybrides formées qui exploitent en synergie l'activité enzymatique de la GOx et les propriétés électrocatalytiques du cœur des nanoparticules de platine greffées de polymère.

La réalisation des nanostructures hybrides nanoparticule-polymère-GOx présentée dans ce chapitre, est menée selon deux approches différentes. La première vise à former et caractériser une nanostructure hybride nanoparticules-polymère-GOx en solution. Les nanoparticules utilisées dans ce cas (notées Pt-PMAA) sont greffées de poly(acide méthacrylique) (PMAA) et sont obtenues après hydrolyse du PMAAtBu greffé sur les nanoparticules, dont nous avons décrit la synthèse et la caractérisation au chapitre II. Le greffage covalent de l'enzyme sur les nanoparticules Pt-PMAA sera mené en solution afin d'obtenir le système hybride visé. La seconde approche consiste à former des nanostructures nanoparticules-polymère-GOx à partir de films ultra-minces à l'état solide, élaborés en utilisant la technique de Langmuir-Blodgett (LB). Sur ces films, la GOx sera introduite *a posteriori* toujours par greffage covalent sur les chaînes polymères des nanoparticules. Cette seconde approche comporte elle-même deux voies différentes dont l'intérêt est de fournir des nanostructures de configurations légèrement différentes. La première voie utilise des films LB de nanoparticules Pt-PMAA, tandis que la seconde correspond à la formation de brosses polymères, nécessitant la formation préalable de films LB de nanoparticules de platine amorçantes, décrites dans le chapitre II.

III.2 Elaboration de structures hybrides Pt-PMAA-GOx en solution

La réalisation de structures hybrides Pt-PMAA-GOx en solution nécessite une étape préalable d'hydrolyse du PMAAtBu greffé sur les nanoparticules. Nous avons utilisé l'analyse

thermogravimétrique (ATG) ainsi que la spectroscopie infra-rouge et la RMN ^1H pour caractériser cette modification chimique de l'enrobage polymère des nanoparticules Pt-PMAtBu. Les nanoparticules Pt-PMAA ainsi obtenues, sont solubles en milieu aqueux et leurs fonctions acides carboxyliques vont permettre le greffage covalent de l'enzyme. Outre la détermination des conditions adaptées au greffage de la GOx sur nos objets, nous présenterons également la caractérisation du greffage de l'enzyme par diffusion de neutrons, ainsi qu'une évaluation de la quantité d'enzymes effectivement greffées par spectroscopie UV-visible. Enfin, nous avons complété cette étude par la détermination de l'activité des enzymes greffées sur les nanoparticules. Cette mesure était indispensable pour déterminer si le greffage de l'enzyme préservait une activité significative de celle-ci, en particulier dans la perspective des mesures électrochimiques qui seront présentées au chapitre IV.

III.2.1 Hydrolyse des chaînes greffées de PMAtBu

III.2.1.1 Réaction d'hydrolyse des chaînes greffées de PMAtBu

Afin d'obtenir les fonctions COOH nécessaires au greffage des enzymes, nous avons tout d'abord hydrolysé le poly(méthacrylate de tert-butyle) greffé sur les nanoparticules en poly(acide méthacrylique) (figure III.1).

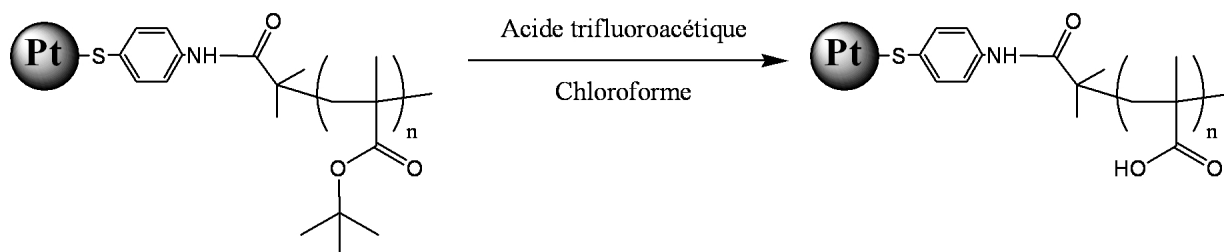


Figure III.1 – Schéma de la réaction d'hydrolyse des nanoparticules de platine greffées de poly(méthacrylate de tert-butyle).

Cette réaction (figure III.1) a été effectuée en milieu organique (chloroforme), nécessaire pour dissoudre les nanoparticules greffées de PMAtBu. Une fois les nanoparticules complètement solubilisées (concentration de 10 mg/mL), nous ajoutons une quantité d'acide trifluoroacétique (TFA) correspondant à une fraction volumique de 10%. Le milieu est alors laissé sous agitation environ 72 heures, jusqu'à la précipitation totale des nanoparticules greffées de PMAA. En effet, au cours de la réaction la solubilité des nanoparticules change : le PMAA formé sur celles-ci n'est pas soluble dans le chloroforme. Cependant, le PMAtBu qui n'a pas encore réagi, lui reste soluble. Il est donc nécessaire de déterminer le taux d'hydrolyse obtenu afin de définir si la réaction est totale ou partielle.

Après la réaction d'hydrolyse, et après plusieurs lavages au chloroforme, nécessaires pour éliminer le TFA en excès, nous constatons que les nanoparticules sont redispersibles dans une solution aqueuse à pH 8. Un milieu légèrement basique est en effet nécessaire pour que le PMAA soit entièrement déprotoné et soluble dans l'eau. Cette redispersion dans l'eau atteste donc d'un taux d'hydrolyse qui, même s'il n'est pas total, est *a priori* élevé.

III.2.1.2 Caractérisation de l'hydrolyse du PMAtBu

Plusieurs caractérisations physico-chimiques complémentaires ont été effectuées afin de confirmer l'hydrolyse du PMAtBu. De manière qualitative d'abord, nous avons ainsi analysé les nanoparticules greffées de PMAA par spectroscopie infra-rouge (IR). Ensuite, les analyses RMN ^1H et ATG effectuées, ont permis de quantifier le taux d'hydrolyse obtenu à l'issue de la précipitation des nanoparticules.

III.2.1.2.a Analyse de l'hydrolyse par spectroscopie infra-rouge

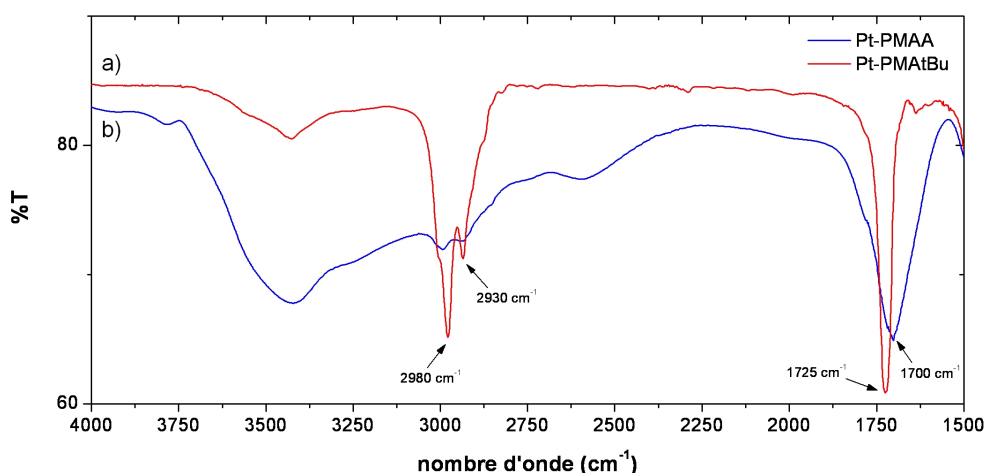


Figure III.2 – Spectres infra-rouge des échantillons de Pt-PMAAtBu (a) et de Pt-PMAA (b).

La figure III.2 présente les spectres IR des nanoparticules greffées de PMAtBu (a) et de PMAA (b). Sur le spectre a), le pic d'absorption situé à 2980 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation asymétrique des liaisons C-H des groupements CH_3 du tert-butyle. Le pic situé vers 2930 cm^{-1} correspond lui à la vibration asymétrique de la liaison C-H du groupement CH_2 du squelette polymère. Enfin, la bande située vers 1725 cm^{-1} est caractéristique de la liaison C=O d'un ester.

Sur le spectre b), nous observons un léger décalage de la bande d'absorption du carbonyle (C=O) : le pic passe de 1725 cm^{-1} dans le cas du PMAtBu à environ 1700 cm^{-1} pour le

PMAA, ce qui traduit le passage d'un groupe carbonyle d'ester à celui d'un acide. La forte diminution d'intensité de la bande d'absorption correspondant aux liaisons C-H des groupements CH₃, illustre logiquement la disparition des groupements méthyle du tert-butyle. Enfin, entre 3000 cm⁻¹ et 3600 cm⁻¹, nous observons l'apparition d'une large bande correspondant probablement à la vibration des liaisons OH des fonctions acides.

L'analyse effectuée par spectroscopie IR atteste donc d'une modification chimique de la couronne polymère, l'hydrolyse est effective. Néanmoins, pour déterminer le taux d'hydrolyse, des analyses plus quantitatives comme la RMN ¹H ou l'ATG, sont nécessaires.

III.2.1.2.b Analyse de l'hydrolyse par RMN ¹H

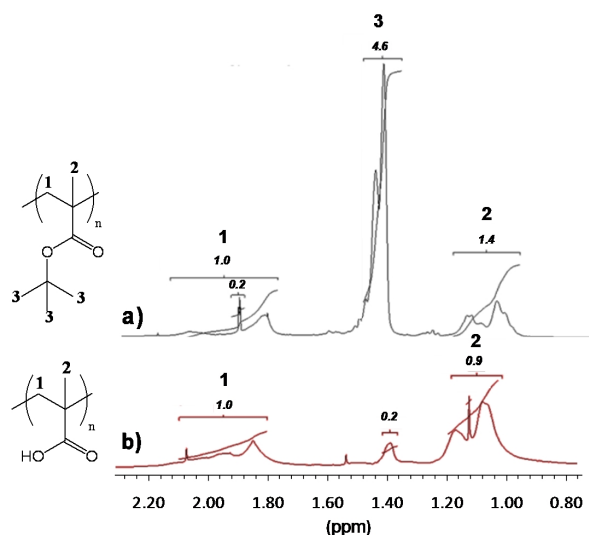


Figure III.3 – Spectres RMN ¹H des échantillons de Pt-PMAAtBu dans le CDCl₃ (a) et de Pt-PMAA dans le DMF (b).

La figure III.3 présente l'allure des spectres RMN ¹H des échantillons Pt-PMAAtBu et Pt-PMAA, effectués respectivement dans du chloroforme et du diméthylformamide (DMF) deutérés. Sur le spectre du Pt-PMAAtBu (a), le groupe de pics (pics 1), situés entre 1.7 et 2.2 ppm, est caractéristique des protons du groupe CH₂ du motif unitaire du PMAAtBu. Son intégrale est prise comme référence (nous avons soustrait la valeur due à un pic de solvant situé vers 1.9 ppm). Les pics 2, situés entre 0.9 et 1.2 ppm, correspondent aux protons du groupement CH₃ du motif unitaire, situé sur le squelette polymère. L'intégrale correspondante est de 1.4 (au lieu de 1.2 théoriquement). Les pics 3, situés entre 1.3 et 1.5 ppm, correspondent aux protons des groupes CH₃ du groupement tert-butyle. Leur intégrale, de 4.6, est cohérente avec la structure chimique du polymère. Sur le spectre du Pt-PMAA

(spectre b), nous pouvons observer que les pics 1 et 2, attribués aux CH₂ et CH₃ du squelette polymère, n'ont pas changé. Les pics 3, quant à eux, ont quasiment disparu. Ceci montre que l'hydrolyse est pratiquement totale. Nous avons estimé le taux d'hydrolyse en comparant les intégrales des pics avant et après hydrolyse. Ce calcul indique un taux d'hydrolyse proche de 98%.

III.2.1.2.c Analyses de l'hydrolyse par ATG

Afin de confirmer les résultats obtenus par RMN ¹H, nous avons également utilisé l'ATG pour comparer les taux de matière organique (%_wMO) des échantillons avant et après hydrolyse. Cette mesure est possible car le groupement tert-butyle représente environ 40% de la masse molaire du motif unitaire initial. Après hydrolyse, sa masse molaire passe en effet de 142 g.mol⁻¹ à 86 g.mol⁻¹. Ce changement sera donc détectable par ATG. La figure III.4 montre un exemple des résultats obtenus par ATG avant et après hydrolyse sur un échantillon (Pt-PMAtBu 14). Le %_wMO passe de 77.1% dans le cas du Pt-PMAtBu à 69.1% pour le Pt-PMAA correspondant.

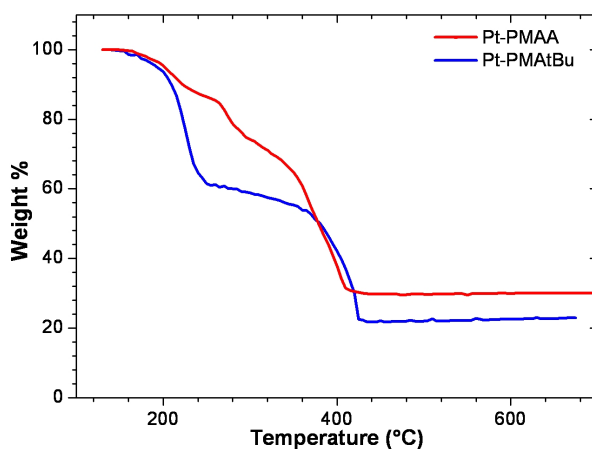


Figure III.4 – Evolution de la masse des nanoparticules greffées de PMAtBu et de PMAA en fonction de la température.

Pour estimer l'efficacité de l'hydrolyse à partir des analyses ATG effectuées, nous avons ainsi comparé la perte de masse expérimentale à la perte de masse théorique, correspondant à une hydrolyse totale, calculée à partir du %_wMO des échantillons de Pt-PMAtBu. Le rapport de ces valeurs nous a donné le pourcentage de groupements tert-butyle effectivement hydrolysés (équation III.1).

$$\%_{Hydrolyse} = \frac{m_{PMAtBu}/g_{platine} - m_{PMAA}/g_{platine}}{m_{PMAtBu}/g_{platine} - m_{PMAtBu}/g_{platine} \frac{M_{PMAA}}{M_{PMAtBu}}} \quad (III.1)$$

Où M_{MAA} et M_{MAtBu} sont les masses molaires du motif unitaire du PMAA et du PMAAtBu.

Le tableau III.1 présente les résultats obtenus pour l'hydrolyse de plusieurs échantillons :

Echantillon	%MO avant hydrolyse	%MO après hydrolyse	Taux d'hydrolyse %
Pt-PMAAtBu 7	75.1	67.1	87
Pt-PMAAtBu 8	72.5	64.1	88
Pt-PMAAtBu 14	77.1	69.1	98
Pt-PMAAtBu 22	86.5	80.7	90

Table III.1 – Résumé des taux d'hydrolyse mesurés par ATG.

Les taux d'hydrolyse déterminés à partir de mesures ATG sont voisins de 90%. Ces derniers sont légèrement inférieurs à l'estimation faite à partir de l'analyse RMN ^1H , mais restent proches d'une hydrolyse totale.

Les analyses RMN ^1H et ATG montrent que la réaction d'hydrolyse des nanoparticules de Pt-PMAAtBu est pratiquement totale. La précipitation des nanoparticules lors de la réaction, ne limite donc pas l'hydrolyse. Nous disposons maintenant de nanoparticules de platine greffées d'une couronne polymère comportant des fonctions COOH. Elles vont nous permettre de greffer de manière covalente la glucose oxydase (GOx) de manière à former des nanostructures hybrides platine-polymère-GOx. Comme nous l'avons indiqué précédemment, la réalisation de telles structures est envisagée selon deux approches. La première, concernant la formation de telles briques en solution, est abordée dans le paragraphe suivant.

III.2.2 Elaboration des structures hybrides Pt-PMAA-GOx en solution

L'objectif de cette étude est de déterminer dans quelles conditions nous pouvons greffer de manière covalente l'enzyme aux nanoparticules tout en conservant la stabilité du système en solution. Il s'agira ensuite de déterminer le rapport entre enzymes greffées et nanoparticules de platine, mais également de vérifier que ces enzymes greffées sont toujours actives.

III.2.2.1 Réaction de greffage de la GOx via l'utilisation du couple NHS/EDC

Afin d'immobiliser une enzyme sur des objets ou des surfaces, plusieurs techniques ont été développées¹⁴⁴ en fonction des applications visées et des substrats utilisés. Nous avons décidé de greffer de façon covalente la glucose oxydase aux nanoparticules de platine pour

obtenir un lien chimique fort entre les deux systèmes. La GOx, comme toutes les enzymes, possède sur sa coque externe des groupements fonctionnels (COOH, NH₂, SH). Ce sont les fonctions amines que nous allons exploiter pour lier l'enzyme à la couronne polymère de PMAA.

III.2.2.1.a Activation des fontions COOH

Afin de greffer de manière covalente des molécules biologiques sur un substrat (à pH physiologique), une stratégie très communément utilisée consiste à former préalablement un ester activé sur le substrat. Cette réaction consiste à faire réagir le couple N-HydroxySuccinimide (NHS) et 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl)-Carbodiimide (EDC) sur la fonction COOH du substrat. Le schéma de la réaction est présenté figure III.5.

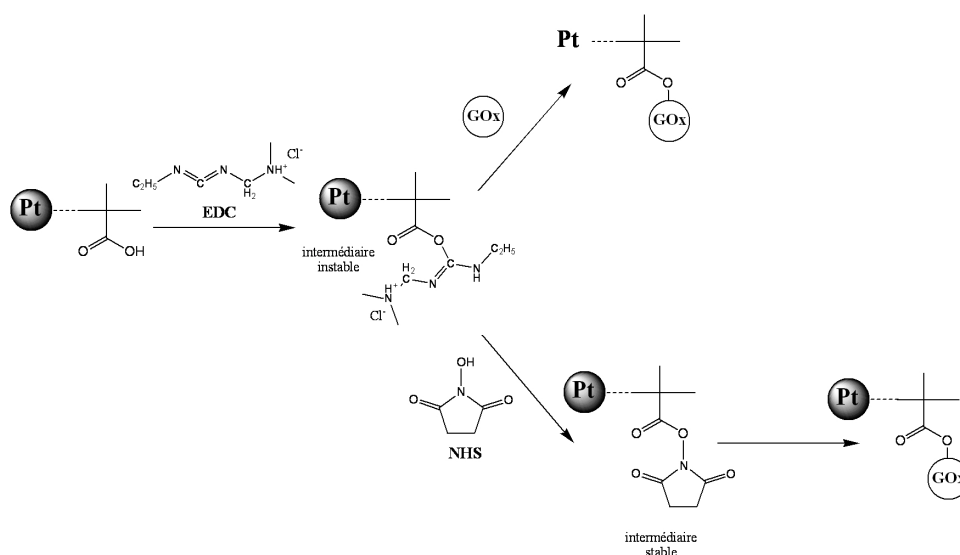


Figure III.5 – Schéma de la réaction de greffage de la GOx sur une fonction COOH via l'utilisation du couple EDC/NHS.

Il faut noter que l'EDC peut réagir spontanément avec la fonction COOH et mener seul au greffage de l'enzyme sur la fonction COOH, mais l'intermédiaire réactionnel qu'il forme est très instable. La présence de NHS permet d'obtenir un intermédiaire plus stable, augmentant ainsi grandement l'efficacité du greffage.

Pour effectuer la réaction d'activation des fonctions COOH, nous avons préalablement dispersé des nanoparticules de Pt-PMAA à 5 mg/mL dans une solution de tampon phosphate salin commercial (PBS) dont le pH a été ajusté à 8 par ajout de soude à 1 mol.L⁻¹.

Cependant, la présence de l'ester activé à la place de fonctions acides peut modifier la solubilité des nanoparticules en milieu aqueux et provoquer leur précipitation. Afin de vérifier dans quelles conditions les nanoparticules restaient solubles dans le tampon phosphate, nous avons donc étudié l'effet de la formation de l'ester activé sur la solubilité des nanoparticules Pt-PMAA à différentes concentrations de EDC et de NHS. Nous les avons introduits dans la solution de Pt-PMAA (5 mg/mL) dans des quantités correspondant à des rapports de 1, 2, 5 et 10 fonctions COOH pour une molécule de NHS (ou de EDC).

Pour les rapports 1/1 et 2/1, correspondant *a priori* à la formation d'un grand nombre d'esters activés, nous avons observé après quelques minutes la formation d'un précipité dans la solution. Ce changement de solubilité suggère donc la réussite de la formation d'un ester activé, mais rend impossible le greffage de la GOx dans le milieu choisi. Cependant, à partir du rapport 5/1, nous n'observons plus de précipitation. Nous avons donc choisi d'utiliser ce rapport 5/1 entre le nombre de fonctions acides et de molécules de NHS et EDC afin de garder nos objets stables en solution.

Les échantillons de Pt-PMAA activé (rapport COOH/NHS de 5/1) ont été analysés par spectroscopie IR, après précipitation dans l'acétonitrile afin d'éliminer les réactifs résiduels. Les spectres obtenus avant et après activation sont présentés figure III.6.

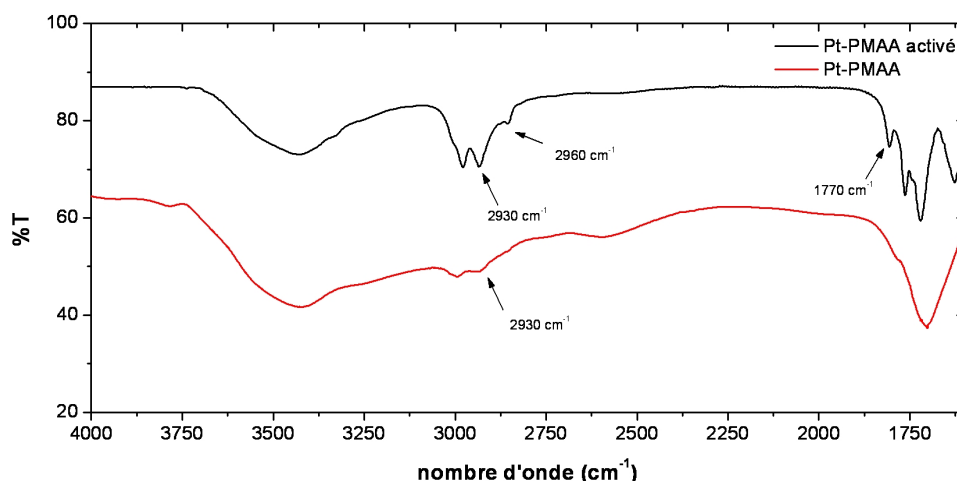


Figure III.6 – Spectres IR des échantillons de Pt-PMAA avant (a) et après (b) activation.

Les deux spectres sont très proches, mais nous notons tout de même l'apparition de pics attribuables à la liaison C=O du groupement succinimide vers 1770 cm^{-1} . Nous constatons également l'apparition d'un pic situé à 2860 cm^{-1} , ainsi que l'augmentation de celui situé à

2930 cm^{-1} . Ils correspondent respectivement aux vibrations symétriques et antisymétriques de la liaison C-H des groupements CH_2 , présents dans le groupement succinimide. Ces deux observations attestent donc de la transformation partielle de la fonction COOH en ester activé.

III.2.2.1.b Greffage en solution de la GOx sur le Pt-PMAA activé

Nous avons choisi de greffer l'enzyme sur les nanoparticules dotées de fonctions esters activées en introduisant des quantités de GOx correspondant à 1 et 5 enzymes par nanoparticule. La GOx étant une enzyme d'environ 160 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ces proportions correspondent à des concentrations respectives de 5 et 25 mg/mL en GOx pour une solution de Pt-PMAA à 5 mg/mL (% $_w$ MO d'environ 70% dans ces expériences). Afin de simplifier le protocole, nous avons introduit directement la GOx dans le milieu où a été menée l'activation du Pt-PMAA. Cette technique a toutefois l'inconvénient de ne pas éliminer les réactifs résiduels, qui peuvent alors favoriser des réactions de couplage entre les enzymes qui possèdent à leur surface à la fois des fonctions COOH et NH_2 . Le couple NHS/EDC ayant été introduit en fort défaut par rapport aux COOH , la probabilité de trouver des réactifs résiduels est limitée. D'autre part, nous procédons à l'activation des fonctions acides de PMAA pendant 2h avant d'ajouter la GOx dans le milieu, ce qui limite certainement les éventuelles réactions d'activation secondaires sur l'enzyme. Nous laissons ensuite incuber la solution 12h sous légère agitation avant de la conserver à 4 °C. Afin de vérifier que la réaction de greffage est effective et de déterminer la quantité d'enzymes greffées, nous avons utilisé plusieurs techniques complémentaires : DNPA, spectroscopie UV-visible et mesures d'activité enzymatique.

III.2.2.2 Etude du greffage de la GOx sur le Pt-PMAA par DNPA

Nous avons utilisé la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) afin de tenter de déterminer la structure du produit de la réaction de greffage entre la GOx et les échantillons de Pt-PMAA. Nous avons préalablement étudié l'enzyme et le Pt-PMAA séparément afin de définir les conditions idéales pour l'étude des briques hybrides Pt-PMAA-GOx.

III.2.2.2.a Etude préliminaire du Pt-PMAA et de la GOx par DNPA

Les deux composantes du système sont des espèces hydrogénées. Nous les avons donc tout d'abord étudiées séparément dans une solution aqueuse deutérée (D_2O) de tampon phosphate à pH 8. Les spectres obtenus sont présentés sur la figure III.7. Comme nous pouvons le voir sur la figure III.7a, le spectre de la solution de Pt-PMAA ne montre pas de plateau aux petites valeurs de q , contrairement à ce que nous avons observé sur le spectre du produit

précurseur (Pt-PMAAtBu, figure II.25, page 89). Ceci montre que la taille de l'objet en solution est plus grande après hydrolyse. A pH 8, les fonctions acides sont sous forme ionique et les chaînes polymères sont donc chargées. Ces dernières ont ainsi tendance à se repousser et s'étirer, ce qui entraîne vraisemblablement un accroissement du rayon de giration des objets en solution. Sans plateau dans le domaine des petits angles, il n'est pas possible de calculer le rayon de giration correspondant, ni la masse des objets.

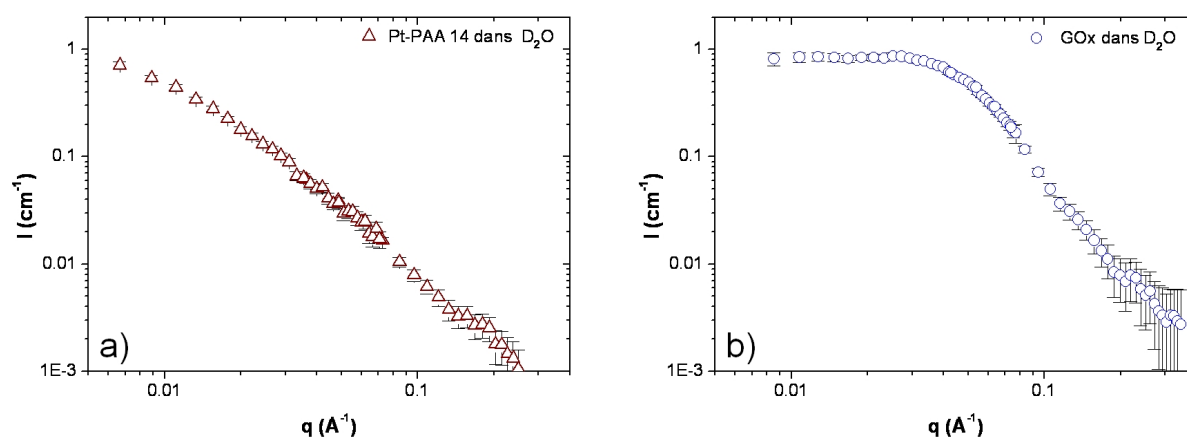


Figure III.7 – Spectres DNPA a) de Pt-PMAA 14 à 5 mg/mL et b) de GOx à 10 mg/mL dans du D₂O, tampon phosphate pH 8.

Le spectre de la figure III.7b correspond au signal de la GOx en solution. Le plateau visible aux petites valeurs de q , nous a permis de calculer un rayon de giration de 3.3 nm en utilisant l'approximation de Guinier. Ce rayon correspond aux dimensions moyennes de la GOx rapportées dans la littérature.¹⁴⁵

Pour l'étude par DNPA du produit issu de la réaction de greffage de la GOx sur les nanoparticules enrobées de polymère, nous sommes en présence d'un système complexe dans lequel il est nécessaire de dissocier la contribution due à la couronne polymère de celle due à l'enzyme. La technique de variation de contraste peut-être envisagée, mais le contraste entre les composantes du système doit être suffisamment important. La densité de longueur de diffusion du Pt-PMAA est de $1.30 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$. La structure de la GOx est trop complexe pour calculer analytiquement sa densité de longueur de diffusion. Nous l'avons donc mesurée expérimentalement. Pour cela, nous avons étudié cette enzyme dans différents mélanges D₂O/H₂O (figure III.8a). Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'intensité est proportionnelle à $(\Delta\rho)^2$ (équation III.2).

$$I(q) = \Phi V_{objet} (\Delta\rho)^2 P(q) S(q) \quad (\text{III.2})$$

Le tracé de la racine carrée de l'intensité (I) en fonction la fraction volumique en D_2O nous a permis de montrer que le signal de la GOx est éteint dans une solution composée à 45% de D_2O et 55% de H_2O (valeur pour laquelle \sqrt{I} est nulle, figure III.8b).

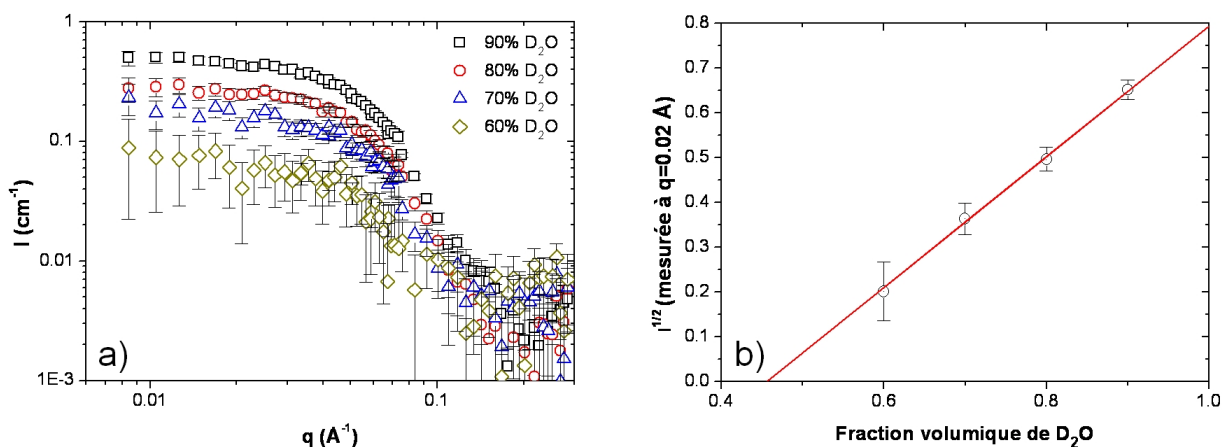


Figure III.8 – a) Spectres DNPA de la GOx à 10 mg/mL dans des solutions aqueuses contenant 90%, 80%, 70% 60% de D_2O et b) Détermination de ρ_{GOx} en traçant \sqrt{I} en fonction de la fraction volumique de D_2O .

Cette proportion correspond à une densité de longueur de diffusion de $3.26 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ pour la GOx. Le contraste entre les Pt-PMAA et la GOx n'est donc pas suffisant pour pouvoir exploiter la méthode de variation de contraste, basée sur le mélange de solvants deutérés et hydrogénés.

III.2.2.2.b Etude du greffage de la GOx sur Pt-PMAA par DNPA

Comme le contraste n'est pas assez important entre le PMAA et l'enzyme, nous avons étudié dans un premier temps la réaction de greffage dans du D_2O pour avoir une intensité diffusée suffisamment importante (sans pouvoir toutefois décorrélérer les contributions des deux composantes, polymère et enzyme). Un échantillon témoin constitué d'un simple mélange de GOx et de Pt-PMAA non activé, dans les mêmes proportions que celles utilisées lors du greffage a également été étudié. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure III.9.

Sur la figure III.9a, nous pouvons voir que le spectre du simple mélange de GOx et de Pt-PMAA correspond à l'addition des spectres de chaque composante mesurée séparément (figure III.7). Ceci indique qu'il n'y a pas, dans ce cas, d'interactions fortes entre la GOx et les nanoparticules Pt-PMAA. Au contraire, dans le milieu où la GOx a été ajoutée au Pt-PMAA activé, nous observons une remontée importante de l'intensité diffusée aux petits angles. Aux grandes valeurs de q , nous notons que les spectres sont identiques dans les 2 cas (simple mélange et greffage), la structure unitaire de la GOx apparaît. Les observations faites ici, se

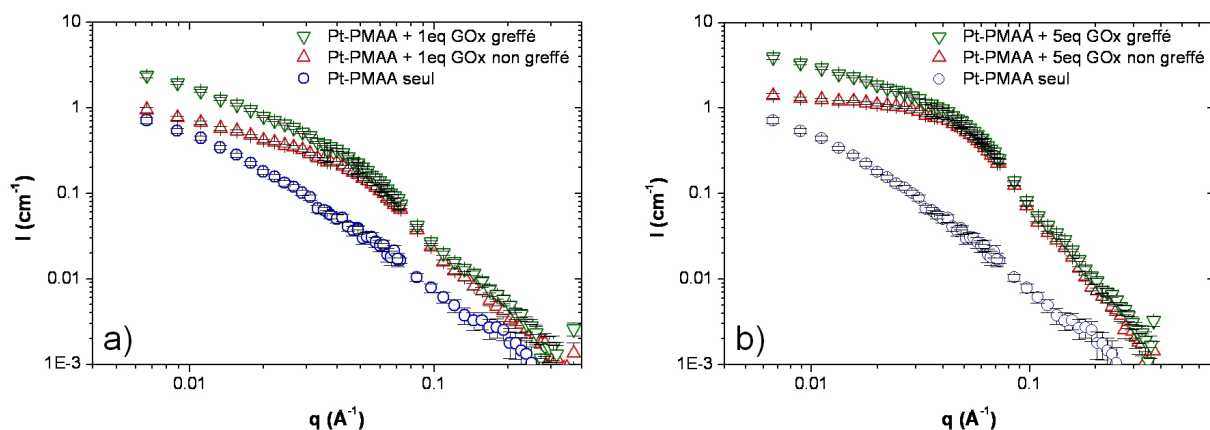


Figure III.9 – Spectres DNPA mesurés dans le D_2O du Pt-PMAA 14 à 5 mg/mL seul, de Pt-PMAA greffés d'enzyme et de Pt-PMAA et d'enzyme mélangés dans des rapports molaires NP/GOx de a) 1/1 et b) 1/5.

retrouvent sur les spectres de la figure III.9b, qui correspondent au greffage de l'enzyme dans des conditions où les proportions NP/GOx sont différentes (1 NP pour 5 GOx contre 1 NP pour 1 GOx auparavant). La remontée, observée aux petites valeurs de q , traduit à nouveau la formation d'objets de plus grande taille dans le cas des expériences de greffage. Ceci suggère la réussite du greffage. Toutefois, les conditions de greffage utilisées ne garantissent pas que plusieurs nanoparticules et plusieurs GOx ne sont pas reliées entre elles, conduisant ainsi à la formation d'agrégats. Au final, l'allure des spectres correspondant à l'enzyme greffée au Pt-PMAA (remontée de l'intensité diffusée aux petites valeurs de q et absence de plateau) suggère en fait la formation de ce type d'agrégat, dont la taille ne peut être déterminée par DNPA. Cependant, il faut noter que les solutions obtenues restent limpides et sont stables (pas de sédimentation). Les agrégats formés ont donc probablement une taille réduite. Des études ont également été menées en utilisant des nanoparticules greffées de PMAA deutéré (synthétisées par hydrolyse de nanoparticules de Pt-PMAtBu deutéré), afin d'augmenter le contraste entre les nanoparticules et l'enzyme. Cependant, elles n'ont pas permis d'obtenir d'information supplémentaire sur la structure des objets hybrides Pt-PMAA-GOx formés en solution car aucun plateau n'est visible aux petits angles.

Dans le paragraphe suivant, nous avons tenté de déterminer un taux de greffage moyen de la GOx par nanoparticule et également de mesurer l'activité des enzymes greffées.

III.2.2.3 Détermination de la quantité d'enzymes greffées et mesure d'activité

La détermination de la quantité d'enzymes greffées ainsi que les mesures d'activité enzymatique ont été effectuées pour l'échantillon obtenu après greffage de la GOx dans des proportions de 1 enzyme par nanoparticule. Nous avons dans un premier temps, utilisé la

spectroscopie UV-visible pour déterminer la proportion d'enzymes effectivement greffées. A l'aide de cette même technique, nous avons également réalisé des mesures d'activité enzymatique afin de déterminer la proportion d'enzymes encore actives après greffage. Chacune de ces études nécessitait cependant de séparer préalablement les enzymes greffées de celles qui seraient éventuellement toujours libres en solution (enzymes non greffées).

III.2.2.3.a Mesure de la quantité d'enzymes greffées par spectroscopie UV-Visible

La séparation des enzymes greffées de celles qui sont libres en solution est une étape délicate. Pour cela, nous avons abaissé le pH de la solution, par ajout d'acide chlorhydrique, afin de faire précipiter le Pt-PMAA et les enzymes qui y sont liées. Le pH a été seulement abaissé à 4 pour limiter autant que possible la dénaturation des enzymes. En ajoutant de l'acide dans le milieu, un précipité se forme après quelques secondes seulement. Il faut noter que le même test effectué sur le Pt-PMAA seul ou sur le Pt-PMAA simplement mélangé avec l'enzyme n'entraîne pas de précipitation immédiate. Ceci est probablement dû à la formation d'objets de taille plus élevée à l'issue de la réaction de greffage de la GOx, dont la précipitation est accélérée par rapport à celle des objets Pt-PMAA et GOx séparés. La sédimentation du précipité formé étant lente, le milieu a été centrifugé à 2000 G pour isoler le surnageant du solide. Dans ces conditions de centrifugation, les enzymes libres, donc non greffées, restent en solution. Nous avons répété cette purification une seconde fois après avoir redispersé le précipité de Pt-PMAA greffé de GOx dans un volume de PBS équivalent à celui du premier surnageant, afin de s'assurer de l'extraction de toutes les enzymes non greffées. Les surnageants, obtenus à chaque cycle de purification, ont été par la suite caractérisés par spectroscopie UV-visible.

Pour déterminer la quantité d'enzymes greffées, nous avons utilisé les bandes d'absorption caractéristiques de la GOx, situées à 451 et 380 nm. Cette mesure est possible sur les surnageants, qui contiennent les enzymes non greffées, car il reste très peu de platine en solution. Dans la solution obtenue par redispersion du précipité, la présence de platine qui possède une très forte absorption, gêne la mesure précise de la concentration en enzymes.

Afin de mesurer la concentration en GOx libre dans le surnageant, nous avons, dans un premier temps, tracé une droite de calibration de l'absorption de la GOx. Nous avons mesuré l'absorption de solution de GOx à 5, 3.75, 2.5 et 1.25 mg/mL dans du PBS, dans des cellules de quartz de 2 mm d'épaisseur (figure III.10). La calibration a été effectuée à 451 et 380 nm. Nous avons calculé, pour la GOx utilisée, des coefficients d'extinction massique, de respectivement $0.128 \text{ L.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et de $0.114 \text{ L.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 451 et 380 nm. Il faut noter

que les coefficients d'extinction sont identiques à pH 4 (pH du surnageant) et pH 7.4.

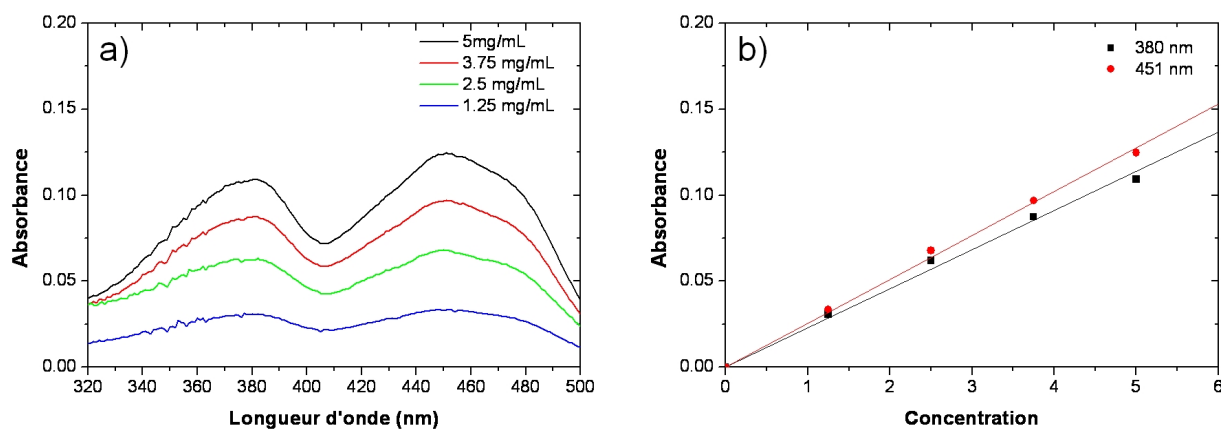


Figure III.10 – a) Mesures de l'absorbance de la GOx à 5, 3.75, 2.5 et 1.25 mg/mL dans l'eau (cellule de 2 mm) et b) droite d'étalonnage

Nous avons, par la suite, mesuré dans les mêmes conditions l'absorbance des surnageants obtenus après chaque précipitation. Les spectres d'absorption sont présentés dans la figure III.11. A partir de l'absorbance mesurée à 451 et 380 nm, nous avons estimé la concentration en enzymes dans les surnageants successifs et ainsi déterminé quel pourcentage de la quantité initiale d'enzymes, est extrait à chaque purification. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous (tableau III.2).

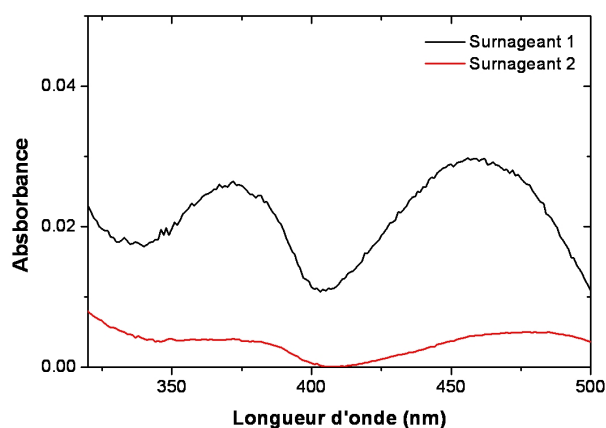


Figure III.11 – a) Mesure de l'absorbance de la GOx dans les surnageants obtenus après la première et la seconde purification (cellule de 2 mm).

La première purification permet donc de séparer une première fraction d'enzymes non greffées (présentes dans le surnageant) qui correspond à environ 23% de la quantité initiale de GOx introduite dans le milieu réactionnel. La seconde purification par contre, est presque

Cycle de purification	Absorbance		[GOx] mg/mL		% GOx extraite	
	380 nm	451 nm	380 nm	451 nm	380 nm	451 nm
1	0.0241	0.0289	1.05	1.13	21%	23%
2	0.0036	0.0037	0.15	0.15	3%	3%

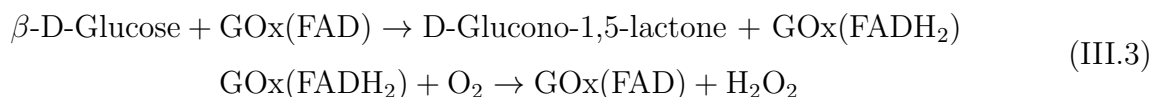
Table III.2 – Résumé des concentrations en GOx déterminées par spectroscopie UV-visible.

inutile car elle permet d'extraire une fraction d'enzymes non greffées correspondant à seulement 3% des enzymes initialement présentes. Cette étude montre ainsi qu'il est possible de jouer sur la solubilité de l'objet final afin de séparer enzymes greffées et non greffées. A l'issue des deux cycles de purification, l'étude des surnageants montre donc qu'environ 75% des enzymes initialement introduites sont effectivement greffées, ce qui correspond à une valeur moyenne de 0.75 enzyme par nanoparticule de platine. Il nous faut maintenant déterminer la proportion de glucose oxydase toujours active dans le système hybride Pt-PMAA-GOx obtenu.

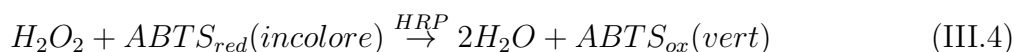
III.2.2.3.b Mesure de l'activité enzymatique sur le système hybride Pt-PMAA-GOx

Le principe d'une mesure d'activité est brièvement présenté dans ce paragraphe. Une description plus détaillée ainsi que le protocole utilisé, sont présentés dans l'annexe E.

La réaction enzymatique de la GOx sur le glucose est reportée ci-dessous (équation III.3). Au cours de la réaction, le site actif de la GOx, la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) oxyde le glucose en gluconolactone. Sa forme réduite (FADH₂), est ensuite régénérée en réduisant l'oxygène dissous dans le milieu, en H₂O₂. Il faut noter que l'activité de la GOx va être fortement dépendante du pH et de la température.¹⁴⁵ Son activité est maximale à pH 5.5 et à 35 °C.



La mesure de l'activité enzymatique que nous avons effectuée est basée sur la détection indirecte par spectroscopie UV-visible de la formation de H₂O₂, produit secondaire de la réaction enzymatique de la GOx sur le glucose. Son principe repose sur l'utilisation de l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase), et d'un chromophore, l'ABTS (2,2-amino-bis(3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonic-acid)). Selon l'équation III.4, H₂O₂ est réduite par la HRP (équation III.4) qui se régénère en oxydant l'ABTS, qui se colore alors en vert ($\epsilon=3.68 \times 10^4$ L.mol⁻¹cm⁻¹ à 420 nm).



En mesurant la vitesse d'apparition du pic d'absorption situé à 420 nm, il est donc possible de mesurer l'activité de la GOx. Dans ces mesures, l'HRP, l'ABTS et le glucose doivent être introduits en excès pour que la quantité d'enzyme et son « turnover » soient les seuls facteurs limitant la cinétique. Cette activité est quantifiée par une vitesse maximale, V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) qui correspond à la vitesse de catalyse de l'enzyme (vitesse de production de H_2O_2 en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$).

Notre objectif était de déterminer la quantité d'enzymes encore actives présente dans le système hybride Pt-PMAA-GOx formé en solution. Dans un premier temps, nous avons donc effectué une courbe d'étalonnage afin de mesurer l'activité enzymatique initiale du lot de GOx commercial utilisé. La droite de calibration, présentée figure III.12 permet de déterminer l'activité de l'enzyme V_{max} en fonction de la masse d'enzyme présente dans la cuve utilisée pour les mesures de spectroscopie UV-Visible (cellule de 3 mL, à 35 °C dans une solution de PBS). La pente mesurée indique une activité de $220 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour le lot d'enzymes utilisé.

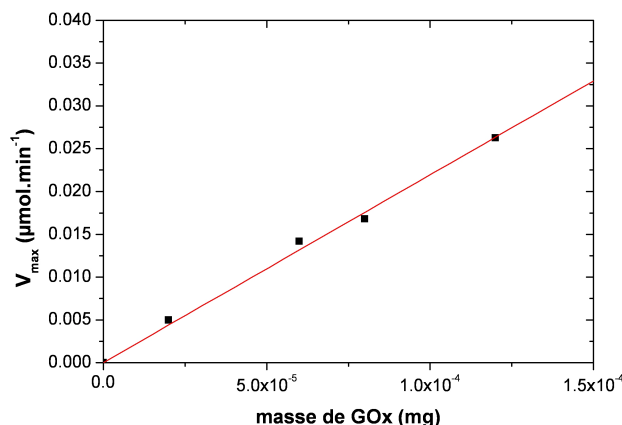


Figure III.12 – Etalonnage de V_{max} en fonction de la masse de GOx à pH 7.4 et à 35 °C.

Nous avons ensuite mesuré, dans les mêmes conditions, la quantité d'enzymes actives dans 3 échantillons : la solution initiale comportant le système hybride de Pt-PMAA-GOx et les enzymes non greffées, le surnageant issu de la première centrifugation qui contient seulement les enzymes non greffées et enfin la solution formée à partir de la redispersion du système hybride Pt-PMAA-GOx isolé par centrifugation (précipité). Contrairement à l'étude précédente visant à déterminer la quantité totale de GOx greffée, il est possible d'effectuer

ces mesures sur les échantillons contenant du platine. En effet, les solutions sont ici très diluées en platine, du fait que la mesure d'activité doit être menée à des concentrations en GOx très faibles. Ainsi, les solutions initiales étudiées ont été diluées 30000, 100000, et 150000 fois pour obtenir une quantité de GOx dans la cuve de l'ordre de celles utilisées lors de la calibration. Les mesures de V_{max} ainsi que les concentrations en enzymes actives correspondantes ($[GOx_{act.}]$), calculées en tenant compte des rapports de dilution, sont présentées dans le tableau III.3, et comparées aux concentrations totales en GOx dans chaque milieu ($[GOx_{tot.}]_{UV}$), déduites des mesures de spectroscopie UV-visible.

solution	V_{max} ($\mu mol.min^{-1}$)	$[GOx_{act.}]_{mesure}$ ($ng.mL^{-1}$)	rapport dilution	$[GOx_{act.}]$ ($mg.mL^{-1}$)	$[GOx_{tot.}]_{UV}$ ($mg.mL^{-1}$)
Pt-PMAA+GOx avant purif.	0.012	18	150 000	2.70	5.00
Surnageant	0.020	32	30 000	0.95	1.05
Pt-PMAA-GOx redispersé	0.012	18	100 000	1.90	3.95

Table III.3 – Résumé des concentrations en GOx active déterminées par spectroscopie UV-visible. $[GOx_{act.}]_{mesure}$ étant la concentration en GOx dans la cuve lors de la mesure (en $ng.mL^{-1}$), déterminée à partir de la droite de calibration, $[GOx_{act.}]$, la concentration en GOx active dans les solutions initiales, calculées en tenant compte des rapports de dilution (en $mg.mL^{-1}$), et $[GOx_{tot.}]_{UV}$ la concentration totale en GOx(en $mg.mL^{-1}$).

D'après ces résultats, nous observons tout d'abord que la concentration en enzymes actives dans le surnageant, ajoutée à celle de la solution de Pt-PMAA-GOx redispersée est pratiquement égale à la concentration initiale en enzymes actives dans le milieu réactionnel initial. Ceci montre que le protocole de purification ne dénature pas les enzymes. Nous observons que dans la solution initiale (Pt-PMAA-GOx avant purification), seules 54% des enzymes sont actives. Cette proportion est largement supérieure pour les enzymes libres présentes dans le surnageant (90%), et légèrement inférieure pour les enzymes greffées présentes dans le système hybride Pt-PMAA-GOx qui a été redispersé (48%). Ceci suggère que la baisse d'activité est principalement due au fait que les enzymes sont greffées. Au final, nous disposons donc d'une solution de Pt-PMAA à 5 mg/mL contenant 1.9 mg/mL d'enzymes greffées.

Dans cette partie, nous avons montré qu'il était possible de greffer la glucose oxydase sur les nanoparticules de Pt-PMAA en solution et d'isoler une nanostructure hybride Pt-PMAA-GOx qui peut être redispersée et manipulée en solution. La réaction de greffage est

efficace (75% des enzymes greffées pour un rapport initial de 1 GOx par nanoparticule) et une baisse d'activité enzymatique d'environ 50% a été mesurée. L'objectif poursuivi dans cette première approche est atteint. Nous disposons d'une solution comportant un système hybride Pt-polymère-enzyme de composition connue dans lequel 50% de ces dernières sont actives. Cette solution sera utilisée au chapitre suivant pour la réalisation de mesures électrochimiques de détection de glucose. La section suivante de ce chapitre aborde la seconde approche visant à réaliser des structures platine-polymère-GOx, mais cette fois à l'état solide sous la forme de film ultra-mince.

III.3 Elaboration de structures Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince

Dans les paragraphes suivants, nous présentons la réalisation de structures hybrides Pt-PAA-GOx en film ultra-mince. Deux types de structures ont été élaborées, chacune utilisant des films de nature différente élaborés par la technique de Langmuir-Blodgett. Le premier type de structure est basé sur l'utilisation des nanoparticules de Pt-PMAA dont la synthèse et la caractérisation ont été présentées au début de ce chapitre. Ces nanoparticules seront utilisées pour former un film de Langmuir-Blodgett (LB) sur lequel nous procéderons directement au greffage de la GOx.

Le deuxième type de structure est une structure brosse polymère qui sera formée à partir d'un film LB de nanoparticules amorçantes (voir paragraphe II.2, chap II). Cette structure est formée en deux étapes. La première est la formation d'une structure brosse de MAtBu sur le film LB de nanoparticules amorçantes. La seconde étape correspond à l'hydrolyse de celle-ci pour former une brosse de PMAA. Le greffage de la GOx intervient ensuite directement sur ce système.

Les deux structures Pt-PMAA-GOx visées étant formées à partir de films de Langmuir-Blodgett, la mise en œuvre de cette technique est également présentée dans ce chapitre. L'objectif principal est ici de réaliser les structures en film LB précurseurs (sans enzymes). La technique de Langmuir-Blodgett consiste à former dans un premier temps, un film de Langmuir à l'interface air-eau qui sera ensuite transféré sur des supports solides pour obtenir les structures de Langmuir-Blodgett. La formation des films de Langmuir constitue plus qu'une étape dans la réalisation du film LB. En effet, l'allure des isothermes de compression dépend des caractéristiques des objets qui sont utilisés pour former le film de Langmuir et permet l'obtention d'informations importantes et complémentaires des caractérisations précédentes réalisées sur ces objets. Ainsi, avant d'aborder la réalisation proprement dite des

films minces, les paragraphes suivants présentent le principe et les caractéristiques principales de la technique de Langmuir-Blodgett ainsi que l'étude des isothermes de compression des films formés à partir des différentes nanoparticules synthétisées dans ce travail.

III.3.1 Films de Langmuir-Blodgett de nanoparticules greffées de polymère

III.3.1.1 Principe et caractéristiques de la technique de Langmuir-Blodgett(LB)

La technique de Langmuir-Blodgett a été mise au point il y a près d'un siècle par I. Langmuir et K. Blodgett. Historiquement elle utilise des molécules amphiphiles qui présentent une partie hydrophile et une partie hydrophobe et qui sont insolubles dans l'eau. Cependant, depuis cette époque, son utilisation s'est très largement étendue à des systèmes non amphiphiles de nature très variée (nanoparticules,¹⁴⁶ polymères,^{147,148} objets biologiques^{149,150}). La diversité des objets utilisés correspond à la volonté de réaliser des films ultra-minces possédant des caractéristiques structurales et des propriétés physiques, chimiques ou biochimiques particulières.

La mise en œuvre de la technique LB implique l'utilisation d'une cuve de téflon remplie d'eau munie d'un dispositif de mesure de tension superficielle (balance de Wilhelmy) et d'une barrière mobile permettant de modifier la surface de l'interface air-eau disponible. Le passage d'objets dispersés en solution à celui de films de Langmuir-Blodgett déposés sur un support solide, nécessite trois étapes qui sont illustrées sur la figure III.13 : l'épandage, la compression, qui conduit à la formation du film de Langmuir à la surface de l'eau et enfin le transfert de ce dernier sur un substrat solide pour former le film de Langmuir-Blodgett.

Au début de l'expérience, la surface de l'eau doit être exempte de matière, ce qui est en général obtenu par un drainage de la surface à l'aide de capillaires reliés à une trompe à vide. Dans ces conditions, la pression mesurée par la balance de Wilhelmy est la pression superficielle de l'eau pure. C'est par rapport à cette valeur (qui sert de zéro) que seront ensuite mesurées les variations de pression de surface (exprimées en mN/m). La première étape du processus consiste à épandre à la surface une solution de concentration connue contenant les objets que l'on souhaite organiser en film LB. Le solvant utilisé doit être non miscible à l'eau, afin de ne pas entraîner les objets dans celle-ci et permettre l'étalement de la solution à la surface. Connaissant le volume épandu, il est possible de calculer la quantité de matière présente à la surface. La quantité de matière épandue doit être telle que la surface occupée par celle-ci reste inférieure à la surface totale d'interface air-eau disponible. Ceci

est vérifié lorsqu'à l'issue de l'étape d'épandage, aucune modification de pression de surface n'est observée (la pression de surface reste égale à celle de l'eau pure).

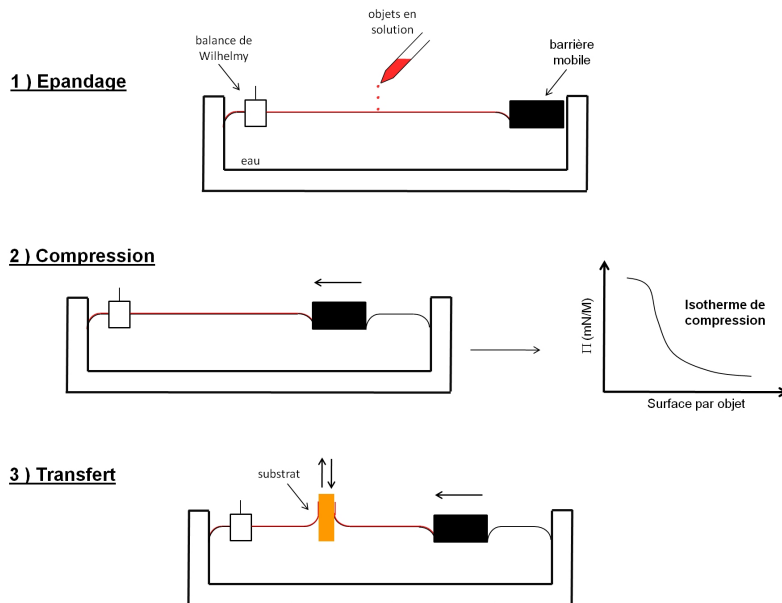


Figure III.13 – Technique de Langmuir-Blodgett : phases d'épandage, de compression et de transfert

La seconde étape du processus est la compression. Elle va consister à réduire la surface d'interface air-eau disponible en déplaçant la barrière mobile vers l'avant de la cuve où se trouve la balance de Whilelmy. Nous observons alors, une modification de la pression de surface due au fait que les objets présents à la surface de l'eau se trouvent en contact. Connaissant à tout moment la surface totale d'interface air-eau ainsi que la quantité de matière épandue, il est possible de tracer l'isotherme de compression. Cette dernière indique la variation de pression de surface en fonction de l'aire occupée par unité de masse de matière épandue. Si la masse molaire des objets épandus est connue, il est possible de calculer l'aire par objet pour chaque valeur de pression superficielle. Cette valeur intrinsèque est caractéristique de l'objet utilisé tant que le film formé reste une monocouche. En effet si la compression devient trop importante, le film finit par s'effondrer. Ceci se traduit par la formation d'agrégats tridimensionnels à la surface de l'eau. Il faut enfin préciser que les isothermes de compression peuvent être enregistrées de deux manières différentes. En mode dynamique, la vitesse de la barrière mobile est fixée et les variations de pression de surface sont enregistrées en continue. En mode statique, le déplacement de la barrière mobile est asservi à une valeur de consigne de pression de surface, qui est incrémentée progressivement après stabilisation du film à chaque valeur de pression. Les deux méthodes ont été utilisées dans nos études.

La dernière étape du processus consiste à transférer sur un substrat solide, le film de Langmuir, pour former un film de Langmuir-Blodgett. Ce transfert est possible si la pression de surface supportée par le film de Langmuir est suffisamment importante et également, si les objets ont une interaction particulière avec la surface du substrat solide utilisé. Le transfert peut être effectué dans deux configurations différentes. Un transfert horizontal est possible selon différentes méthodes (en plaçant préalablement le support sous la surface, voir Annexe C), mais il ne permet pas toujours de superposer les couches et peut nécessiter la formation d'un nouveau film de Langmuir pour chaque monocouche déposée. Le transfert vertical (illustré sur la figure III.13) est plus généralement utilisé car il permet de réaliser un dépôt de plusieurs monocouches à partir d'un même film de Langmuir. Cette technique consiste à descendre et à remonter séquentiellement le support à travers l'interface air-eau où le film a été formé. Ce type de transfert permet également de déterminer facilement un taux de transfert du film de Langmuir sur le substrat solide. Ce dernier correspond au rapport de la surface de film consommé et de la surface de support solide ayant traversé l'interface air-eau. Sa détermination est importante car elle permet de connaître la quantité d'objets transférés sur le support solide. Dans la pratique, l'aptitude au transfert d'un film de Langmuir dépend des caractéristiques des objets qui le constituent. Les films de Langmuir constitués de molécules amphiphiles sont en général transférés avec des taux de transfert très proches de 100%.

Comme nous le verrons, les films de Langmuir des nanoparticules synthétisées dans ce travail, ne peuvent pas être transférés de manière reproductible et contrôlée sur un substrat solide selon la méthode de transfert vertical. Les essais de transfert horizontal nous ont permis d'obtenir quelques échantillons mais dans ce cas, il est difficile de connaître avec précision le taux de transfert. Nous avons donc en général eu recours à l'utilisation de films mixtes constitués d'un mélange en proportions contrôlées de nanoparticules enrobées et d'une molécule amphiphile, présentant une bonne aptitude au transfert. La réalisation et l'utilisation de tels films mixtes sont très bien maîtrisées au laboratoire, de même que le traitement consistant à éliminer sélectivement l'acide gras après formation des films LB mixtes sur substrat solide.^{128,125}

Après cette présentation générale de la technique LB et avant d'aborder la réalisation des structures Pt-PMAA-GOx à partir des films de Langmuir-Blodgett, nous allons présenter les caractéristiques des films de Langmuir et des isothermes de compression réalisés à partir des différentes nanoparticules synthétisées dans ce travail. Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, l'allure des isothermes et les surfaces par objet, dépendent fortement des caractéristiques de

ceux-ci. La surface par particule peut être déterminée à partir des isothermes de compression et constitue une valeur caractéristique reliée aux dimensions des objets. Il nous a paru intéressant de comparer ces valeurs à celles déterminées à la fois en solution par DNPA, mais aussi à l'état solide par diffraction des rayons X sur les poudres.

III.3.1.2 Etude des isothermes de compression des films de Langmuir des nanoparticules greffées de polymère

L'étude des isothermes de compression comporte un intérêt particulier car les chaînes polymères greffées sur les nanoparticules présentent des caractéristiques (masses molaires, nature du monomère) que nous pouvons moduler. Celles-ci vont avoir une influence sur l'allure des isothermes de compression et sur les valeurs de surface par particule.

Comme nous allons le voir, ces surfaces par particule peuvent être également exploitées pour estimer une distance inter-particules moyenne dans le film de Langmuir (le calcul est présenté en annexe). Cette valeur peut être comparée aux rayons de giration déterminés dans certains cas par DNPA en solution (chapitre II) et aux distances inter-particules qui ont pu être mesurées sur les poudres par diffusion des rayons X aux petits angles (collaboration avec P-A Albouy du Laboratoire de Physique du Solide à Orsay).

Les nanoparticules étudiées dans ce paragraphe sont les nanoparticules amorçantes qui possèdent un enrobage de faible poids moléculaire et les nanoparticules possédant une couronne polymère de type PMAAnBu, PMAAtBu et PMAA. Bien que l'étude des nanoparticules Pt-PMAAnBu soit ici un peu annexe, elle est tout de même présentée car nous disposons de nanoparticules de type Pt-PMAAtBu possédant un pourcentage de matière organique pratiquement identique. Dès lors il était intéressant de comparer l'allure des isothermes en fonction de la nature de l'enrobage et de la longueur des chaînes greffées.

L'épandage des solutions de nanoparticules peut être fait directement pour les nanoparticules de types Pt-PMAAnBu et Pt-PMAAtBu, car elles sont solubles dans le chloroforme (solvant non miscible à l'eau). Au contraire, les solutions de nanoparticules amorçantes et de nanoparticules de type Pt-PMAA ne peuvent être épandues directement, car les solvants utilisés pour les solubiliser sont miscibles à l'eau (DMAc ou DMSO). Aussi pour l'épandage, nous prélevons un faible volume des solutions mères dans lequel un volume double de chloroforme est ajouté, de manière à rompre la miscibilité des solvants avec l'eau.

Les isothermes de compression (figure III.14) ont ici été enregistrées en mode dynamique en imposant une faible vitesse de compression ($0.2 \text{ cm}^2/\text{s}$ pour la barrière mobile). Le système

reste ainsi le plus proche possible de l'équilibre, et ce, jusqu'à la pression maximale précédant l'effondrement des films. Ces valeurs sont de 12 mN/m pour les films de nanoparticules amorçantes, 30 mN/m pour ceux de Pt-PMAA et 35 mN/m pour ceux de Pt-PMAAtBu. Dans le cas du Pt-PMAAnBu 2, aucun effondrement n'a été observé. La gamme de pression étudiée a été limitée du fait des dimensions de la cuve et de la très forte variation de l'aire par particule au cours de la compression. La surface par objet a ensuite été calculée à partir de l'équation suivante (équation III.5). Il faut noter que la quantité d'objets épandus est calculée à partir de la masse molaire du cœur de platine et de la fraction massique de platine déterminée sur la poudre par ATG.

$$S_{objet} = \frac{S_{tot} \times M_{NP}}{c_0 \times V_{ep} \times \%_wPt \times N_A} \quad (III.5)$$

avec S_{tot} la surface de film mesurée, c_0 la concentration massique en Pt-polymère dans la solution d'épandage, V_{ep} le volume épandu, M_{NP} la masse du cœur de platine et $\%_wPt$, la fraction massique de platine dans l'objet ($\%_wPt=1-\%_wMO$) et N_A le nombre d'Avogadro.

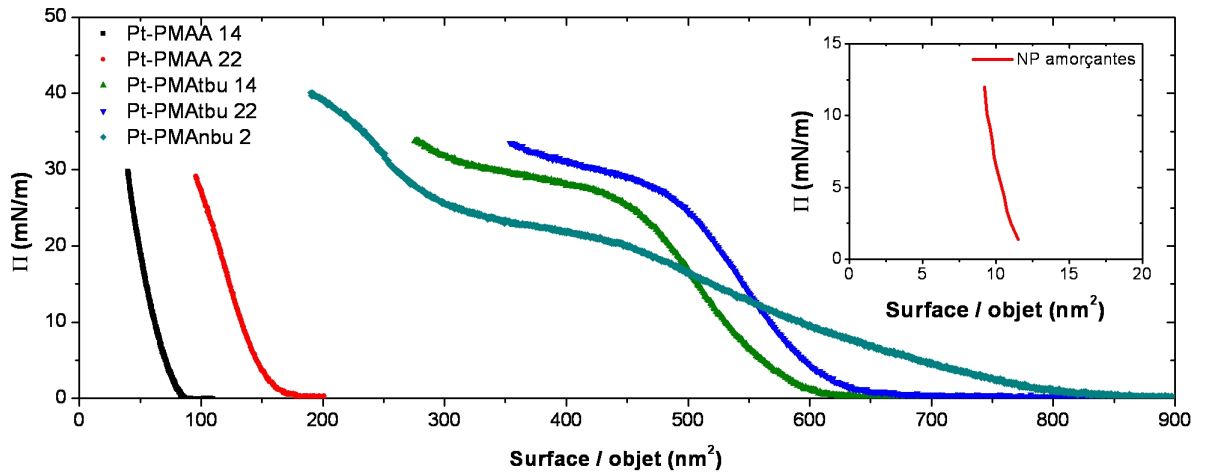


Figure III.14 – Isothermes de compression enregistrées à 0.3 mm/s sur les échantillons de Pt-PMAAtBu 22 ($\%_wMO=86.5\%$), Pt-PMAAtBu 14 ($\%_wMO=77.1\%$), Pt-PMAAnBu 2($\%_wMO=86.3\%$), Pt-PMAA 22($\%_wMO=80.7\%$) et Pt-PMAA 14($\%_wMO=69.1\%$), et en insert, celle des nanoparticules amorçantes ($\%_wMO=20.4\%$).

Les caractéristiques des nanoparticules tirées des isothermes de compression sont rapportées dans le tableau III.4, qui comporte également les distances inter-particules mesurées sur les poudres par diffusion des rayons X et les rayons de giration mesurés en solution par diffusion de neutrons.

Echantillon	% _w MO	S _{objet} (nm ²)	D _{interpart.} (LB) (nm)	D _{interpart.} (DRX) (nm)	R _g (DNPA) (nm)
Pt-Br	20.4	9.2	3.3	3.5	2.6
Pt-PMAtBu 14	77.1	275.5	17.8	11.5	-
Pt-PMAtBu 22	86.5	353.8	20.2	11.3	10.4
Pt-PMAnBu 2	86.3	233.2	16.4	10.1	9.1
Pt-PMAA 14	69.1	39.9	6.8	7.6	-
Pt-PMAA 22	80.7	95.7	10.5	9.4	-

Table III.4 – Résumé des surfaces et des distances inter-particules mesurées par LB à 12 mN/m pour les nanoparticules amorçantes, à 30 mN/m pour le Pt-PMAA et à 35 mN/m pour Pt-PMAnBu et Pt-PMAtBu, des distances inter-particules mesurées par diffraction de rayons X et des rayons de giration mesurés dans le DMAc par DNPA.

Concernant les nanoparticules amorçantes, nous observons tout d’abord que les isothermes à base de nanoparticules amorçantes possèdent une assez faible compressibilité et une pression d’effondrement faible (environ 12 mN/m). Ces films possèdent donc une grande rigidité. L’effondrement ne se produit cependant pas brutalement, il est en fait repérable à la formation de liserés de matière aux abords de la barrière mobile, traduisant la perte du caractère monoparticulaire de l’épaisseur du film. A partir des isothermes, nous avons pu également calculer une distance inter-particules moyenne de 3.4 nm, qui est très proche de celle déterminée par diffusion de rayons X. Les caractéristiques de l’isotherme de ces nanoparticules sont tout à fait conformes à celle enregistrées dans le cas d’enrobages de faibles poids moléculaires.^{128,125}

La présence de chaînes polymères modifie de manière spectaculaire les caractéristiques du film formé, comme le montrent les isothermes des nanoparticules de types Pt-PMAnBu et Pt-PMAtBu. Pour ces films, les chaînes polymères greffées sur les nanoparticules sont hydrophobes. Les interactions de ces chaînes avec la sous-phase aqueuse seront donc *a priori* faibles et la cohésion du film de Langmuir est probablement assurée essentiellement par les interactions latérales entre les chaînes greffées. Les différences observées entre les isothermes de ces deux objets qui ne diffèrent l’un de l’autre que par la présence dans l’unité monomère, d’un groupe n-butyle dans un cas et tert-butyle dans l’autre, sont aussi assez remarquables.

Comparativement aux films à base de Pt-PMAtBu 22, celui à base de Pt-PMAnBu 2 présente une compressibilité nettement plus importante. Ce dernier présente également, à basse pression, une surface maximale par particule beaucoup plus élevée. Ceci traduit le fait que le groupement n-butyle est moins hydrophobe que le groupement tert-butyle. Les chaînes polymères du Pt-PMAtBu auraient ainsi tendance à moins s’étaler à la surface de l’eau que celles du Pt-PMAnBu. Un pseudo-plateau est également observé pour les deux

types de nanoparticules. Au début du plateau, une monocouche compacte est formée. La diminution de la surface par objet à pression quasi-constante (pseudo-plateau) traduit vraisemblablement une modification de la conformation des chaînes polymères au cours de la compression. Par contre, au-delà, le film à base de Pt-PMA_nBu est toujours stable et peut être encore comprimé. Une interpénétration des chaînes de PMA_nBu peut éventuellement expliquer la remontée à cette partie de l'isotherme. Le film de Pt-PMAtBu qui s'effondre après le plateau, est donc plus rigide que celui du Pt-PMA_nBu. Ceci est peut-être dû au fait que la compression est menée à 20 °C, température assez proche de la transition vitreuse du PMA_nBu, alors que nous sommes largement en-dessous de celle du PMAtBu (118 °C). Les chaînes de PMA_nBu sont donc plus mobiles, ce qui permet au film de supporter une compression plus importante. Ceci se retrouve également sur la distance interparticule dans le film, 16.4 nm à 35 mN/m, qui reste légèrement inférieure à celles observées pour le Pt-PMAtBu (20.2 nm) à pression de surface similaire. Enfin nous pouvons souligner que ces différences marquées observées sur les isothermes de compression ne se retrouvent pas dans les tailles mesurées à l'état de poudre par DRX, ni à celles mesurées en solution par DNPA. Ces différences sont d'ordre structurale, liées à la différence de T_g et d'hydrophobicité des deux couronnes polymères.

Nous pouvons maintenant comparer deux objets de type Pt-PMAtBu qui ne se différencient l'un de l'autre que par la longueur des chaînes greffées (même structure). Nous voyons que les deux nanoparticules de Pt-PMAtBu donnent des isothermes qui ont la même allure, les interactions entre objets et leur organisation sont donc similaires. La surface par objet est logiquement réduite sur l'ensemble de l'isotherme pour des chaînes polymères plus courtes. Les rayons par objet issus de l'isotherme sont de 17.8 nm et 20.2 nm, à 35 mN/m, respectivement pour le Pt-PMAtBu 14 et le Pt-PMAtBu 22. Ces valeurs sont ici aussi supérieures à celles déterminées par diffraction de rayons X et correspondent à environ deux fois le rayon de giration déterminé en solution, pour le Pt-PMAtBu 22. Les isothermes mesurées présentent deux zones caractéristiques : une première zone à basse pression où la surface par objet diminue lentement avec la pression, suivie d'un pseudo-plateau où comme nous l'avons dit précédemment, une réorganisation des chaînes polymères a lieu. Pour ce type de nanoparticules, au delà de ce plateau, la compressibilité du film est plus limitée et les films s'effondrent à des pressions légèrement supérieures.

Nous nous intéressons enfin aux isothermes de compression des particules de type Pt-PMAA. Comme nous pouvions nous y attendre, l'introduction des fonctions acides carboxyliques conduit à une modification considérable de l'allure des isothermes de compression et

des valeurs de surface par particule. Nous observons à nouveau que la masse de la couronne polymère a toujours un impact direct sur l'aire occupée par les objets. Cependant, les surfaces par nanoparticule sont largement plus faibles que celles observées pour les nanoparticules de type Pt-PMAtBu correspondantes. Nous constatons aussi la disparition du plateau sur les isothermes des particules de Pt-PMAA. La compressibilité des films est également bien plus faible que celle observée pour les particules greffées de polymères non hydrolysés. La pression d'effondrement enregistrée est également légèrement plus faible après hydrolyse. La transformation radicale des isothermes de compression suite à l'hydrolyse, est très probablement due au changement des conditions d'interactions entre les nanoparticules et la phase aqueuse. Dans le cas du Pt-PMAA, les chaînes polymères sont plutôt hydrophiles, ce qui favorise leur interaction avec la phase aqueuse et diminue l'impact des interactions entre nanoparticules dans le plan du film. Ceci conduit ainsi à une forte diminution de la surface par particule et à la disparition du plateau. Enfin nous pouvons remarquer que, contrairement au cas des nanoparticules portant des enrobages polymères hydrophobes, les distances inter-particules déduites des aires par particule, sont cette fois-ci très proches de celles enregistrées sur les poudres à l'état solide.

Certains des films de Langmuir étudiés ici, ont été caractérisés par des observations menées par microscopie électronique en transmission (MET) (collaboration avec C. Plummer de l'EPFL à Lausanne). Les échantillons sont réalisés par un prélèvement manuel du film de Langmuir comprimé à 28 mN/m sur des grilles de cuivre couvertes d'une peau de carbone. Les clichés des particules de type Pt-MAtBu, Pt-MAnBu et Pt-PMAA sont reportés sur la figure ci-dessous. Nous constatons la très grande différence de densité de nanoparticules indiquée par les isothermes de compression entre les systèmes hydrolysés et les systèmes dotés de couronnes hydrophobes. Ces clichés confirment par ailleurs que les films formés à l'interface air-eau sont bien d'épaisseur « monoparticulaire ».

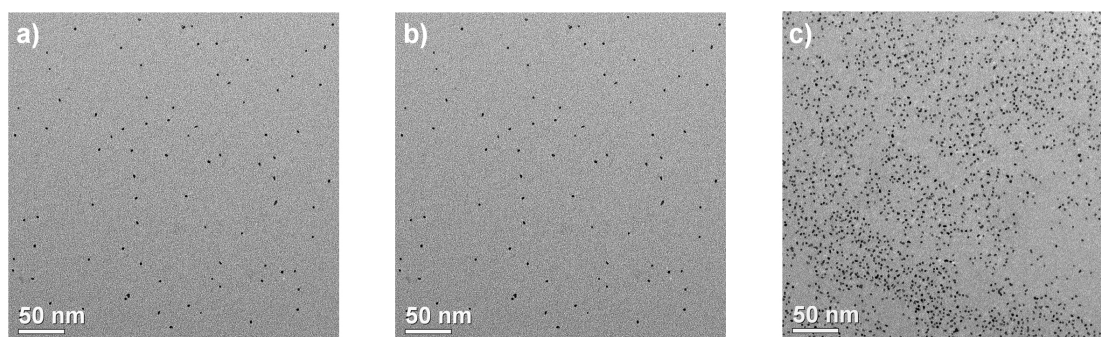


Figure III.15 – Clichés MET de films LB à base de a) Pt-PMAtBu 22, b) Pt-PMAAnBu 2 et c) Pt-PMAA 14, déposés à 28 mN/m sur une grille de carbone.

III.3.2 Structures en film ultra-mince à partir de films LB de Pt-PMAA

Après ce paragraphe rapportant les différences considérables observées sur l'allure des isothermes de compression pour des briques Pt-polymères dont les enrobages sont différents, nous revenons à l'objectif central de cette section qui concerne l'élaboration de structures hybrides Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince. Il nous faut pour cela réaliser les films de Langmuir-Blodgett qui serviront de précurseurs à la réalisation de ces systèmes. La première structure est formée à partir de nanoparticules Pt-PMAA.

III.3.2.1 Elaboration des films mixtes Pt-PMAA/acide béhénique

Nous avons ici travaillé avec les Pt-PMAA 14 qui comportent un pourcentage de matière organique de 69.1% et dont la surface par particule indiquée par l'isotherme de compression est de l'ordre de 7 nm^2 à 30 mN/m . Des tests préliminaires de transfert vertical ont montré que les interactions entre les substrats utilisés et les nanoparticules greffées de PMAA, ne sont pas assez favorables pour que le transfert se fasse lorsque le film de Langmuir comporte uniquement des nanoparticules. Des essais de transferts horizontaux ont donc été effectués (1 et 3 couches). Cependant, cette méthode décrite en annexe est peu pratique, et ne permet pas d'évaluer avec précision le taux de transfert du film sur le substrat solide. Même si quelques échantillons ont été réalisés, nous avons préféré former par la suite des films mixtes comportant des nanoparticules de Pt-PMAA et une molécule amphiphile présentant une bonne aptitude au transfert, l'acide béhénique.

Ainsi, l'introduction de molécules d'acide gras (acide béhénique, ou docosanoïque, $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$) dans la solution d'épandage des nanoparticules Pt-PMAA permet de modifier les caractéristiques du film et d'améliorer son aptitude au transfert. Nous avons choisi d'ajouter à la solution d'épandage une quantité d'acide béhénique telle que la surface du film soit composée, après épandage et compression, de 50% de nanoparticules greffées de polymère et de 50% d'acide béhénique. Pour cela, nous avons mesuré dans un premier temps l'isotherme de compression d'un film de Langmuir d'acide béhénique pur (figure III.16).

Le transfert du film mixte s'effectuant à pression constante, il est nécessaire pour nos calculs de choisir cette pression afin de connaître quelle est l'aire occupée par l'acide béhénique à cette pression. L'expérience du laboratoire dans l'élaboration de films mixtes de nanoparticules montre que le transfert de film mixte nanoparticules enrobées/acide béhénique s'effectue dans de bonnes conditions à une pression de 28 mN/m . C'est donc cette valeur

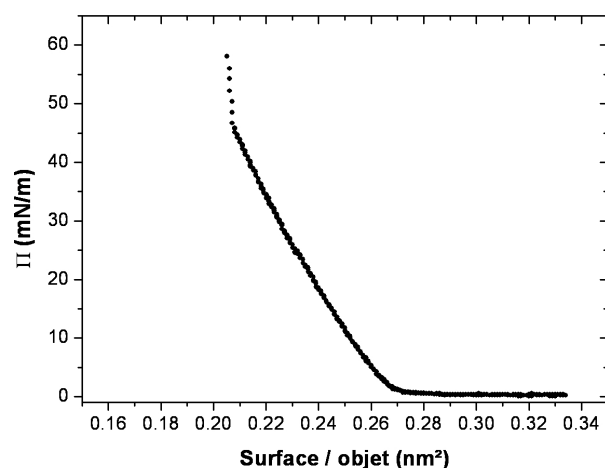


Figure III.16 – Isotherme de compression de l'acide béhénique à 20 °C.

de pression de transfert qui a été choisie. Naturellement, le calcul de la quantité d'acide à introduire, prend également en compte les caractéristiques de l'isotherme de compression de la nanoparticule Pt-PMAA utilisée.

Même si théoriquement, les surfaces occupées par chaque composant vont s'ajouter, des interactions spécifiques entre le polymère et l'acide béhénique peuvent apparaître et modifier la structure du film. Dans ce cas, la surface du film ne correspondra plus à l'addition simple des surfaces de chaque composant. Pour vérifier que nous sommes bien dans un cas où les surfaces de l'acide gras et de la nanoparticule s'ajoutent, nous avons étudié l'isotherme du film mixte de Pt-PMAA et l'avons comparé à celui du film pur de Pt-PMAA (figure III.17).

Il faut noter que pour ces isothermes, nous avons travaillé en mode statique, c'est à dire à chaque point de pression mesuré, le système est à l'équilibre (et non plus en mode dynamique où la vitesse de la barrière est constante). L'enregistrement de l'isotherme en mode statique permet également de vérifier que le film reste bien stable à la pression de 28 mN/m, qui sera imposée pendant toute la durée du transfert du film.

L'isotherme du film mixte permet de calculer, qu'à la pression de transfert choisie, la surface par nanoparticule correspond presque exactement au double de celle mesurée sur le film pur de Pt-PMAA (31,7 nm² contre 65,8 nm²). Il semble donc qu'il n'y ait pas dans ce cas, d'interaction particulière entre le Pt-PMAA et l'acide gras. Ceci est confirmé lorsque la contribution de l'acide gras est soustraite de la surface par objet sur l'isotherme du film mixte. La surface par nanoparticule calculée dans le film mixte, est ainsi pratiquement identique à celle mesurée dans le film pur. Ceci montre que les nanoparticules de Pt-PMAA dans le film mixte sont bien sous la forme de monocouches. Ce point a été confirmé par l'observation du

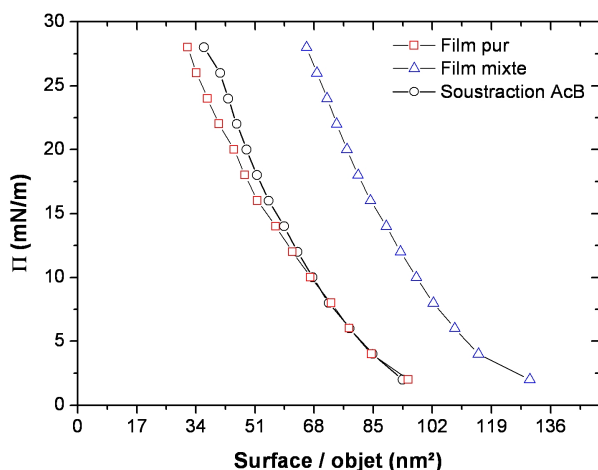


Figure III.17 – Isothermes de compression enregistrées en mode statique du film pur de Pt-PMAA 14, du film mixte 50/50 de Pt-PMAA et d'acide béhénique, et du même isotherme après soustraction de la contribution de l'acide béhénique.

film mixte en microscopie électronique en transmission, toujours prélevé manuellement, sur un support adapté (figure III.18).

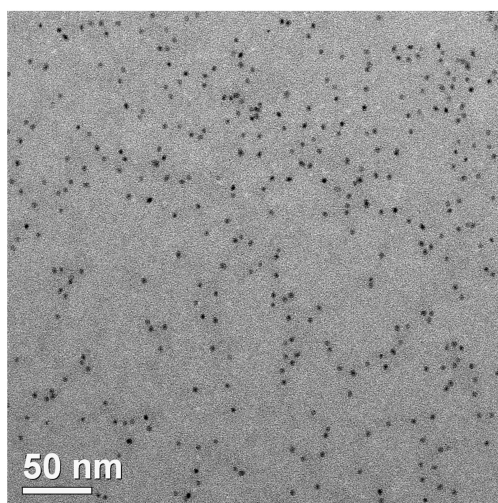


Figure III.18 – Cliché MET du film LB mixte de Pt-PMAA

Le film mixte, grâce à la présence d'acide gras, peut être transféré verticalement sur différents types de supports. Le choix des supports utilisés est guidé par le type d'analyse ou le type de mesures que nous souhaitons réaliser sur les films de Langmuir-Blodgett. Dans nos travaux, deux types de supports ont été principalement utilisés (figure III.19). D'une part, des wafers de silicium de 5 cm de diamètre ont été utilisés en particulier pour l'évaluation de l'épaisseur des dépôts par réflectivité de neutrons. D'autre part, des lames de verres ordinaires, dont les dimensions sont de 1 cm par 3 cm, ont été choisies pour les tests

électrochimiques. Ces deux types de supports sont recouverts d'un dépôt de chrome, servant de couche d'adhérence à un dépôt d'or. Ces dépôts sont réalisés par évaporation sous vide à l'aide d'un dispositif disponible au laboratoire. Les supports de verre sont ainsi munis d'un collecteur de courant en or qui nous permettra d'établir une connexion électrique de manière simple, lors des mesures électrochimiques (chapitre IV).

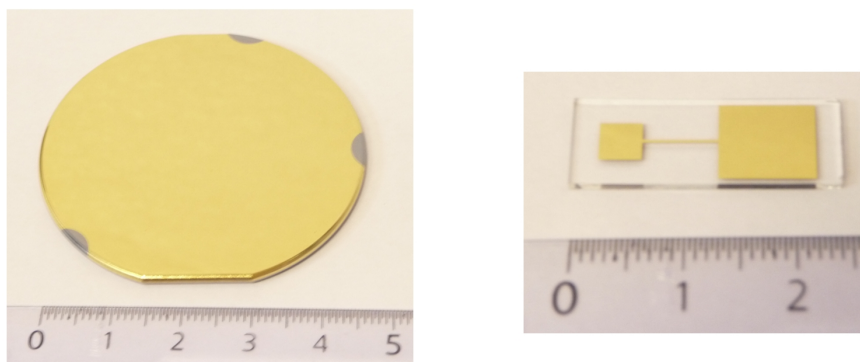


Figure III.19 – Wafer de silicium (à gauche) et lame de verre (à droite) recouverts d'or utilisés pour le transfert des films mixtes.

Avant de déposer les films, les supports sont nettoyés à l'aide d'un générateur d'ozone. Dans ces conditions, la surface d'or est hydrophile. Nous avons constaté que le dépôt du film mixte (Pt-PMAA et d'acide gras) ne s'effectue que lors de la remontée du support à travers le film. Tandis que le taux de transfert est de 100% lors de la remontée du support à travers le film, il est nul au cours de la descente. Dans le cas des films de Pt-PMAA, il n'y a donc qu'une couche transférée par aller-retour du substrat solide.

Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, il est possible de retirer *a posteriori* l'acide béhénique des films mixtes transférés, en immergeant ces derniers dans une solution d'éther pendant environ 1h. Ceci a été vérifié par une analyse infra-rouge III.20.

Sur le spectre IR du film avant retrait de l'acide béhénique présenté sur la figure III.20, nous retrouvons le pic d'absorption caractéristique d'une fonction carbonyle, situé vers 1710 cm^{-1} . Le pic très marqué à 2930 cm^{-1} correspond aux vibrations asymétriques de la liaison C-H des groupements CH_2 . L'épaule située à 2960 cm^{-1} correspond à la vibration asymétrique de la liaison C-H des groupements CH_3 . Cependant, nous retrouvons ces groupements à la fois dans le PMAA et dans l'acide béhénique et il n'est pas possible de dissocier les deux contributions. Une fois le lavage à l'éther effectué, nous observons une forte diminution des pics correspondant aux groupements CH_2 , alors que le pic caractéristique du carbonyle ne subit pas de modification importante. La majorité des groupements CH_2 se trouvant sur l'acide béhénique (20 groupements par molécule), la disparition de ce pic à 2930 cm^{-1} indique

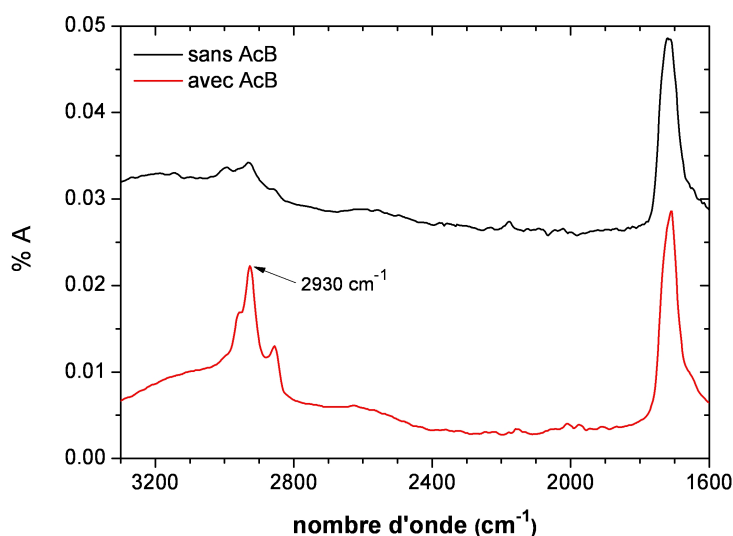


Figure III.20 – Spectres infra-rouge d'un film LB de Pt-PMAA avant et après retrait de l'acide béhénique (AcB).

donc que le lavage est efficace. Au contraire, la majorité des fonctions carbonyles se trouvent sur le polymère (un par motif unitaire, contre un seul par molécule d'acide béhénique), ce qui peut expliquer la faible modification du pic du carbonyle. Nous pouvons souligner que si l'allure de ce dernier pic reste inchangée, cela suggère que le lavage n'induit pas de perte de PMAA.

Nous avons ensuite cherché à caractériser l'épaisseur des films de Langmuir-Blodgett réalisés. Ces caractérisations sont présentées dans les paragraphes suivants.

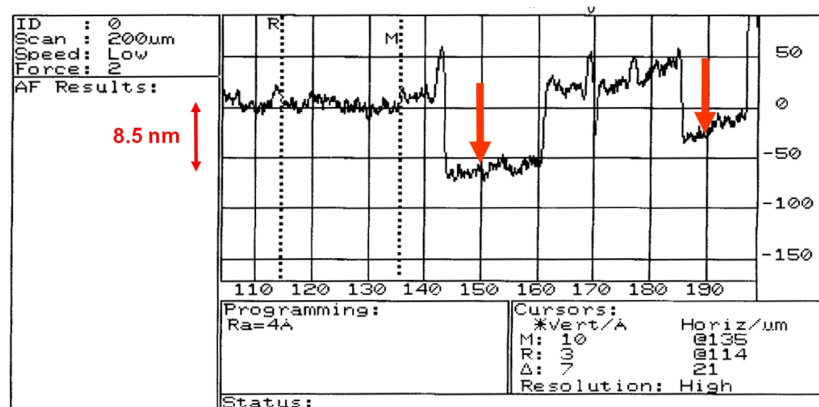
III.3.2.2 Caractérisation de l'épaisseur des films transférés par profilométrie et réflectivité de neutrons

Des mesures de profilométrie et de réflectivité de neutrons ont été réalisées pour mesurer l'épaisseur et la rugosité des films. Lors de cette dernière étude, la structure des films mixtes a été comparée à celle de films purs transférés horizontalement sur les mêmes wafers.

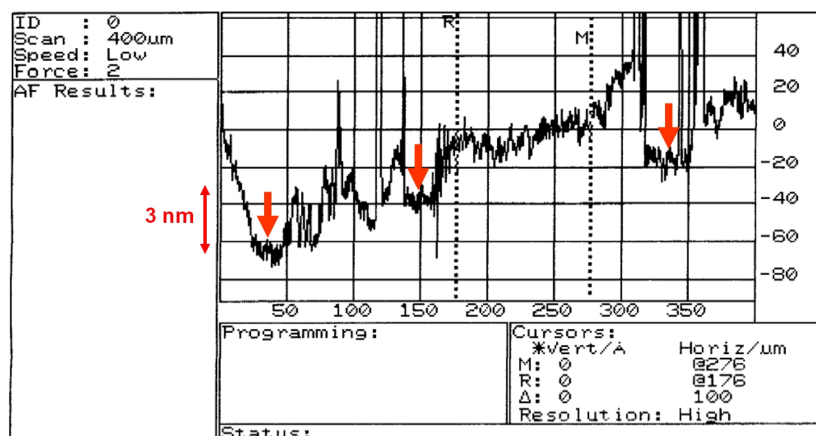
III.3.2.2.a Mesures par profilométrie

Pour évaluer dans un premier temps l'épaisseur des films obtenus, nous avons utilisé la technique de profilométrie mécanique (collaboration avec P. Viel du SPCSI). Cette technique consiste à déplacer un stylet à la surface de l'échantillon et à mesurer son déplacement vertical, révélant ainsi la topographie de sa surface. Cette technique présente une bonne sensibilité verticale mais la résolution dans le plan est faible. Cette mesure nécessite de

réaliser manuellement une rayure sur le film à l'aide d'une pointe ne rayant pas le substrat (verre ou silicium recouvert d'or). Nous avons mesuré, avec cette technique, l'épaisseur de dépôts de films mixtes de Pt-PMAA (avec acide béhénique) composés de 1 et 3 couches. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure III.21.



Film mixte Pt-PMAA 3 couches



Film mixte Pt-PMAA 1 couches

Figure III.21 – Résultats des mesures de profilométrie effectuées sur des échantillons de 1 et 3 couches de film mixte de Pt-PMAA 14.

La mesure effectuée indique que les films transférés ont, en moyenne, une épaisseur de 3 nm par couche déposée. Ceci suggère que les chaînes polymères se placent essentiellement dans le plan du film car l'épaisseur mesurée par couche, est relativement proche du diamètre de la nanoparticule de platine. Cette première estimation de l'épaisseur des films, qui s'avère toujours délicate, correspond seulement à une mesure locale. Cette mesure a donc été complétée par une étude par réflectivité de neutrons, afin de confirmer cette épaisseur par la détermination d'une valeur moyenne et également d'évaluer la rugosité du film.

III.3.2.2.b Mesures par Réflectivité de Neutrons

Des mesures de réflectivité de neutrons, dont le principe est présenté dans l'annexe C, ont été réalisées sur les échantillons de films mixtes de Pt-PMAA mais également sur les films purs (ne comportant pas d'acide gras) transférés horizontalement. Ces mesures ne peuvent pas être faites directement sur les supports de verre car ceux-ci ne sont pas intégralement couverts par le dépôt d'or. C'est pour cette raison que les transferts ont été réalisés sur des wafers de silicium recouverts d'or. Les différentes couches, présentes à la surface des wafers sont détectables par réflectivité de neutrons, comme le montrent les spectres enregistrés (III.22). Lors de la modélisation du signal, nous avons donc tenu compte de la présence d'une couche d'or ($\rho=2.87\times 10^{-10}$ cm $^{-2}$) d'environ 100 nm d'épaisseur ainsi que d'une couche de chrome ($\rho=4.4\times 10^{-10}$ cm $^{-2}$) de 10 nm, nécessaire pour que l'or adhère au silicium. Les spectres obtenus, décalés pour une meilleure lisibilité, sont présentés dans la figure III.22 .

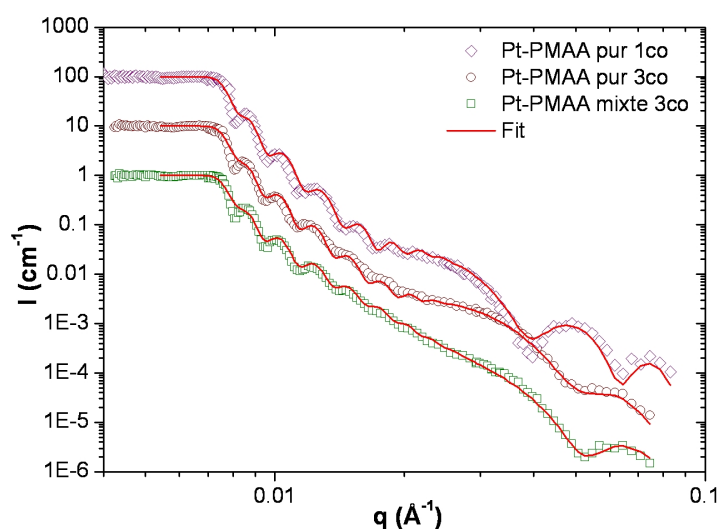


Figure III.22 – Spectres de réflectivité de neutrons des dépôts suivants : films purs de Pt-PMAA 1 couche et 3 couches ($I\times 10$), film mixte de Pt-PMAA 3 couches ($I\times 100$).

Les franges visibles sur tous les spectres autour de $q=0.01$ Å $^{-1}$ sont dues à la couche d'or et leur position dépend de l'épaisseur de cette dernière (≈ 100 nm). Les oscillations dues aux films déposés correspondent à des épaisseurs beaucoup plus réduites (< 10 nm) et apparaissent vers $q=0.06$ Å $^{-1}$. A ces oscillations viennent s'ajouter celles dues à l'épaisseur de chrome (≈ 10 nm). Pour obtenir les épaisseurs des couches de films déposés, nous avons ajusté les spectres obtenus par un profil composé d'un substrat de silicium, d'une couche de chrome d'environ 10 nm, d'une couche d'or de 100 nm et d'une dernière couche dont les caractéristiques issues de l'ajustement (épaisseurs, densité de longueur de diffusion et

rugosité) sont résumées dans le tableau III.5.

Echantillon	Nombre de couches	ρ (10^{-10} cm^{-2})	Épaisseur (nm)	Rugosité (nm)
film pur Pt-PMAA	1	1.3	3.2	0.5
film pur Pt-PMAA	3	1.3	8.9	2.0
film mixte Pt-PMAA	3	1.0	8.8	1.7

Table III.5 – Caractéristiques des films de Langmuir déposés sur des wafers recouverts d’or, déterminées par réflectivité de neutrons.

Les épaisseurs obtenues par réflectivité de neutrons sont cohérentes avec celles mesurées par profilométrie. Les films composés de 1 couche et 3 couches ont des épaisseurs qui sont respectivement de 3 et 9 nm. Nous n’observons pas de différence significative sur les épaisseurs mesurées selon la nature du film (mixte ou pur). Les rugosités mesurées sont comprises entre 0.5 et 2 nanomètres, elles augmentent avec le nombre de couches.

Dans le cas des films mixtes, l’acide béhénique a une taille d’environ 3 nm, ce qui peut expliquer l’homogénéité des épaisseurs mesurées entre les films purs et mixtes. Pour les films purs de Pt-PMAA, nous retrouvons la densité de longueur de diffusion (ρ) du polymère seul ($\rho_{PMAA}=1.3 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$), tandis que pour les films mixtes, le ρ mesuré est de $1.0 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$. Cette diminution est donc due à la présence d’acide béhénique dont le ρ est proche de 0. Dans tous les cas, l’épaisseur de 3 nm par couche est proche du diamètre du cœur de la nanoparticule de platine. Ceci tend à confirmer que les chaînes polymères s’organisent plutôt latéralement dans le plan, comme l’illustre le schéma de la figure III.23.

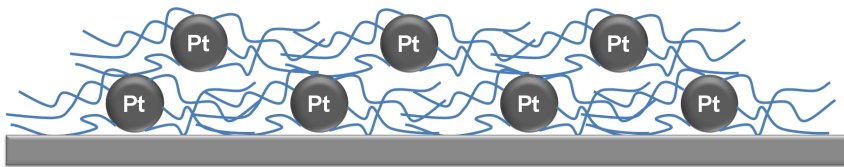


Figure III.23 – Représentation schématique du film LB à base de Pt-PMAA.

Des structures hybrides composées de nanoparticules de platine greffées de poly(acide méthacrylique) (Pt-PMAA) ont ainsi été obtenues. Dans ces structures, il est possible de faire varier l’épaisseur du film en fonction du nombre de couches et de calculer précisément la quantité d’objets déposés. Les films LB de Pt-PMAA seront utilisés pour le greffage de la GOx afin d’obtenir une première structure Pt-PMAA-GOx ultra-mince à l’état solide. Nous présentons maintenant la réalisation d’un second type de structure basé sur la réalisation de brosses polymères de PMAA formées à partir de films LB de particules amorçantes.

III.3.3 Brosses polymères à base de films LB de nanoparticules amorçantes

La stratégie mise en œuvre dans cette partie de notre travail est illustrée sur la figure III.24. Elle consiste à utiliser la technique de Langmuir pour former un film ultra-mince de nanoparticules amorçantes, sur lequel nous allons effectuer une polymérisation par ATRP de méthacrylate de tert-butyle. La brosse polymère formée sera ensuite hydrolysée pour obtenir des brosses de poly(acide méthacrylique). Après greffage de la GOx sur une telle structure *via* les fonctions carboxyliques des brosses polymères, nous serons bien en présence d'une seconde structure hybride de type Pt-PMMA-GOx en film ultra-mince.

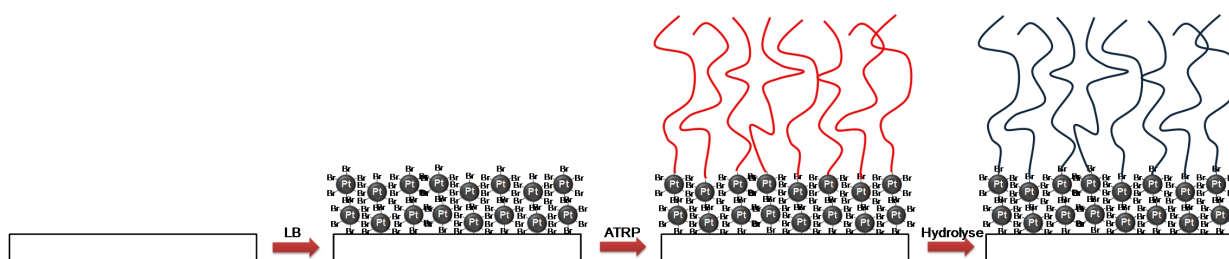


Figure III.24 – Formation d'une structure de type brosse à la surface des nanoparticules amorçantes.

III.3.3.1 Elaboration des films mixtes de nanoparticules amorçantes

Comme les films de Langmuir ne comportant que des nanoparticules de type Pt-PMMA, les films purs de nanoparticules amorçantes ne peuvent pas être transférés de manière efficace et contrôlée sur des substrats solides. Il est à nouveau nécessaire d'utiliser un film mixte. Nous avons à nouveau introduit dans la solution d'épandage une quantité d'acide béhénique correspondant à une proportion surfacique finale de 50% à l'interface air-eau. Les isothermes de compression des films purs et mixtes sont représentés dans la figure III.25.

Nous voyons que l'introduction de l'acide gras permet au film de supporter des pressions de surface beaucoup plus élevées que le film ne comportant que des nanoparticules amorçantes. A nouveau ce comportement est caractéristique des nanoparticules à enrobage moléculaire court.^{128,125} En retirant la contribution de l'acide gras dans le film, nous constatons que les surfaces par particule dans le film mixte sont pratiquement identiques à celles calculées dans le film pur, même à pression élevée. Dans le film mixte, les nanoparticules sont donc bien présentes sous forme d'une monocouche. A nouveau la pression de transfert choisie est de 28 mN/m. Contrairement aux films mixtes de Pt-PMMA qui n'étaient trans-

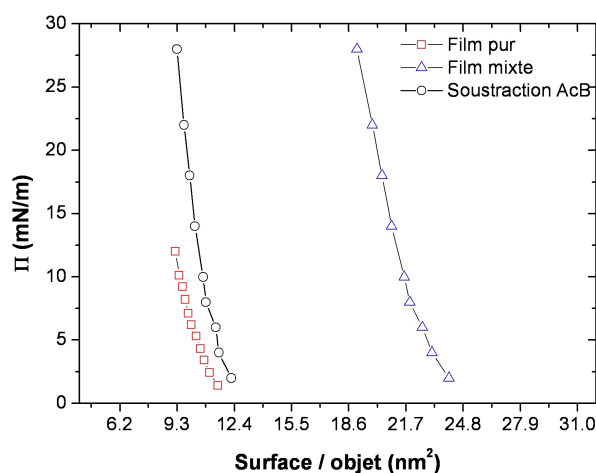


Figure III.25 – Isothermes de compression enregistrées en mode statique du film pur de nanoparticules amorçantes, du film mixte 50/50 de nanoparticules amorçantes et d'acide béhénique, et du même isotherme après soustraction de la contribution de l'acide béhénique.

férées que lors de la remontée du substrat à travers l'interface air-eau, les films mixtes de nanoparticules amorçantes sont déposés à la fois à la montée et à la descente du support, et les taux de transfert mesurés sont très proches de 100%.

Le cliché de microscopie (MET) présenté dans la figure III.26, permet de confirmer la structure des monocouches après transfert manuel sur une grille de carbone. Des zones sans nanoparticule sont observées sur le cliché, elles correspondent probablement à des domaines d'acide béhénique, même si on ne peut pas exclure que certaines de ces zones correspondent à des trous. Afin d'obtenir une structure ultra-mince qui recouvre totalement la surface du substrat, il est donc nécessaire de transférer plusieurs couches. Pour des nanoparticules possédant un enrobage de faible poids moléculaire, des études antérieures basées sur des mesures électriques et électrochimiques ont montré qu'au delà de 5 à 7 couches, il n'existe pratiquement plus de trous dans la structure ultra-mince.^{125,151,152} Nous avons donc limité à 5 le nombre de couches de nanoparticules amorçantes déposées. Comme pour les films mixtes de Pt-PMAA, nous avons ensuite retiré l'acide béhénique par immersion de l'échantillon dans l'éther. Dans ces conditions, la densité d'amorceurs à la surface du film est approximativement égale à la valeur obtenue à la surface des nanoparticules, à savoir 2.4 amorceurs/nm². C'est sur ces structures que nous avons procédé à la polymérisation visant à former la brosse de PMAAtBu.

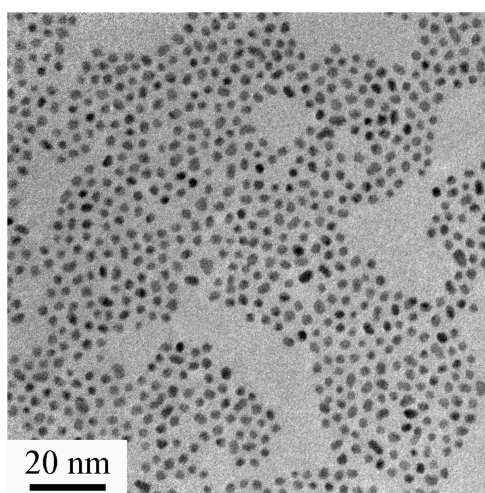


Figure III.26 – Cliché MET du film LB mixte de nanoparticules amorphes

III.3.3.2 Elaboration de la brosse de PMA_tBu à la surface du film LB de nanoparticules amorphes

III.3.3.2.a Conditions de polymérisation

La polymérisation de méthacrylate de tert-butyle (MA_tBu) par ATRP sur un support est décrite dans la littérature. Tran et coll.¹⁵³ ont par exemple polymérisé ce monomère par ATRP, à la surface de wafers sur lesquels l'amorceur avait été préalablement immobilisé par auto-assemblage. Par rapport à la polymérisation effectuée sur les nanoparticules dispersées en solution, la principale différence réside dans l'ajout obligatoire d'amorceurs libres en solution car la concentration en amorceurs greffés est trop faible pour que la polymérisation soit contrôlée. Nous avons repris les conditions de polymérisation décrites dans le travail de Tran et son équipe¹⁵³ en l'adaptant à notre système. Le métal de transition ainsi que le ligand sont les mêmes que ceux utilisés lors de la polymérisation sur les nanoparticules en solution (CuBr et PMDETA). L'amorceur utilisé en solution est l'éthyl- α -bromoisobutyrate, qui possède une structure proche de celui greffé sur les nanoparticules de platine. Les réactifs ont été introduits dans des proportions ligand/cuivre/amorceur de 6/3/1. Nous avons par contre utilisé comme solvant l'acétonitrile, qui ne solubilise pas les nanoparticules afin d'éviter que ces dernières ne se détachent du support. Il a été introduit dans des proportions correspondant à 20% du volume total afin d'abaisser la viscosité du milieu. Le monomère a été introduit dans des proportions correspondant à une masse molaire théorique de 71 000 g/mol ($DP_n=500$) pour 100% de conversion. La description détaillée du protocole utilisé est présentée en annexe A.

III.3.3.2.b Suivi cinétique de la polymérisation et détermination des masses molaires

Des prélèvements ont été effectués, à l'aide de seringues préalablement dégazées, pour suivre l'évolution du taux de conversion de la polymérisation au cours du temps (figure III.27a).

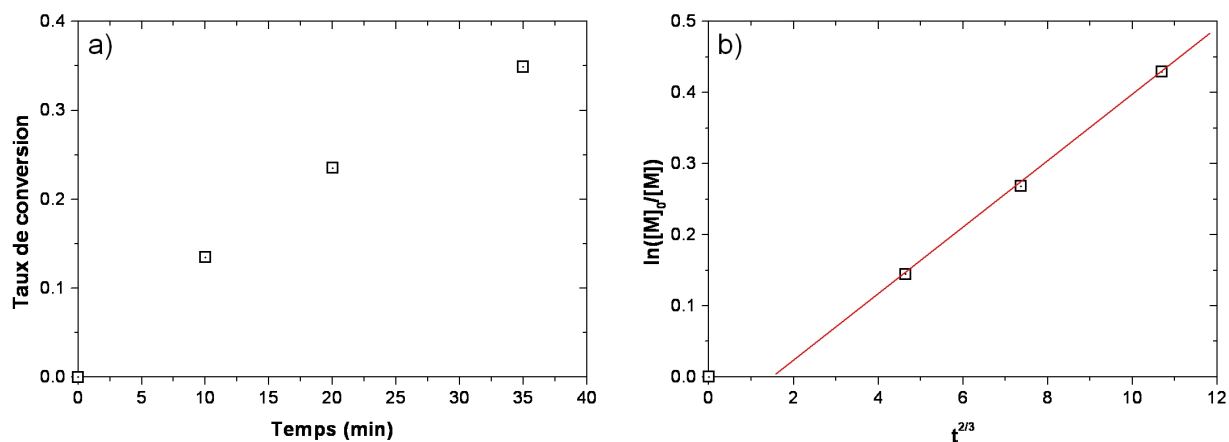


Figure III.27 – Données cinétiques de la polymérisation de la brosse 1 partir de films LB de nanoparticules amorçantes : a) taux de conversion en fonction du temps - b) contrôle de la polymérisation : $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$.

Nous voyons d'abord que le taux de conversion obtenu en fin de polymérisation (35 min) est de 34.9%. Ce taux de conversion correspond à une masse molaire théorique de 24 800 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sur la figure III.27b, $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$ est linéaire, ce qui est caractéristique d'une polymérisation contrôlée, comme nous l'avons décrit dans le chapitre II. Il faut toutefois noter qu'un léger retard est observé en début de réaction (la droite ne passe pas par l'origine). Ceci est probablement dû au temps nécessaire pour que le milieu réactionnel s'homogénéise en température et que la polymérisation commence.

La brosse n°1, dont la cinétique de polymérisation est présentée ci-dessus, a été réalisée sur un wafer de silicium recouvert d'une couche d'or. Deux autres polymérisations (2 et 3) menées dans les mêmes conditions, ont été réalisées sur des supports de verre munis d'un dépôt d'or. Dans ce cas, 8 échantillons peuvent être réalisés simultanément par synthèse.

L'avantage de l'ajout d'amorceur sacrificiel en solution est de pouvoir caractériser aisément par chromatographie d'exclusion stérique (CES) les chaînes libres formées en solution, qui ont des caractéristiques proches de celles greffées à la surface du substrat.⁸⁸ Un résumé des données obtenues est présenté dans le tableau III.6. Les masses molaires mesurées sont

légèrement supérieures à celles estimées à partir du taux de conversion ($24\ 800\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ceci est probablement dû à un léger défaut d'amorçage.

Echantillon	Support	M_n (CES) ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	M_w/M_n
Brosse 1	wafer	30 130	1.3
Brosse 2	électrodes	26 800	1.1
Brosse 3	électrodes	29 130	1.1

Table III.6 – Caractéristiques des brosses de polymères obtenues par ATRP à partir de films LB de nanoparticules amorçantes.

III.3.3.3 Caractérisation de l'épaisseur des structures brosses par AFM et réflectivité de neutrons

III.3.3.3.a Microscopie à Force Atomique (AFM)

Les structures de type brosse sont généralement étudiées par ellipsométrie afin de déterminer l'épaisseur ainsi que les densités de greffage des chaînes à la surface. Cependant, la présence d'une couche de platine hétérogène à la surface de nos supports rend cette technique inutilisable (les indices de réfraction sont très difficiles à estimer). Pour déterminer l'épaisseur des brosses polymères que nous avons synthétisées, nous avons utilisé la microscopie à force atomique (AFM) (collaboration avec P. Tran-Van de l'Institut Lavoisier, Université de Versailles-Saint Quentin). Nous avons ainsi comparé l'état de surface de nos supports avant et après polymérisation. Nous avons pu également estimer l'épaisseur de chaque structure.

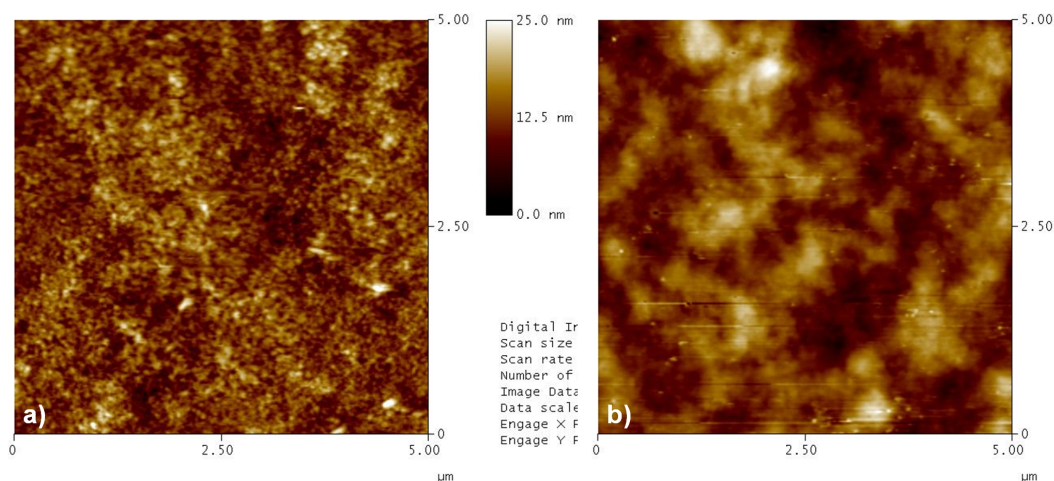


Figure III.28 – Clichés AFM des surfaces du wafer recouvert du film LB de nanoparticules amorçantes (a) et après polymérisation du MAtBu (b).

La figure III.28 montre qu'avant la polymérisation, la surface correspondant au film LB

de nanoparticules est très « piquée », typique de dépôts de nanoparticules de platine ayant un enrobage de faible poids moléculaire. Une fois la polymérisation effectuée, nous voyons que les domaines visibles ont des dimensions beaucoup plus élevées.

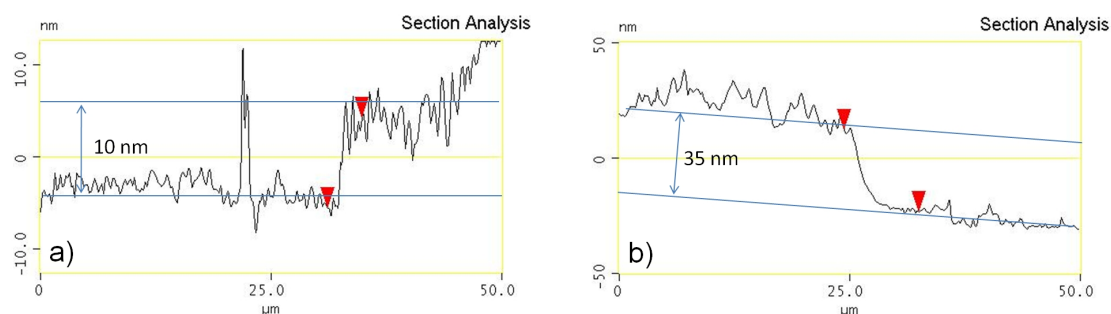


Figure III.29 – Estimation par AFM de l'épaisseur du film de nanoparticules amorçantes et de la brosse 1 de PMAAtBu.

Nous avons ensuite estimé l'épaisseur de la couche présente à la surface à partir de rayures effectuées dans le film, comme nous l'avons fait auparavant pour l'étude par profilométrie. Les profils de surface sont présentés sur la figure III.29. L'épaisseur ainsi mesurée est d'environ 10 nm pour les 5 couches de nanoparticules amorçantes et passe à 35 nm après polymérisation du méthacrylate de tert-butyle. Cela correspond donc à une épaisseur de brosse d'environ 25 nm.

III.3.3.3.b Réflectivité de neutrons

Les épaisseurs estimées par AFM sont des mesures locales, comme celles obtenues précédemment par profilométrie. Nous cherchons maintenant à obtenir une valeur moyenne de l'épaisseur de ces brosses par réflectivité de neutrons. Cette mesure a été réalisée sur la brosse élaborée sur un wafer recouvert d'une couche d'or d'environ 200 nm d'épaisseur. Comme nous l'avons vu précédemment, les franges dues à la couche d'or sont très marquées et sont présentes dans le domaine de q où la frange caractéristique d'une brosse de 25 nm doit théoriquement apparaître, ce qui gêne son observation. Pour remédier à ce problème, nous avons cherché à exalter le signal de la brosse de PMAAtBu. Dans ce but, nous avons effectué la mesure à l'interface solide-eau, ce qui nous a permis d'ajuster la densité de longueur de diffusion (ρ) du mélange H_2O/D_2O à celle de l'or. Dans ces conditions, la couche d'or est « matchée ». La couche polymère se trouve ainsi encadrée par deux couches possédant une densité de longueur de diffusion plus élevée que la sienne et permet ainsi d'exalter son signal. Un schéma du wafer recouvert de la brosse polymère ainsi que le profil de densité de longueur de diffusion correspondant, sont représentés figure III.30.

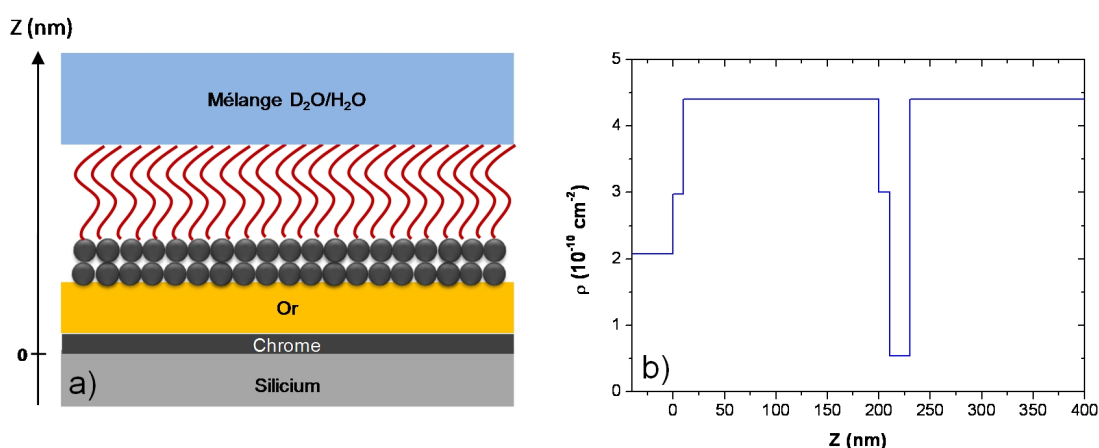


Figure III.30 – a) Schéma du wafer recouvert d’une brosse de PMAtBu basée sur un film LB de nanoparticules amorçantes et b) profil de densité de longueur de diffusion (ρ) correspondant.

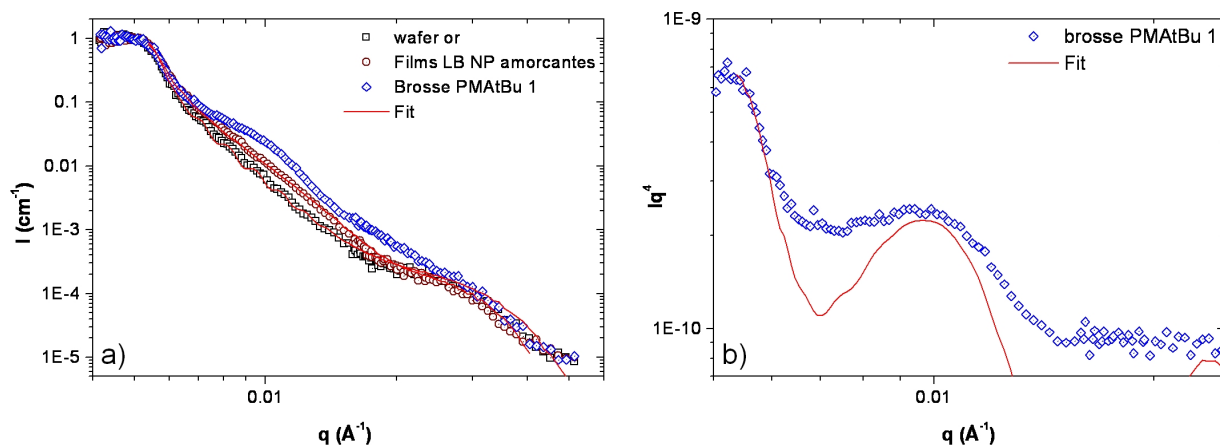


Figure III.31 – a) Spectre de réflectivité à l’interface air-liquide ($\rho_{liq}=4.4 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$) du wafer de silicium recouvert d’une couche de 200 nm d’or, du film LB composé de 5 couches de nanoparticules amorçantes et de la brosse 1 de PMAtBu. b) Représentation en Iq^4 du spectre de la brosse 1 de PMAtBu.

Les spectres obtenus sont présentés sur la figure III.31a. Nous avons tout d’abord étudié le wafer recouvert d’une couche d’or d’environ 200 nm dans ces conditions et nous voyons en effet que les franges correspondant à celle-ci sont nettement moins intenses que celles observées lors de l’étude des films LB de Pt-PMAA (figure III.22). Ce spectre a pu être ajusté avec un modèle composé d’un substrat de silicium, d’une couche de chrome de 10.7 nm et d’une couche d’or de 218 nm d’épaisseur et de 4 nm de rugosité. Nous voyons ensuite que le spectre correspondant au même wafer de silicium, sur lequel le film LB de nanoparticules amorçantes a été déposé, est situé au dessus de celui du support d’or nu. Ceci atteste de la présence d’une couche à la surface dont la densité de longueur de diffusion est inférieure à celle de l’or. Cette courbe a été ajustée en introduisant, dans le modèle précédemment

utilisé, une couche de 10 nm d'épaisseur et de 4.4 nm de rugosité ayant une densité de longueur de diffusion de $2.97 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$. Cette dernière valeur, déterminée par l'ajustement, est cohérente avec la composition de cette couche (platine et molécule hydrogénée).

Sur le dernier spectre, correspondant au système précédent après formation de la brosse de PMA_tBu, nous voyons clairement une frange correspondant à l'épaisseur de polymère présent en surface. Nous n'avons pas pu ajuster l'ensemble du spectre par un modèle simple de couches superposées tels que ceux utilisés jusqu'à présent. Il semble que l'addition des rugosités importantes des couches successivement formées (suggérée par les mesures AFM), soit à l'origine de cette difficulté. Nous nous sommes contentés d'un ajustement de la position et de l'intensité du maximum de l'oscillation caractéristique de la brosse. Cette position est en effet directement reliée à l'épaisseur de la brosse. Pour que cette détermination soit la plus précise possible, le spectre a été représenté en Iq^4 en fonction de q (représentation de Fresnel) (figure III.31b) qui permet de mettre en évidence plus nettement cette oscillation. L'ajustement de cette oscillation correspond à une épaisseur d'environ 35 nm et une rugosité de 4 nm pour cette brosse de PMA_tBu. A partir de cette épaisseur, il est possible d'estimer approximativement la densité de greffage des chaînes polymères sur le support. Le PMA_tBu étant hydrophobe, la brosse ne gonfle pas en présence d'eau. En considérant que les couches de nanoparticules forment une couche plane, l'épaisseur de la brosse est reliée à la densité de greffage par la relation suivante :

$$\sigma = \frac{\gamma \times N_A \times d}{M_n} \quad (\text{III.6})$$

Avec σ , la densité de greffage des chaînes polymères de masse molaire M_n , d la densité du polymère (1.022 g/cm^{-3}), γ l'épaisseur de la brosse et N_A le nombre d'Avogadro.

Les résultats obtenus sur la brosse 1 sont résumés dans le tableau suivant.

Echantillon	M_n ($g.mol^{-1}$)	Epaisseur γ (nm)	densité σ ($cha\^{\hat{e}}ne/nm^2$)
Brosse 1	30 130	35	0.7

Table III.7 – Caractéristiques de la brosse 1 obtenues par réflectivité de neutrons.

Les densités de greffage ainsi estimées sont de l'ordre de $0.7 \text{ cha\^{\hat{e}}ne/nm}^2$, valeur proche des densités de greffage obtenues sur les nanoparticules en solution. Bien qu'indicative, cette valeur de densité de greffage sera ultérieurement utilisée pour estimer les épaisseurs des brosses polymères synthétisées sur les supports constitués de lames de verre munies du collecteur de courant en or (qui ne peuvent pas être étudiées par réflectivité de neutrons).

III.3.3.4 Hydrolyse des brosses de PMAAtBu

Pour étudier l'avancement de la réaction d'hydrolyse sur les brosses, nous avons utilisé la spectroscopie infra-rouge. Tran et coll.¹⁵³ ont montré qu'il était possible de suivre cette réaction avec précision en étudiant l'évolution des pics caractéristiques des groupements CH_2 et CH_3 situés entre 2800 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} . Théoriquement, la disparition du pic situé à 2980 cm^{-1} , correspondant à la vibration antisymétrique des liaisons C-H des CH_3 du groupement tert-butyle, traduit l'avancement de l'hydrolyse. La vibration du groupement CH_3 du squelette polymère apparaît théoriquement à 2960 cm^{-1} , mais il n'est pas discernable dans le spectre du PMAAtBu à cause de l'absorbance dominante des méthyles du groupe pendent. Un épaulement est parfois visible une fois l'hydrolyse effectuée. Les pics situés à 2930 cm^{-1} et 2860 cm^{-1} sont associés aux groupes CH_2 du motif unitaire et ne doivent, en principe, pas évoluer lors de l'hydrolyse.

Les expériences d'hydrolyse des brosses de PMAAtBu ont tout d'abord été menées dans les mêmes conditions que l'hydrolyse des nanoparticules dispersées en solution (chloroforme contenant 10% d'acide trifluoroacétique). Cependant, pour des raisons encore incomprises, nous avons constaté la formation de trous dans la couche d'or sur laquelle les films ont été déposés. Nous avons donc testé par la suite différents solvants, tout en gardant un pourcentage volumique de 10% en acide trifluoroacétique. Les spectres infra-rouge correspondant au suivi de l'hydrolyse sont présentés sur la figure III.32.

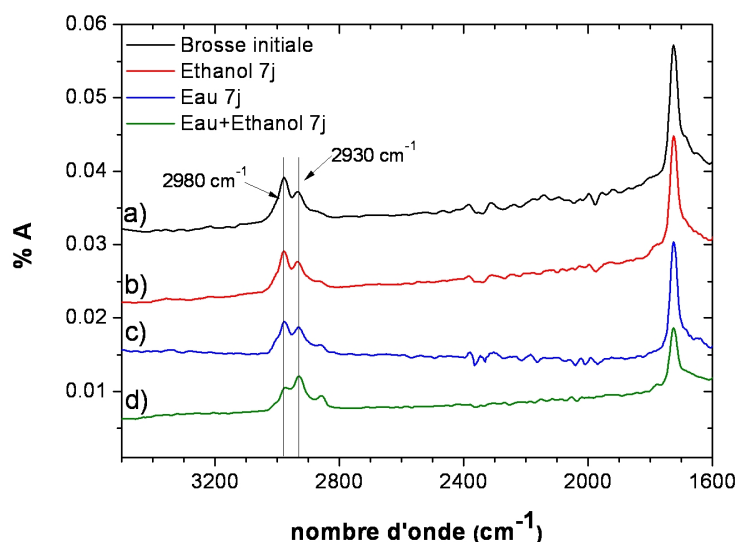


Figure III.32 – a) Spectres infra-rouge de la brosse de Pt-PMAAtBu initiale et des brosses obtenues après hydrolyse dans différents solvants contenant 10% d'acide trifluoroacétique : b) éthanol, c) eau et d) mélange éthanol/eau.

Nous avons ainsi tout d'abord tenté de réaliser l'hydrolyse dans une solution aqueuse. Cependant, comme nous pouvons le voir sur le spectre b), l'intensité des pics caractéristiques du CH₃ n'évolue que faiblement par rapport à la brosse initiale (spectre a). La réaction est très lente. Nous avons émis l'hypothèse que le mouillage de la brosse de PMAAtBu n'était peut-être pas suffisant pour que la réaction d'hydrolyse soit suffisamment rapide et efficace (des signes tangibles d'hydrolyse ne sont observés qu'après plus d'un mois de réaction). Nous avons alors réalisé l'hydrolyse dans l'éthanol, qui permet une meilleure mouillabilité de la brosse. Cependant le spectre c) montre que l'hydrolyse reste toujours aussi limitée.

Nous avons finalement testé l'hydrolyse de la brosse de PMAAtBu dans un mélange eau-éthanol, pour lequel des signes clairs d'hydrolyse apparaissent à partir de 12h. Nous voyons sur le spectre d) que les pics dus aux CH₃ des groupements tert-butyle diminuent, attestant cette fois d'une hydrolyse plus importante du polymère. C'est donc cette dernière voie que nous avons utilisée. Cependant, le pic situé à 2980 cm⁻¹, n'a pas entièrement disparu, ce qui montre que l'hydrolyse n'est pas totale. Le pic du groupement carbonyle ne subit pas non plus de déplacement notable suite à la réaction d'hydrolyse, contrairement à ce que nous avons vu sur les objets en solution. Ceci peut être dû au fait que l'hydrolyse n'est que partielle. Toutefois, pour les brosses après hydrolyse, les échantillons conservent sur leur surface une couche d'eau lorsqu'ils y ont été immergés puis retirés. La surface de ces structures est donc hydrophile ce qui est cohérent avec la présence de groupements COOH.

En supposant que la densité de greffage des chaînes ne varie pas lors de l'hydrolyse, nous pouvons utiliser l'équation III.7 pour avoir une estimation de l'épaisseur des différentes brosses après hydrolyse.

$$\gamma = \frac{\sigma \times M_n}{N_A \times d} \quad (\text{III.7})$$

L'épaisseur a été calculée en prenant cette fois la densité du PMAA à 1.18 g/cm³ (tableau III.8). Rappelons que ce calcul reste indicatif car il suppose que l'hydrolyse des brosses est totale.

Echantillon	M _n (g.mol ⁻¹)	γ estimée	γ estimée
		avant hydrolyse (nm)	après hydrolyse (nm)
Brosse 1	30 130	35	18
Brosse 2	26 800	31	16
Brosse 3	29 130	34	18

Table III.8 – Estimations des épaisseurs des brosses sèches avant et après hydrolyse à partir d'une densité de greffage de 0.7 chaîne/nm².

Les brosses de PMAA ont donc une épaisseur estimée entre 16.4 et 18.4 nm à l'état

sec, mais elles vont légèrement gonfler lorsqu'elles seront immergées en solution aqueuse. Cette épaisseur aurait pu être déterminée par réflectivité de neutrons, mais nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier ce type d'échantillon avec cette technique. Ainsi, nous disposons de deux structures ultra-minces, les films LB de nanoparticules de type Pt-PMAA et les structures de type brosse de PMAA. Nous pouvons alors envisager le greffage de la GOx sur ces structures, de manière à réaliser les structures hybrides Pt-PMAA-GOx. C'est ce que nous abordons dans les paragraphes suivants.

III.3.4 Structures hybrides Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince

Dans cette partie, nous décrivons non seulement le greffage de l'enzyme GOx sur les deux structures en film mince de type Pt-PMAA (films LB et brosses), mais également la détermination de la quantité d'enzymes actives ainsi immobilisées.

III.3.4.1 Conditions de greffage de la GOx

La stratégie utilisée dans ce cas est similaire à celle utilisée en solution. Nous avons dans un premier temps utilisé EDC et NHS pour activer les fonctions COOH présentes dans les deux structures. Contrairement aux expériences d'activation des nanoparticules de type Pt-PMAA en solution, nous n'avons pas cherché ici à tester différents rapports entre les fonctions COOH et les quantités de NHS et d'EDC utilisées. En effet, les problèmes de solubilité des nanoparticules activées, rencontrés pour les greffages en solution, ne se posent pas dans le cas des structures en film mince. Nous avons donc travaillé en large excès de NHS et EDC. Les échantillons ont ainsi été immergés 2 heures, sous légère agitation, dans une solution à $2 \cdot 10^{-3}$ mol/L d'EDC et 10^{-3} mol/L de NHS (rapport le plus utilisé dans la littérature). Les électrodes sont ensuite rincées à l'eau, et immergées dans une solution de tampon phosphate (PBS, pH 7.4) contenant 5 mg/ml de GOx pendant une nuit à 4 °C. Les électrodes sont ensuite à nouveau rincées abondamment avec une solution de PBS afin d'éliminer les enzymes qui seraient adsorbées en surface et sont conservées dans ce milieu à 4 °C.

III.3.4.2 Mesure de l'activité enzymatique des systèmes Pt-PMAA-GOx en film ultra-mince

Le principe des mesures d'activité rapportées ici est le même que celui utilisé pour les structures hybrides Pt-PMAA-GOx synthétisées en solution. Pour mesurer l'activité enzymatique de nos structures à l'état solide et en déduire la quantité d'enzymes greffées et actives, les échantillons ont été directement introduits dans une cuve en quartz pour réaliser

les mesures de spectroscopie UV-visible. A nouveau, nous avons réalisé des courbes de calibration de la vitesse enzymatique (V_{max}) des lots d'enzymes utilisés, en fonction de la masse de GOx. En reportant les vitesses de catalyse enzymatique enregistrées pour les structures en film mince sur les droites de calibration nous avons pu déterminer la masse d'enzymes actives immobilisées sur les différents échantillons.

III.3.4.3 Mesure de l'activité enzymatique initiale des lots de GOx utilisés

Précisons que les greffages de la glucose oxydase sur les deux types de structures n'ont pas été effectués simultanément. Nous avons dû utiliser deux lots de GOx différents qui présentaient des activités différentes (III.33) .

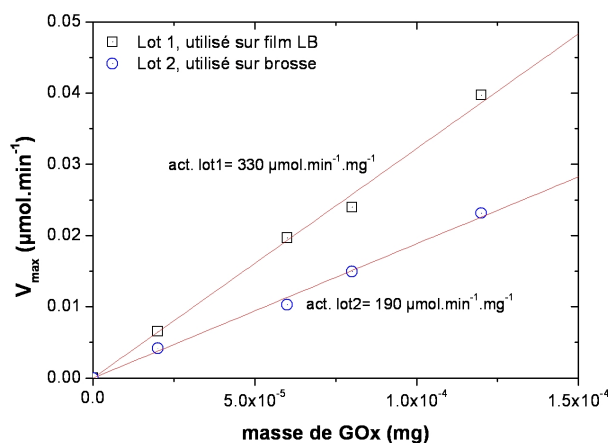


Figure III.33 – Etalonnage de V_{max} en fonction de la masse de GOx pour le lot 1, utilisé pour la structure à base de film LB de Pt-PMAA et pour le lot 2 utilisé pour la structure de type brosse polymère.

L'activité du lot de GOx utilisé sur la structure à base de film LB est ainsi presque deux fois supérieure à celle mesurée pour le lot de GOx utilisé lors de greffage de l'enzyme sur les brosses ($330 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ contre $190 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Ces valeurs ont ensuite été utilisées pour déterminer la quantité d'enzymes présentes dans chaque structure.

III.3.4.4 Mesure de l'activité enzymatique des structures en film ultra-mince

Pour la structure 2D à base de film LB de Pt-PMAA, nous avons réalisé la mesure d'activité enzymatique pour deux électrodes différentes. Pour la structure de type brosse, cette mesure a été effectuée sur quatre échantillons. Les valeurs de vitesse enzymatique V_{max} déterminées dans chaque cas, ainsi que les masses d'enzymes actives correspondantes introduites sur chaque électrode, sont résumées dans le tableau III.9.

Les deux échantillons à base de film LB de type Pt-PMAA testés ont une activité enzymatique correspondant respectivement à 16.8 et 15.5 ng d'enzymes actives. Ces masses

Echantillon	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	masse de GOx (ng)
Film LB-a	0.0060	16.8
Film LB-b	0.0053	15.5
Brosse-a	0.0121	64.5
Brosse-b	0.0116	61.9
Brosse-c	0.0144	76.6
Brosse-d	0.0113	59.7

Table III.9 – Résumé des concentrations en GOx actives déterminées sur les structures en film mince.

correspondent à une quantité de GOx actives de l'ordre de 0.10 picomole.

L'activité enzymatique de la structure de type brosse, mesurée sur 4 échantillons, correspond elle à une quantité d'enzymes moyenne de 65.7 ng, les différences observées d'un échantillon à l'autre sont relativement faibles (tableau III.9). Cette valeur moyenne correspond à environ à 0.4 picomole de GOx active.

Si l'on compare maintenant les deux structures, nous constatons que la quantité d'enzymes greffées actives sur les brosses est environ 4 fois plus importante que sur les films LB de Pt-PMAA. Des considérations d'ordre structural peuvent expliquer ces différences (figure III.34). Dans le cas de la structure brosse, la mobilité plus prononcée des chaînes polymères permet probablement une meilleure accessibilité des fonctions amines de l'enzyme aux fonctions esters activés. Au contraire, pour les structures formées de films LB de Pt-PMAA, l'organisation latérale des chaînes réduirait l'accessibilité de l'enzyme aux fonctions réactives du film LB.

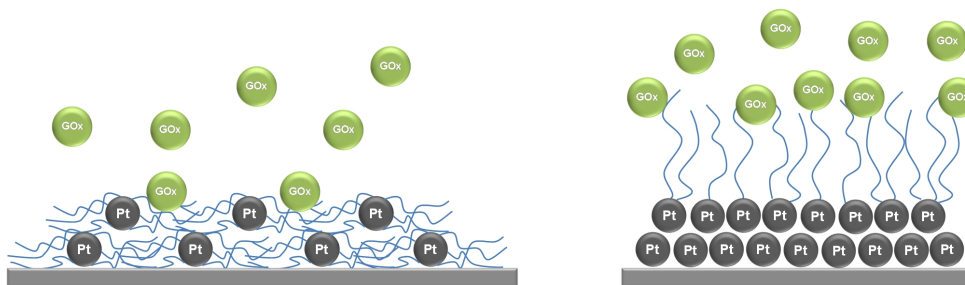


Figure III.34 – Représentation schématique du greffage de la GOx sur les 2 types de structure en film mince : film LB de Pt-PMAA (à gauche) et brosse de PMAA sur film LB de nanoparticules amorçantes (à droite).

III.4 Conclusion

De nombreux résultats ont été obtenus à l'issue des études rapportées dans ce chapitre, dont l'objectif central visait à l'élaboration de structures hybrides Pt-PMAA-GOx selon deux approches principales.

La première approche consistait à réaliser une structure hybride en solution et passait par l'hydrolyse des briques élémentaires de type Pt-MAtBu afin d'introduire des fonctions acides carboxyliques dans la couronne polymère. Cette étape a été menée avec succès et nous avons montré que nous pouvions réaliser des briques de type Pt-PMAA en solution à l'issue d'une hydrolyse des chaînes quasiment complète.

Nous avons ensuite déterminé des conditions d'activation des fonctions acides préservant la stabilité des solutions de nanoparticules pour ensuite réaliser le greffage de la GOx sur ces systèmes en solution. Bien que la DNPA n'ait pas permis la détermination précise de la structure du système hybride Pt-PMAA-GOx formé, les spectres obtenus suggèrent la formation d'objets plus gros, se différenciant clairement des objets mélangés non greffés (Pt-PMAA + enzymes). Ceci atteste du greffage de l'enzyme mais n'exclut pas la possibilité d'une agrégation des particules greffées d'enzymes. Il faut noter que cette agrégation, si elle existe, est limitée car les solutions restent stables et limpides.

Nous avons ensuite établi un protocole permettant de séparer les enzymes non greffées de celles ayant réagi avec la couronne polymère. De cette manière, nous avons pu mesurer que les enzymes associées aux nanoparticules conservent une activité catalytique vis-à-vis de l'oxydation du glucose et nous avons évalué un nombre moyen de 0.7 enzyme (dont 50% sont actives) par nanoparticule.

A l'issue de ces différentes étapes, nous avons obtenu un système redispersable en solution et donc facilement manipulable dont nous connaissons précisément à la fois la concentration en enzymes actives et en nanoparticules de Pt-PMAA.

La seconde approche développée dans ce chapitre visait à réaliser des structures hybrides Pt-PMAA-GOx à l'état solide et en film ultra-mince. Nous avons pour cela utilisé la technique de Langmuir-Blodgett. En plus de la réalisation des films LB, l'étude des films de Langmuir à l'interface air-eau (isothermes de compression) sur les différents types de briques Pt-polymères synthétisées dans ce travail, nous a permis d'approfondir la caractérisation de celles-ci. Nous avons en particulier observé des modifications des surfaces par objet selon le type d'enrobage polymère.

Deux types de structures hybrides Pt-PMAA-GOx en film mince ont été finalement réalisés et caractérisés. La première est basée sur les films LB de particules de type Pt-PMAA

et la seconde, sur des structures de type brosses polymères formées à partir des films LB de particules amorçantes. Dans cette seconde structure, l'étape d'hydrolyse des brosses de Pt-MAtBu a été plus difficile et reste probablement incomplète. Malgré cela, nous avons pu procéder sur les deux types de systèmes, au greffage de la GOx et la quantité d'enzymes actives présentes sur chaque structure a pu être évaluée. Nous avons ainsi observé que finalement, la structure de type brosse permet d'immobiliser une quantité plus importante d'enzymes, malgré l'hydrolyse incomplète.

A l'issue de toutes ces études nous disposons donc de nanostructures hybrides Pt-PMAA-GOx présentant des caractéristiques différentes dans lesquelles une partie des enzymes ont conservé leur activité catalytique. Nous avons donc ensuite abordé dans le cadre de ce travail la caractérisation électrochimique de ces systèmes, afin de tenter de montrer l'intérêt potentiel qu'ils pouvaient constituer, en temps que structures modèles, pour la détection du glucose. Néanmoins, il était nécessaire de caractériser les films ultra-minces précurseurs des structures hybrides vis-à-vis de la sonde électrochimique H_2O_2 . Ces études sont présentées dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

CHAPITRE IV

Chapitre IV

Etude des propriétés électrochimiques des structures hybrides Pt-PMAA-GOx

Contents

IV.1 Introduction	153
IV.2 Conditions et mesures électrochimiques	155
IV.2.1 Dispositif expérimental et types de mesure	155
IV.2.2 Sondes redox utilisées	156
IV.3 Etude préliminaire du comportement électrochimique des films précurseurs sans GOx	157
IV.3.1 Comportement de la structure à base de films LB de Pt-PMAA	157
IV.3.1.1 Etude du transport électronique au sein de la structure avec FcMeOH	158
IV.3.1.2 Comportement de la structure à base de film LB de Pt- PMAA vis-à-vis de H ₂ O ₂	159
IV.3.2 Comportement de la structure de type brosse PMAA vis-à-vis de H ₂ O ₂	165
IV.3.2.1 Etude préliminaire de films LB de nanoparticules amor- çantes vis-à-vis de H ₂ O ₂	165
IV.3.2.2 Etude du comportement des brosses de PMAA vis-à-vis de H ₂ O ₂	168
IV.4 Etude des nanostructures hybrides Pt-PMAA-GOx en confi- guration biocapteur	169
IV.4.1 Etude de la structure à base de films LB de Pt-PMAA en confi- guration biocapteur	170
IV.4.1.1 Etude de la sensibilité de la structure vis-à-vis du glucose à 0.5V/ECS	170
IV.4.1.2 Etude de la sensibilité en fonction du potentiel	173
IV.4.2 Etude de la structure de type brosse en configuration biocapteur	174
IV.4.3 Etude des structures hybrides obtenues en solution en configuration biocapteur	175

*CHAPITRE IV. ETUDE DES PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DES
STRUCTURES HYBRIDES PT-PMAA-GOX*

IV.4.3.1	Influence de la quantité de matière déposée	176
IV.4.3.2	Influence des sous-couches de nanoparticules	177
IV.5	Conclusion	179

IV.1 Introduction

Lors des travaux présentés dans le chapitre précédent, nous avons élaboré et caractérisé plusieurs nano-structures hybrides platine-polymère-GOx dans lesquelles nous avons montré que l'enzyme conservait ses propriétés catalytiques. Les structures obtenues peuvent être utilisées comme biocapteurs électrochimiques ampérométriques car elles possèdent à la fois des récepteurs (glucose oxydase), qui vont permettre la reconnaissance spécifique du glucose, et des nanoparticules de platine, qui servent ici de transducteur en convertissant l'information chimique (production de H_2O_2) en courant électrique. Dans de tels systèmes, le comportement électrochimique global de la structure est lié à différents phénomènes se produisant à l'échelle nanométrique.

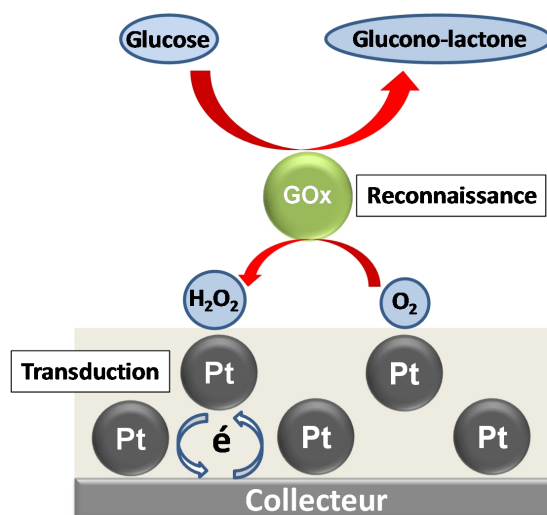


Figure IV.1 – schéma global de la détection électrochimique du glucose.

Les différentes étapes qui ont lieu lors du processus global de détection sont schématisées sur la figure IV.1. La première correspond à la diffusion du substrat (glucose) jusqu'à l'enzyme (GOx). La seconde étape est la reconnaissance du substrat par l'enzyme qui émet alors une information de nature chimique (flux de H_2O_2). Pour que cette information chimique soit convertie en courant électrique, la molécule (H_2O_2) doit diffuser de l'enzyme jusqu'au transducteur (platine). Enfin, à tous ces phénomènes, s'ajoute le transport d'électrons entre le collecteur de courant en or et les nanoparticules de platine. Chacun de ces phénomènes va être influencé par la composition et la nanostructuration du système, qui fournit une réponse électrochimique globale.

Les différentes structures hybrides que nous avons réalisées sont schématisées sur la figure

IV.2. Nous voyons que les systèmes hybrides formés ont des compositions et des structures différentes.

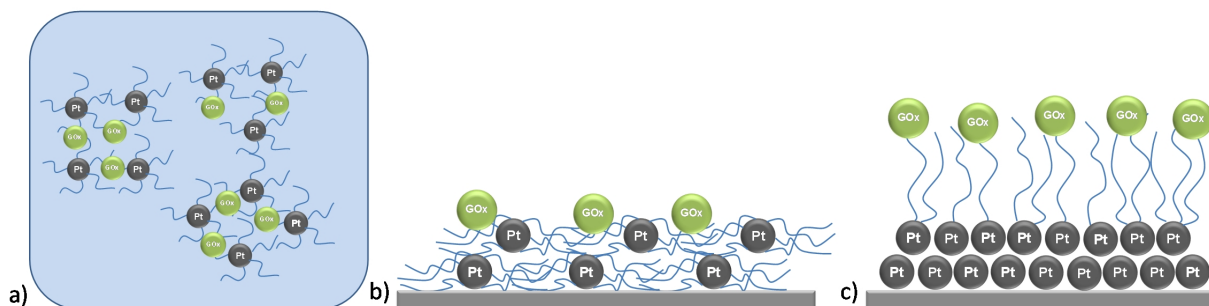


Figure IV.2 – Représentation schématique des structures hybrides Pt-PMAA-GOx élaborées : a) structure hybride en solution, b) structure hybride en film-mince à base de films LB de Pt-PMAA et c) structure hybride en film-mince de type brosse PMAA à base de film LB de nanoparticules amorçantes.

A partir de la structure hybride formée en solution, il va être possible de réaliser des dépôts sur des supports (après simple évaporation) en connaissant précisément les quantités d'enzymes et de platine engagées. Les deux structures à l'état solide ont directement été élaborées sur des supports de verre munis d'un collecteur afin de pouvoir caractériser leurs propriétés électrochimiques. Elles présentent des différences importantes notamment au niveau de leur composition (quantité de platine, quantité d'enzymes actives) et de l'organisation de ces éléments dans la structure. Il va donc être intéressant d'étudier ces différents systèmes afin de tenter de comprendre quels sont les facteurs déterminants pour la réponse électrochimique globale des systèmes hybrides élaborés, lors de la détection du glucose.

Afin de dissocier l'influence des différences étapes décrites précédemment (transfert de matière, transfert de charge, détection), nous avons séparé cette étude en deux parties. Dans la première nous avons tout d'abord étudié le comportement des structures hybrides en films minces dans une configuration de type capteur à H_2O_2 . Cette étude a donc été effectuée sur les structures en films minces avant greffage de l'enzyme. L'objectif est ici de vérifier que ces structures sont sensibles à H_2O_2 et de déterminer les conditions optimales pour la détection de cette molécule. Dans un second temps, nous avons étudié les différentes nano-structures incorporant la GOx, dans une configuration de type biocapteur à glucose. L'objectif de ce travail était de vérifier tout d'abord si il était possible de détecter un courant traduisant l'activité enzymatique de nos systèmes hybrides et de comparer les sensibilités des différents systèmes en fonction de leur composition et de leurs caractéristiques structurales.

IV.2 Conditions et mesures électrochimiques

IV.2.1 Dispositif expérimental et types de mesure

Pour réaliser les différentes mesures électrochimiques, nous avons utilisé une cellule à trois électrodes schématisée dans la figure IV.3.

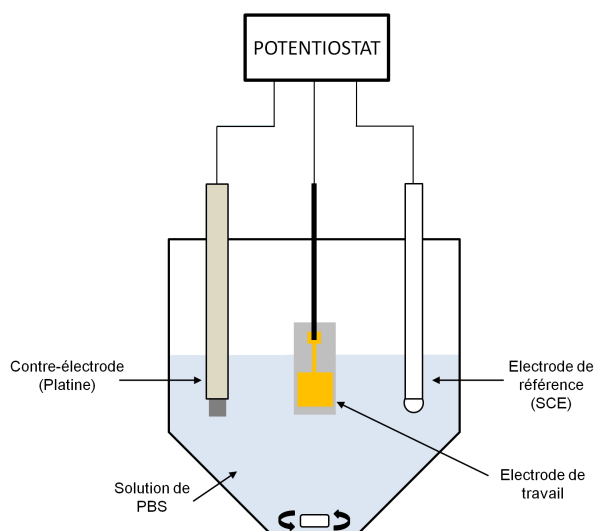


Figure IV.3 – Représentation schématique de la cellule électrochimique utilisée.

Cette cellule est composée des éléments suivants :

- une électrode de travail : lame de verre recouverte d'or sur laquelle nous avons élaboré les différentes structures hybrides présentées dans le chapitre III.
- Une électrode de référence : électrode au calomel saturé (ECS) au sodium, qui est séparée du compartiment de l'électrode de travail par une garde. Les potentiels sont donc donnés ici en prenant pour référence l'ECS ($0 \text{ V/ECS} = +0.248 \text{ V/ENH}$).
- Une contre-électrode en platine.

La cellule est également munie d'un agitateur permettant d'homogénéiser la solution d'électrolyte. Ce dernier est constitué d'un volume de 25 mL d'une solution aqueuse de tampon phosphate (PBS, pH 7.4). Avant chaque expérience, les différents éléments de la cellule sont nettoyés avec de l'eau MilliQ.

Les électrodes présentes dans la cellule sont connectées à un potentiostat (VMP3-biologic) qui permet de mettre en œuvre différentes techniques de caractérisation électrochimique. Dans le cadre de cette étude, nous avons effectué des mesures de voltampérométrie

cyclique et de chronoampérométrie. Ces deux techniques correspondent à la mesure de l'intensité du courant respectivement à potentiel variable (figure IV.4a) et à potentiel fixe (figure IV.4b). La chronoampérométrie permet par exemple d'étudier l'effet d'ajout de H_2O_2 ou de glucose sur le courant mesuré.

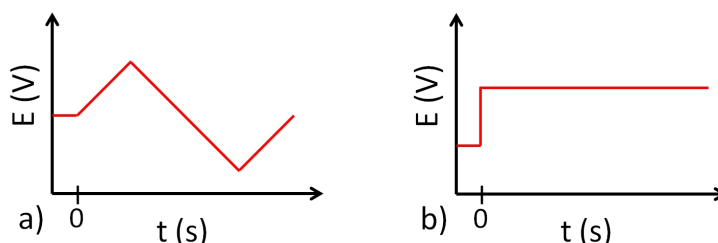


Figure IV.4 – Représentation des potentiels imposés dans une mesure de voltampérométrie cyclique (a) et de chronoampérométrie (b).

IV.2.2 Sondes redox utilisées

Lors des mesures effectuées en configuration biocapteur sur les structures Pt-PMAA-GOx, l'espèce qui sera ajoutée au milieu électrolyte sera le glucose. Mais comme nous l'avons déjà mentionné, sa détection se fait par l'intermédiaire de H_2O_2 . Il était donc indispensable de mener l'étude préliminaire de la réponse électrochimique des structures en film minces dépourvue de GOx directement vis-à-vis de H_2O_2 . Cette sonde peut-être soit oxydée, soit réduite selon les équation rapportées ci-dessous (équations IV.1 et IV.2).



Les potentiels standards des 2 couples concernés sont les suivants : $E_{O_2/H_2O_2}^\circ = +0.68$ V/NHE et $E_{H_2O_2/H_2O}^\circ = +1.77$ V/NHE.

Ces réactions, correspondant à des mécanismes complexes, se produisent en plusieurs étapes dont la description n'est pas abordée ici. Ce sont des réactions lentes qui nécessitent l'utilisation de catalyseurs (le platine dans notre cas). Le processus réactionnel implique ainsi une étape d'adsorption sur les sites actifs du catalyseur. Comme évoqué dans le paragraphe I.3.2.1 (chapitre I), le catalyseur permet d'observer les réactions redox à des potentiels limitant la dégradation des enzymes et les phénomènes d'interférences. Les études préliminaires vis-à-vis de H_2O_2 vont nous permettre de vérifier que des sites actifs restent accessibles au niveau des nanoparticules de platine greffées de polymère, et que sa diffusion est possible jusqu'à ceux-ci. Cependant, aucun courant ne pourra être mesuré si les électrons ne peuvent

être transportés entre les sites catalytiques et le collecteur de courant. Dans les systèmes Pt-Polymère-GOx formés à l'état solide, les électrons doivent ainsi pouvoir être transportés de nanoparticule en nanoparticule, à travers les films LB. Plusieurs études précédentes ont montré que les films LB constitués de nanoparticules possédant un enrobage de faible poids moléculaire, sont capables d'assurer ce transport électronique.¹²⁶ En revanche aucune mesure n'a été effectuée sur des structures à base de nanoparticules greffées de polymères telles que les nanoparticules Pt-PMAA. Nous avons donc vérifié l'aptitude de ces structures au transport d'électrons en réalisant des mesures électrochimiques à l'aide d'une sonde redox, le ferrocène méthanol (FcMeOH).

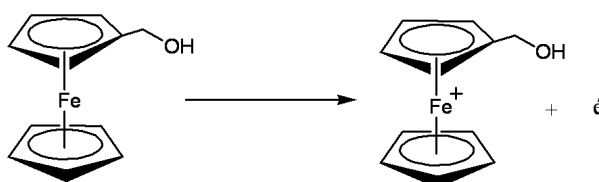


Figure IV.5 – Réaction de réduction du ferrocène méthanol.

Avec cette sonde redox ($E_{FcMeOH/FcMeOH^+}^{\circ} = +0.2 \text{ V/ECS}$), le transfert électronique est rapide. En effet son oxydation et sa réduction ne comportent pas d'étape d'adsorption. Le mécanisme réactionnel se résume à une seule étape d'échange d'électron (figure IV.5) Si le film LB de Pt-PMAA est capable de transporter des électrons, l'oxydo-réduction du ferrocène méthanol doit être effective avec ce type d'électrode.

IV.3 Etude préliminaire du comportement électrochimique des films précurseurs sans GOx

IV.3.1 Comportement de la structure à base de films LB de Pt-PMAA

La structure hybride à base de films LB de Pt-PMAA est celle qui a été la plus étudiée car il est possible de faire varier simplement plusieurs paramètres (nombres de couches, présence d'acide béhénique). Le comportement électrochimique de cette structure a, dans un premier temps, été étudié directement vis-à-vis du ferrocène méthanol afin d'observer l'effet des différents paramètres précédemment cités sur le transport électronique dans cette structure. Nous aborderons ensuite le comportement électrochimique de cette structure vis-à-vis de H_2O_2 .

IV.3.1.1 Etude du transport électronique au sein de la structure avec FcMeOH

Les mesures électrochimiques ont été effectuées dans une solution de PBS (concentration de 10^{-3} mol/L de ferrocène méthanol) entre -0.2V et 0.5V/ECS.

Dans un premier temps, nous avons enregistré la réponse du FcMeOH sur un support muni d'un collecteur d'or nu. Le voltampérogramme obtenu est caractéristique d'une réaction de transfert électronique hétérogène rapide avec un signal réversible et la présence d'un pic anodique ($E_{p.a.}=0.21$ V/ECS) et d'un pic cathodique ($E_{p.c.}=-0.13$ V/ECS). Nous avons ensuite comparé cette réponse électrochimique à celle de structures comportant un nombre croissant de couches de Pt-PMAA, après élimination de l'acide gras (la formation des structures Pt-PMAA-GOX étant réalisée après son retrait). Un nombre croissant de couches a été étudié afin de limiter le rôle des défauts présents dans le film LB. Ces défauts permettent potentiellement un accès direct de la sonde FcMeOH au collecteur d'or.

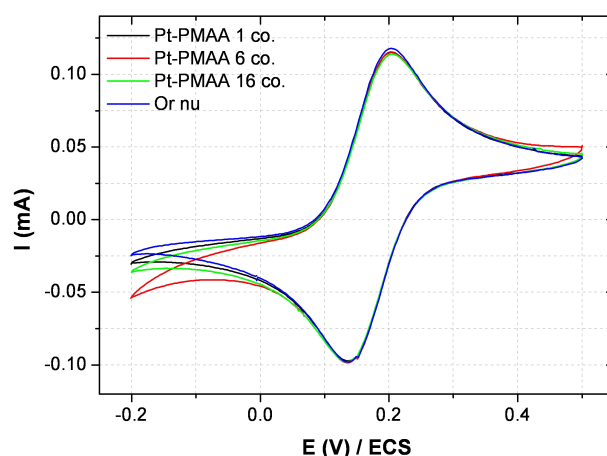


Figure IV.6 – Voltampérogramme d'une électrode d'or nue et de structures comportant 1, 6 et 16 couches de film LB de Pt-PMAA, après élimination de l'acide béhénique, dans du PBS à 10^{-3} mol/L de FcMeOH, entre -0.2 V et 0.5 V/ECS, $v=20$ mV/s.

Les voltampérogrammes obtenus (figure IV.6) dans tous les cas (or nu, 1, 6 et 16 couches déposées) sont parfaitement superposables. Nous voyons donc que même pour l'échantillon comportant un nombre de couches élevé, les courants mesurés sont identiques à ceux enregistrés sur l'or nu. Le fait que l'écart de potentiel entre le pic de réduction et le pic d'oxydation reste constant indique qu'il n'y a pas d'effet résistif significatif dû à la présence du film LB. Ceci indique que dans la structure à base de film LB de Pt-PMAA, les nanoparticules sont suffisamment proches pour assurer un transport de charge rapide (plus rapide que les phénomènes de diffusion de la sonde et de transfert électronique hétérogène) entre la surface du film et le collecteur de courant. Le fait que l'intensité des pics ne varie pas indique égale-

ment que les réactions d'oxydation ont lieu à l'interface entre l'électrolyte et la structure, FcMeOH ne pénètre pas dans le film LB de Pt-PMAA. Il faut noter qu'il est normal que nous retrouvions un courant de pic identique entre les nanoparticules et l'or même si la surface totale accessible est plus grande pour ce dernier. A la vitesse de balayage utilisée, il y a une coalescence des couches de diffusion de FcMeOH au niveau de chaque particule et tout se passe comme si nous avions une couche de platine homogène.

Nous avons étendu ces expériences pour évaluer l'impact de la présence de l'acide béhénique sur de telles mesures. La figure IV.7 présente les voltampérogrammes d'un échantillon comportant 6 couches avant et après élimination de l'acide gras. Nous constatons que les différences observées sont infimes. La présence de l'acide gras dans le film mixte ne perturbe donc pas le transport électronique de manière significative.

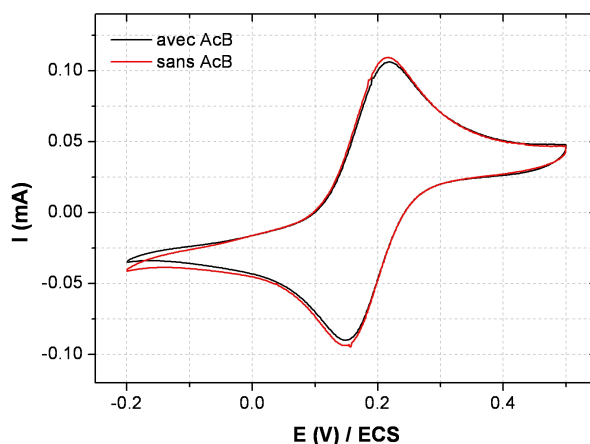


Figure IV.7 – Voltampérogramme d'une électrode d'or nue et de structures comportant 6 couches de film mixte 50/50 de Pt-PMAA avant et après élimination de l'acide béhénique, dans du PBS à 10^{-3} mol/L de FcOH, entre -0.2 V et 0.5 V/ECS, $v=20$ mV/s.

Le transport des charges entre le collecteur et la surface de la structure étant assuré, nous allons donc nous intéresser dans la partie suivante, à leur comportement vis-à-vis de H_2O_2 .

IV.3.1.2 Comportement de la structure à base de film LB de Pt-PMAA vis-à-vis de H_2O_2

IV.3.1.2.a Mise en évidence de l'effet catalytique du platine

Afin de vérifier si les sites actifs des nanoparticules de platine sont accessibles à H_2O_2 , nous avons, dans un premier temps, effectué des mesures de voltampérométrie cyclique sur des films LB de Pt-PMAA. Nous les avons ensuite comparé à des mesures témoins effectuées

sur la surface d'or nue. Ces mesures ont été faites sous agitation, dans une solution de PBS à une concentration en H_2O_2 de 10^{-2} mol/L. Les voltampérogrammes sont enregistrés entre -0.2 V/ECS et +0.5 V/ECS et comportent un nombre de cycles variables.

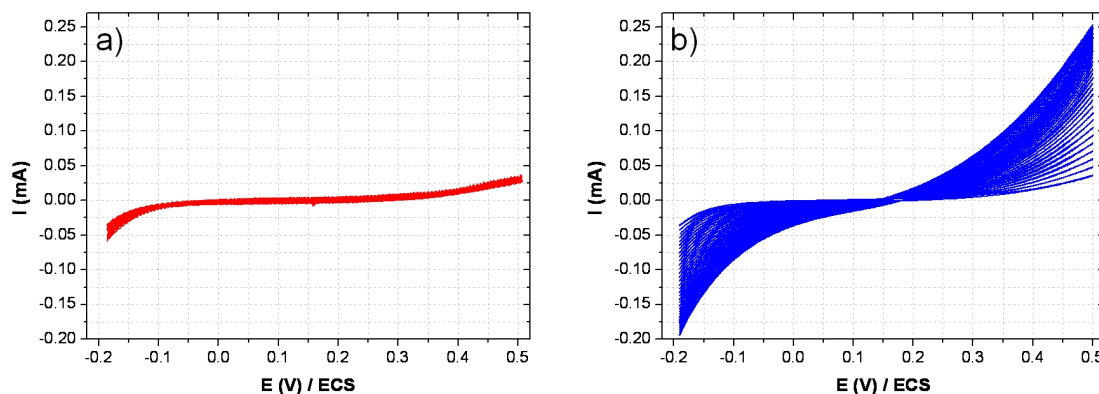


Figure IV.8 – Voltampérogramme a) d'une électrode d'or nue et (b) d'une structure comportant 5 couches de films LB de Pt-PMAA dans du PBS à 10^{-2} mol/L de H_2O_2 , entre -0.2 V et 0.5 V/ECS, $v=20$ mV/s.

Sur la figure IV.8a, où dix balayages sont superposés, nous voyons que l'intensité du courant mesurée entre 0 V et 0.3 V est nulle sur l'or nu. Au delà de ces valeurs, que ce soit en réduction où en oxydation, un courant faible, tendant à diminuer au cours des balayages, est mesuré. Pour les potentiels négatifs, le courant de réduction observé correspond probablement à la réduction de l'eau oxygénée et à celle de l'oxygène dissous dans le milieu. Pour les potentiels supérieurs à 0.3 V/ECS, le courant observé est dû à l'oxydation de H_2O_2 . Lorsque le collecteur d'or est recouvert d'un film LB de 5 couches de Pt-PMAA (figure IV.8b), nous constatons que le signal évolue au fil des cycles pour atteindre des valeurs de plus en plus élevées. Dès les premiers cycles, nous observons que les courants, à la fois en réduction et en oxydation, sont beaucoup plus élevés que ceux enregistrés sur l'or nu. Ceci nous permet donc d'affirmer que les sites actifs des nanoparticules existent et sont accessibles à H_2O_2 . Notre structure Pt-PMAA est donc électroactive vis-à-vis de cette molécule.

Comme mentionné précédemment, dans la zone de potentiel où H_2O_2 est réduit ($E < 0.15$ V/ECS), le courant mesuré provient de la réduction de H_2O_2 mais également de celle de O_2 dissous dans l'électrolyte, le platine catalysant également la réduction de cette espèce. Pour cette raison, nous avons choisi de travailler par la suite, sur le courant d'oxydation, qui, lui, est exclusivement dû à H_2O_2 . Comme nous venons de le voir, le signal enregistré en voltampérométrie cyclique évolue au cours du cyclage. Cette évolution est évidemment gênante pour une étude systématique de la réponse des structures en fonction de la concentration de H_2O_2 . Nous avons donc cherché à établir un protocole de conditionnement des électrodes

permettant d'obtenir un signal stable et reproductible.

IV.3.1.2.b Conditionnement des électrodes

La recherche de conditions de stabilisation du signal enregistré en voltampérométrie cyclique a été menée en se basant sur l'évolution du courant enregistré à 0,5 V/ECS, potentiel que nous utiliserons dans la suite de nos expériences. Initialement, plusieurs cycles sont enregistrés entre 0,5 V/ECS et une valeur donnée, de la borne cathodique (gauche) jusqu'à stabilisation du courant. Une fois le courant stabilisé, la borne cathodique du voltampérogramme est décalée progressivement vers des valeurs de potentiel plus faibles. Ceci produit une augmentation immédiate du courant d'oxydation de H_2O_2 . Ces expériences montrent que, plus le décalage de la borne cathodique est important, plus l'augmentation du courant d'oxydation est élevée. Suite à ces observations, nous avons donc choisi d'utiliser la chronoampérométrie, qui permet de maintenir successivement pour une durée déterminée, les électrodes aux deux potentiels extrêmes de 0,5 V/ECS et 0 V/ECS. Les électrodes ont ainsi été plongées dans la solution de PBS contenant 10^{-3} mol/L de H_2O_2 et soumises à 9 cycles de 5 minutes à 0.5 V/ECS, suivis de 2 minutes à 0 V/ECS (figure IV.9a). Le chronoampérogramme correspondant à un tel conditionnement est présenté figure IV.9b.

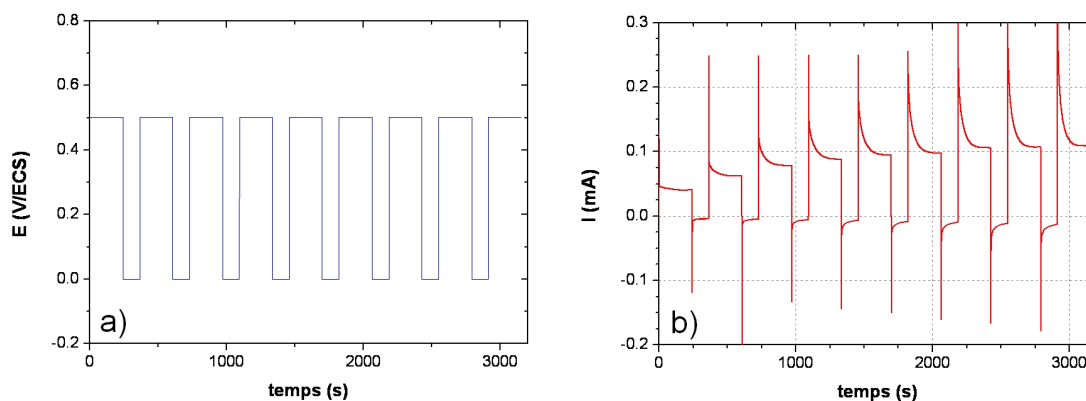


Figure IV.9 – a) Potentiels imposés lors du conditionnement (11 cycles de 5 minutes à 0.5 V/ECS suivis de 2 minutes à 0 V/ECS) et b) chronoampérogramme correspondant pour une structure comportant 5 couches de film LB de Pt-PMAA.

Ce protocole permet une stabilisation assez rapide et reproductible du courant d'oxydation de H_2O_2 . L'origine de l'évolution des voltampérogrammes n'est cependant pas clairement comprise. Nous avons donc voulu vérifier que celle-ci n'était pas due à une altération de la nanostructure elle-même (perte de nanoparticules de platine et/ou dégradation de la couronne organique). La spectroscopie infrarouge enregistrée avant et après conditionnement suggère que ce n'est pas le cas. Les pics associés à la présence de la couronne polymère n'évoluent

pas de façon significative avant et après cyclage (figure IV.10).

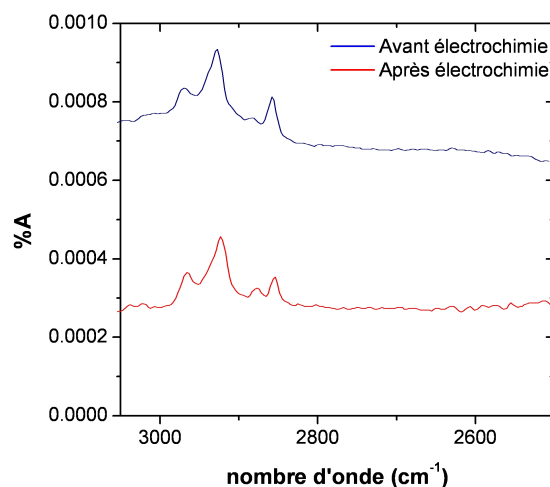


Figure IV.10 – Spectre IR-ATR d'une structure comportant 5 couches de films LB de Pt-PMAA avant et après mesure électrochimique.

Sur la figure IV.11, nous avons reporté le voltampérogramme initial (avant conditionnement) et final (à l'issue du conditionnement), enregistrés en présence de H₂O₂ qui illustre donc l'effet du protocole de conditionnement sur l'intensité des courants.

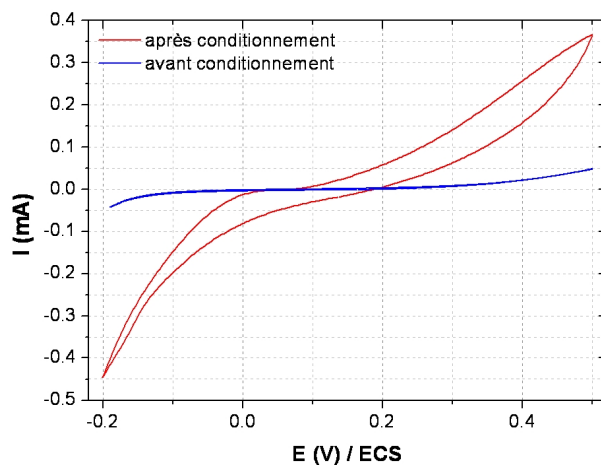


Figure IV.11 – Voltampérogramme (32 cycles) d'une structure comportant 5 couches de film LB de Pt-PMAA avant (bleu) et après (rouge) conditionnement, dans du PBS à 10⁻² mol/L de H₂O₂ entre -0.2 V et 0.5 V/ECS, $v=20$ mV/s.

A l'issue de cette étude, nous disposons d'un protocole de conditionnement des électrodes permettant d'obtenir de manière reproductible, un courant d'oxydation de H₂O₂ de 380 mA en moyenne, pour une concentration de 10⁻² mol/L en H₂O₂. Dans le paragraphe suivant,

nous abordons l'étude de la réponse des structures comportant un nombre de couches de Pt-PMAA variable, en fonction de la concentration de H_2O_2 introduite dans l'électrolyte.

IV.3.1.2.c Réponse électrochimique en fonction de la concentration de H_2O_2 et influence du nombre de couches

Les électrodes étudiées dans ce paragraphe ont toutes subi la phase de conditionnement des électrodes décrite dans le paragraphe IV.3.1.2.b. Les mesures sont ici réalisées par chronoampérométrie avec un potentiel fixé à 0,5 V/ECS. Nous avons tout d'abord étudié la réponse d'une structure comportant cinq couches de Pt-PMAA en fonction de la concentration en H_2O_2 . Ces mesures sont effectuées sous agitation continue afin que le courant ne soit pas limité par la diffusion du substrat et pour obtenir rapidement un milieu homogène et une stabilisation du courant, après addition de H_2O_2 . Les concentrations de H_2O_2 utilisées vont de 10^{-6} mol/L à 10^{-1} mol/L. La figure IV.12 montre que l'augmentation de la concentration en H_2O_2 conduit à une augmentation du courant d'oxydation.

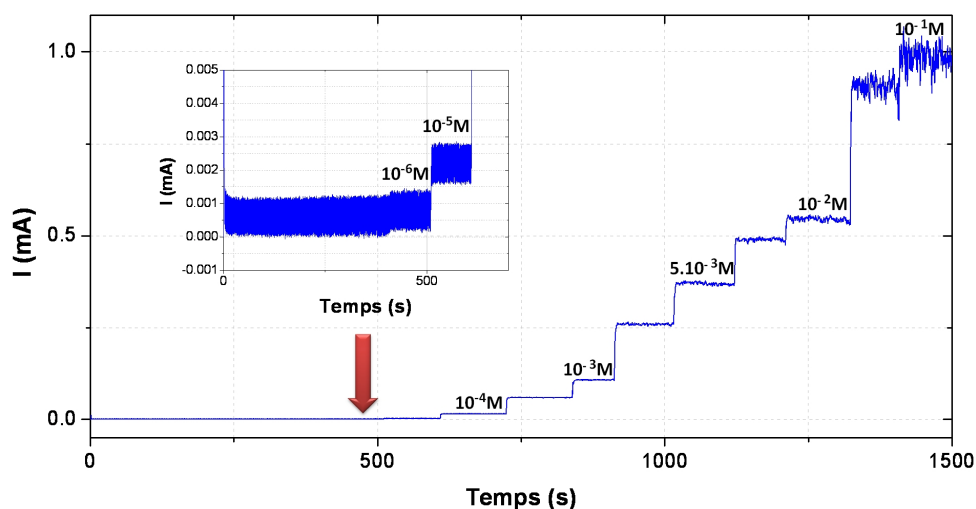


Figure IV.12 – Chronoampérogramme d'une électrode modifiée (Pt-PMAA 5co, sans acide béhénique), utilisée pour la détection de H_2O_2 . Le potentiel de travail est de 0,5 V/ECS. La gamme de détection de H_2O_2 a été évaluée sur 11 points, de 10^{-6} mol/L $^{-1}$ à 10^{-1} mol/L $^{-1}$.

De telles expériences ont ensuite été menées sur des structures Pt-PMAA comportant un nombre de couches variables, 1, 2, 3, 5 et 15 couches. Les résultats sont reportés sur la figure IV.13 qui indique le courant d'oxydation mesuré sur le palier, en fonction de la concentration de H_2O_2 .

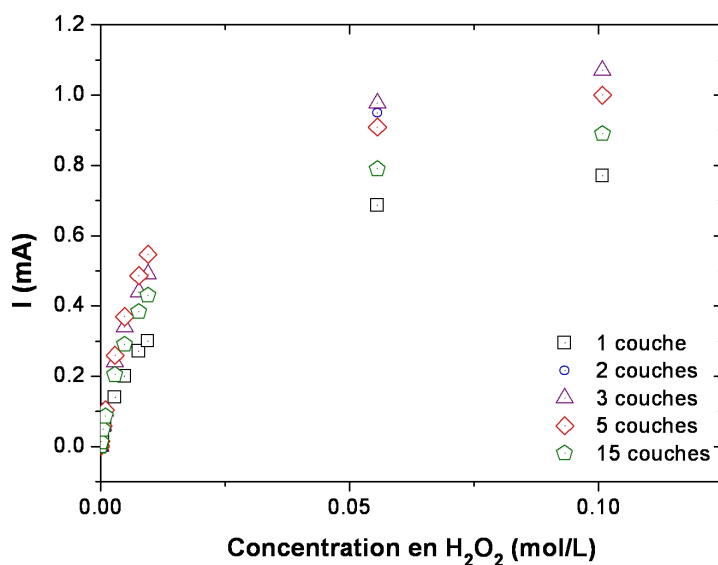


Figure IV.13 – Evolution du courant d’oxydation mesuré à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration en H₂O₂ pour des structures à base de films LB de Pt-PMAA, composées d’un nombre croissant de couche (1, 2, 3, 5 et 15 couches).

Nous observons tout d’abord que ces courbes peuvent être séparées en deux parties. La première zone correspond à une évolution linéaire de l’intensité du courant mesurée en fonction de la concentration en H₂O₂. Elle s’étend d’environ de 10⁻⁶ à 10⁻³ mol/L. C’est dans cette zone linéaire que peut être estimée la sensibilité du capteur vis-à-vis de H₂O₂. La seconde zone des courbes indique une stabilisation du niveau de courant qui n’évolue plus sous l’effet d’un ajout supplémentaire de H₂O₂, la réponse de la nanostructure est ainsi saturée. A partir de la pente mesurée dans la première partie des courbes, la sensibilité de l’électrode vis-à-vis de H₂O₂ est déterminée (en A.L.mol⁻¹). Nous l’avons rapportée à la surface de l’électrode (en A.L.mol⁻¹.cm⁻²). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.1. Nous remarquons que, quel que soit le nombre de couches, les sensibilités sont de l’ordre de 0.1 A.L.mol⁻¹.

Nbre de couches	Sensibilité (A.L.mol ⁻¹ .cm ⁻²)
1	0.08
2	0.15
3	0.13
5	0.13
15	0.12

Table IV.1 – Sensibilité des structures à base de films LB de Pt-PMAA après élimination de l’acide béhénique) en fonction du nombre de couches transférées.

En conclusion, le nombre de couches ne semble pas influencer la réponse électrochimique des structures à base de films LB de Pt-PMAA. Seule la structure ne comportant qu'une seule couche de nanoparticules montre une réponse différente de celle des autres. Le courant plus faible de la structure à une couche est probablement lié au fait que seule la moitié de la surface de l'électrode est couverte de nanoparticules de Pt-PMAA après élimination de l'acide gras (film mixte 50/50). Dans le cas des structures comportant un nombre de couches plus élevé, tout se passe comme si la quantité de nanoparticule à laquelle H_2O_2 , peut accéder reste identique. Ces résultats suggèrent que seule la partie externe des nanostructures, soit les deux dernières couches, reste accessible et active vis-à-vis de l'oxydation de H_2O_2 . Ce comportement est similaire à celui enregistré pour des structures formées à partir de nanoparticules ayant des enrobages de faible poids moléculaire, dans le cas de la sonde oxygène¹⁵² (sonde à transfert lent, comme H_2O_2).

Dans le paragraphe suivant, nous abordons l'étude de la réponse électrochimique des structures à base de brosses polymères vis-à-vis de H_2O_2 .

IV.3.2 Comportement de la structure de type brosse PMAA vis-à-vis de H_2O_2

Le comportement électrochimique de la structure de type brosse vis-à-vis de H_2O_2 va dépendre principalement des couches de nanoparticules amorçantes. Dans cette structure, la diffusion de H_2O_2 à travers la couche polymère peut cependant limiter la réponse enregistrée. Pour décorrélérer ces deux phénomènes, nous avons, dans un premier temps, étudié le comportement électrochimique des couches de nanoparticules amorçantes dépourvues de brosses polymères.

IV.3.2.1 Etude préliminaire de films LB de nanoparticules amorçantes vis-à-vis de H_2O_2

Les électrodes à base de films LB de nanoparticules possédant un enrobage de faible poids moléculaires, telles que celles formées à partir des nanoparticules amorçantes, ont été déjà beaucoup étudiées vis-à-vis de la réduction de l'oxygène. Pour de telles structures, les distances inter-particules dans le film sont suffisamment faibles pour assurer un bon transport électronique entre la surface de film et le collecteur d'or présent sur le substrat de verre. Comme évoqué précédemment, il a été montré que pour des structures sans acide béhénique, les réponses électrochimiques de structures multicouches sont toutes identiques, vis-à-vis de la réduction de l'oxygène. Nous avons ainsi étudié le comportement d'électrodes comportant

5 couches de film mixte (50/50) de nanoparticules amorçantes vis-à-vis de H_2O_2 , après élimination de l'acide béhénique. Un exemple de voltampérogramme obtenu, est présenté dans la figure IV.14.

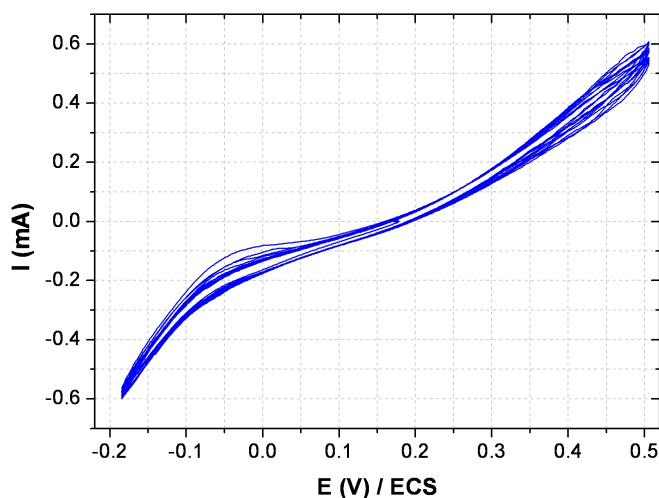


Figure IV.14 – Voltampérogramme (10 cycles) d'une électrode modifiée avec 5 couches de nanoparticules amorçantes, dans du PBS à 10^{-2} mol/L de H_2O_2 entre -0.2 V et 0.5 V/ECS, $v=20$ mV/s.

Les voltampérogrammes montrent que le signal est stable au bout de quelques cycles seulement. Peu d'évolutions sont visibles d'un cycle à l'autre. Nous voyons également que les intensité des courants obtenues, en oxydation ou en réduction, sont supérieures à celles observées pour les films de Pt-PMAA.

Nous avons ensuite réalisé des mesures de chronoampérométrie, sous agitation, en fixant le potentiel de la structure à 0.5 V/ECS et en ajoutant des quantités croissantes de H_2O_2 dans l'électrolyte. La figure IV.15 montre l'évolution des valeurs des paliers de courant d'oxydation de H_2O_2 . La figure comporte également les résultats enregistrés précédemment dans le cas de la structure de type Pt-PMAA. Comme pour cette dernière, nous observons à nouveau deux zones distinctes. La première montre une évolution linéaire du courant d'oxydation en fonction de la concentration de H_2O_2 . Nous constatons que la pente dans cette partie est plus élevée dans le cas des nanoparticules amorçantes, par rapport aux structures à base de Pt-PMAA. La seconde zone indique que la saturation du courant se produit pour une concentration en H_2O_2 plus élevée que pour les nanoparticules de Pt-PMAA.

La sensibilité mesurée dans la zone linéaire est de $0.61 \text{ A.L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ à comparer à la valeur de $0.13 \text{ A.L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, mesurée pour un film LB composé de 5 couches de Pt-PMAA.

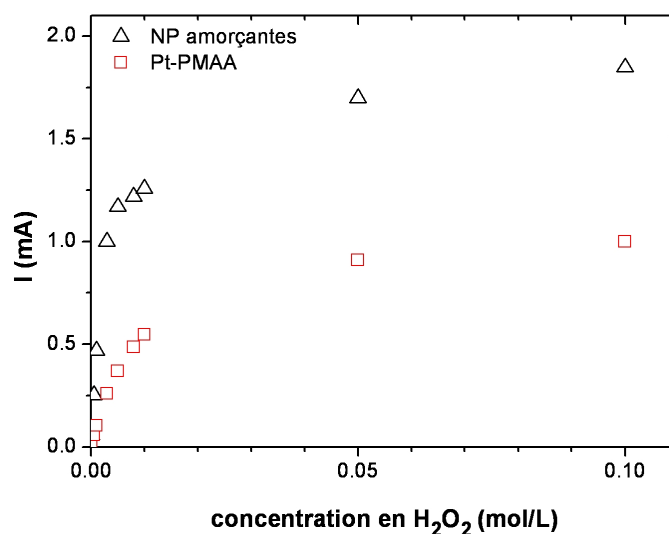


Figure IV.15 – Evolution du courant d'oxydation mesuré à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration en H₂O₂ pour une structure composée de 5 couches de nanoparticules amorçantes, comparée à 5 couches de film LB de Pt-PMAA.

Electrode	Sensibilité ($A.L.mol^{-1}.cm^{-2}$)	Sensibilité/masse de Pt ($A.L.mol^{-1}.\mu g_{Pt}^{-1}$)
NP amorçantes	0.61	0.55
Pt-PMAA	0.13	0.56

Table IV.2 – Comparaison des sensibilités des structures comportant 5 couches de film LB de nanoparticules amorçantes et de 5 couches de film LB de Pt-PMAA.

En calculant les sensibilités normalisées par la quantité de platine, nous obtenons $0.55 A.L.mol^{-1}.\mu g_{Pt}^{-1}$ pour le film de nanoparticules amorçantes et $0.56 A.L.mol^{-1}.\mu g_{Pt}^{-1}$ pour celui de Pt-PMAA. Ces résultats sont très proches et montrent que la différence de sensibilité provient vraisemblablement ici, de la différence de densité de platine dans les films LB. Il est en effet intéressant de noter que le rapport des sensibilités (de l'ordre de 5 en faveur des nanoparticules amorçantes) est très proche du rapport des densités de platine que nous pouvons déterminer à partir des isothermes de compression étudiées dans le chapitre III ($0.23 \mu g/cm^2$ pour les nanoparticules de type Pt-PMAA pour $1.11 \mu g/cm^2$ dans le cas des nanoparticules amorçantes). Ce résultat suggère que le nombre de sites disponibles à la surface des nanoparticules de platine est identique dans les deux structures. Ceci est logique car les nanoparticules de Pt-PMAA sont formées à partir des nanoparticules amorçantes. Ces résultats suggèrent également que l'accessibilité aux sites actifs des nanoparticules de platine est la même pour les deux types de nanoparticules. La couche de polymère ne limite pas la diffusion de H₂O₂ jusqu'à la surface des nanoparticules. La densité de greffage de ces

chaînes polymères est largement plus faible que pour la couronne de mercaptoaniline (0.8 chaîne/nm² contre 5.7 molécules/nm²), l'étape limitante reste donc vraisemblablement la diffusion de H₂O₂ à travers la couronne initiale de mercaptoaniline.

Le dépôt de films LB de nanoparticules amorçantes permet donc d'augmenter la densité de platine présent à la surface des structures, ce qui se traduit par une augmentation de la sensibilité de celles-ci vis-à-vis de la détection de H₂O₂. L'étape suivante correspond à l'étude de ce type d'électrode vis-à-vis de H₂O₂ après formation de la brosse polymère de PMAA.

IV.3.2.2 Etude du comportement des brosses de PMAA vis-à-vis de H₂O₂

Les deux lots de brosses (brosses 2 et 3), élaborées sur les lames de verre munies d'un collecteur d'or, ont été étudiés. Ils ont subi le même protocole lors de la polymérisation et de l'hydrolyse. Pour chaque lot, 3 échantillons ont été étudiés par chronoampérométrie. Les courbes rapportant l'évolution des paliers de courant d'oxydation enregistrés à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration de H₂O₂ sont présentées dans la figure IV.16. Nous avons également reporté sur cette figure la courbe enregistrée avec les films à base de nanoparticules amorçantes. A nouveau, nous observons une zone de variation linéaire du courant en fonction de la concentration de H₂O₂ et un phénomène de saturation de la réponse.

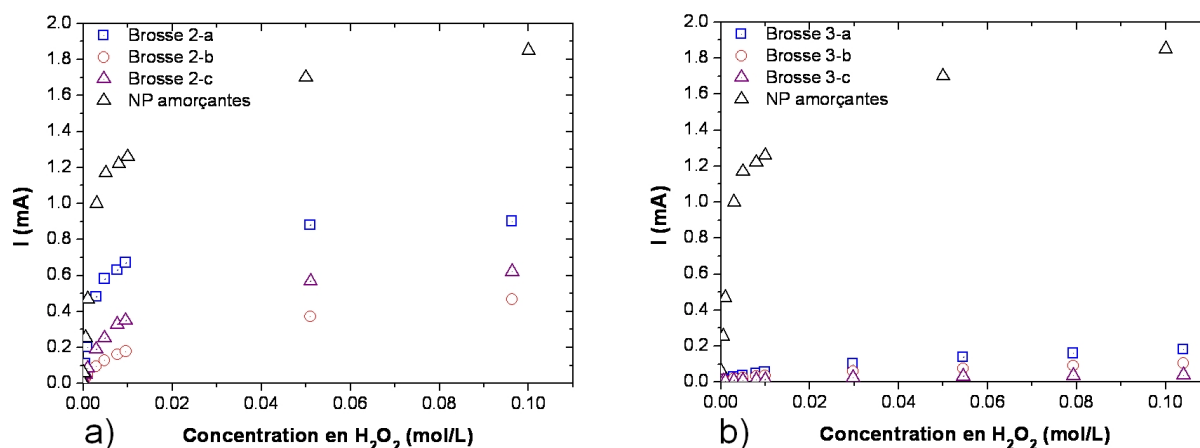


Figure IV.16 – Evolution du courant d'oxydation mesuré à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration en H₂O₂ pour les 2 lots de structures de types brosses synthétisés (a : brosse n°2, b : brosse n°3) ainsi que pour une structure composée de 5 couches de film LB de nanoparticules amorçantes.

Les sensibilités calculées dans la zone linéaire des courbes pour chacun des échantillons sont présentées dans le tableau IV.3.

Echantillon	Sensibilité ($A.L.mol^{-1}.cm^{-2}$)
NP amorçantes 5co.	0.61
Brosse 2-a	0.27
Brosse 2-b	0.12
Brosse 2-c	0.06
Brosse 3-a	0.016
Brosse 3-b	0.012
Brosse 3-c	0.004

Table IV.3 – Comparaison des sensibilités des structures comportant 5 couches de film LB de nanoparticules amorçantes et de Pt-PMAA.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l’hydrolyse des brosses de Pt-PMAtBu formées sur les films de nanoparticules amorçantes n’était vraisemblablement pas totale. La forte dispersion des résultats enregistrés en électrochimie vis-à-vis de l’oxydation de H_2O_2 introduit de sérieux doutes sur la reproductibilité de l’étape d’hydrolyse. Comme dans la majorité des cas, un signal significatif est détecté pour l’oxydation de H_2O_2 , la dispersion des résultats suggère que le taux d’hydrolyse n’est pas reproductible d’un échantillon à l’autre.

Suite aux études préliminaires effectuées sur les films minces précurseurs, nous nous sommes assurés que certaines étapes du processus de détection ne seraient pas limitantes. Dans le cas des structures basées sur les films LB de Pt-PMAA, nous avons montré que les sites actifs des nanoparticules étaient accessibles à H_2O_2 et que les nanoparticules de platine étaient suffisamment proches pour assurer un transport des charges efficace dans le film. L’étude effectuée sur les structures de type brosse a permis de montrer que H_2O_2 parvient à diffuser à travers la brosse polymère jusqu’aux nanoparticules de platine. Cependant, cette diffusion est fortement liée à l’efficacité de la réaction d’hydrolyse. Compte tenu de ces résultats et en particulier de la sensibilité de ces systèmes vis-à-vis de H_2O_2 , il n’y a *a priori* aucun obstacle à l’étude de leur comportement électrochimique en configuration biocapteur. Ce travail est présenté dans les paragraphes suivants.

IV.4 Etude des nanostructures hybrides Pt-PMAA-GOx en configuration biocapteur

Dans cette partie, nous étudions la réponse électrochimique des différentes structures hybrides Pt-PMAA-GOx présentées dans le chapitre III, vis-à-vis du glucose. Il s’agit non seulement des structures à l’état solide sur lesquelles nous avons mené une étude préliminaire

vis-à-vis de H_2O_2 , mais également des systèmes hydrides formés en solution qui sont aisément manipulables et peuvent être déposés sur divers supports. Ces derniers n'ont pas été étudiés préalablement vis-à-vis de l'oxydation de H_2O_2 de manière à limiter l'altération éventuelle de la GOx greffées. Les conditions de mesures sont ici légèrement différentes de celles utilisées pour H_2O_2 . Rappelons que l'eau oxygénée détectée en configuration biocapteur provient exclusivement de l'activité enzymatique de la GOx introduite par greffage covalent dans les différents systèmes. Notre objectif est d'une part de vérifier que ces systèmes permettent de détecter la présence de glucose, et d'autre part, d'évaluer et de comparer leur sensibilité.

Les premiers essais d'addition de glucose dans l'électrolyte pendant la mesure du courant d'oxydation à 0.5 V/ECS par chronoampérométrie, ont montré qu'il est difficile de travailler sous agitation continue, comme nous l'avons fait pour H_2O_2 , car le rapport signal sur bruit est trop faible. En effet, les quantités de H_2O_2 mises en jeu sont ici nettement moins importantes que lors de l'étude précédente puisqu'elles sont issues exclusivement de l'activité enzymatique de la GOx. Les intensités des courants seront donc plus faibles. En pratique, nous effectuons l'ajout de glucose dans l'électrolyte, puis nous agitons brièvement la solution de manière à homogénéiser sa concentration. Cette agitation est ensuite suspendue afin d'enregistrer directement le courant d'oxydation.

Dans le sang, la concentration en glucose est normalement de 5×10^{-3} mol/L (0.85 g/L). Cette valeur est environ doublée chez une personne atteinte d'hyperglycémie.¹⁰¹ Nous avons donc effectué notre étude sur une gamme de concentrations comprises entre 0 et 10^{-2} mol/L de glucose. A ces concentration en glucose, il est fort probable que la diffusion du substrat ne soit pas limitante et les conséquences de l'absence d'agitation restent limitées.

IV.4.1 Etude de la structure à base de films LB de Pt-PMAA en configuration biocapteur

IV.4.1.1 Etude de la sensibilité de la structure vis-à-vis du glucose à 0.5V/ECS

Le greffage de l'enzyme sur cette structure (présenté dans le chapitre III) a été réalisé sur des structures comportant 5 couches de film LB de Pt-PMAA, après élimination de l'acide béhénique. Précisons ici que la phase de conditionnement (décrite dans le paragraphe IV.3.1.2.b) menée sur les mêmes structures lors de l'étude vis-à-vis de H_2O_2 , n'a pas été réalisée ici. Les courants mesurés suite à l'introduction du glucose sont en effet assez stables. Un exemple de mesures chronoampérométriques réalisées à différentes concentrations de glucose, est présenté dans la figure IV.17.

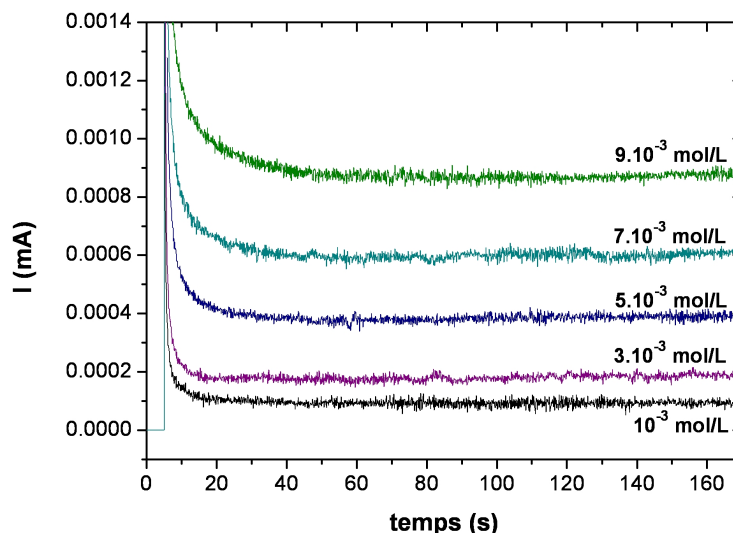


Figure IV.17 – Chronoampérogrammes obtenus en détection de glucose (0.5 V/ECS) à différentes concentrations (1, 3, 5, 7 et 9 mmol) pour une structure hybride à base de film LB de Pt-PMAA greffés de GOx.

Nous observons tout d'abord que quelle que soit la concentration en glucose, les intensités de courant mesurées tendent vers une valeur de plateau constante. Nous observons que l'intensité du courant mesuré sur ce plateau augmente avec la quantité de glucose. Ceci confirme donc que les enzymes greffées sont toujours actives mais également que leur nombre est suffisamment important pour pouvoir mesurer un courant lié à l'activité catalytique, dans les conditions de mesure utilisées. A partir des intensités des courants mesurées sur chaque plateau, nous avons tracé le courant en fonction de la concentration en glucose. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.18.

Nous observons que dans la gamme de concentrations étudiée, le courant mesuré est proportionnel à la concentration à glucose. La sensibilité mesurée sur cet échantillon est de $32,5 \mu\text{A}/\text{mol}$. Cette mesure a été reproduite sur 8 autres électrodes. La sensibilité moyenne mesurée est $41 \mu\text{A}/\text{mol}$, avec un écart type de $\pm 22.5\%$.

En plus de ces échantillons, nous avons également mesuré la réponse de différents témoins. Le premier (témoin 1) correspond à une structure composée de 5 couches de film LB de Pt-PMAA, sans enzymes, (film précurseur) afin de vérifier que le glucose n'a pas d'influence sur le courant mesuré. Ceci est confirmé sur la figure IV.18 où nous voyons que le courant mesuré en l'absence d'enzyme est négligeable. Le second témoin (témoin 2) correspond à une électrode pour laquelle nous avons suivi le protocole de greffage de l'enzyme mais sans utiliser le couple NHS/EDC (qui permet d'obtenir une liaison covalente). Ce test permet

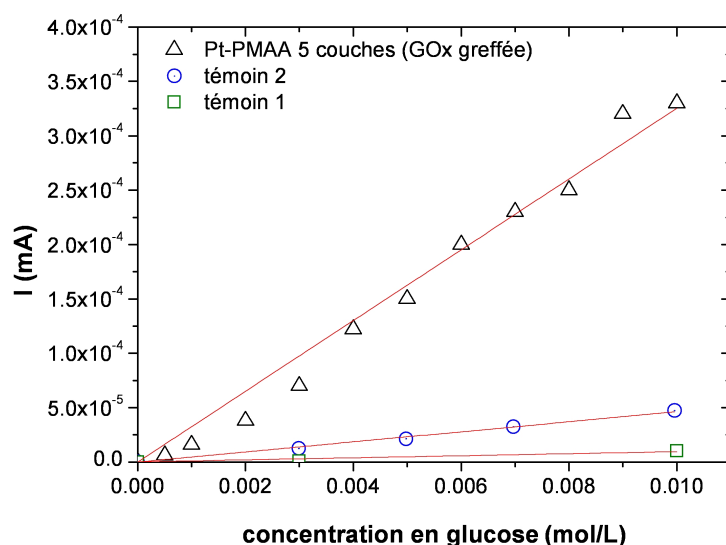


Figure IV.18 – Evolution du courant d'oxydation mesuré à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration en glucose, pour une structure hybride composée de 5 couches de film LB de Pt-PMAA greffées de glucose oxydase. Cette évolution est comparée à celle d'une structure équivalente sans enzyme (témoin 1) et d'une structure équivalente où l'enzyme est seulement adsorbée (témoin 2).

d'évaluer l'impact de la GOx immobilisée par simple adsorption. Sur ce second témoin, nous voyons que le courant augmente avec la concentration en glucose. Cela signifie qu'une petite quantité d'enzymes reste adsorbée à la surface malgré les lavages effectués. Cependant, la sensibilité de cette électrode est d'environ $4.7\mu\text{A}/\text{mol}$, soit environ 10 fois moins que la sensibilité moyenne obtenue lorsque l'enzyme est greffée. La contribution associée à l'adsorption d'enzymes sur la surface de film LB de Pt-PMAA, est donc minime.

Les sensibilités moyennes mesurées sur les structures Pt-PMAA-GOx ainsi que sur les témoins sont résumées dans le tableau IV.4.

Type de structure	Sensibilité ($\mu\text{A.L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)
Pt-PMAA-GOx	53
Pt-PMAA 5co (témoin 1)	≈ 0
Pt-PMAA+GOx adsorbée (témoin 2)	6.1

Table IV.4 – Sensibilité moyenne des structures composées de 5 couches de film LB de Pt-PMAA greffées de GOx, comparée à celles des témoins (5 couches de Pt-PMAA avec GOx adsorbée et sans GOx).

Dans le paragraphe suivant, nous nous sommes intéressés à l'effet du potentiel de travail sur les sensibilités des structures Pt-PMAA-GOx à base de films LB de Pt-PMAA, vis-à-vis du glucose.

IV.4.1.2 Etude de la sensibilité en fonction du potentiel

Cette étude a uniquement été effectuée sur les structures hybrides Pt-PMAA-GOx élaborées à partir de films LB de Pt-PMAA. Elle nous a permis de mesurer la sensibilité des structures en fonction du potentiel. Pour réaliser cette étude, des mesures de sensibilités ont été effectuées à 0.2, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 et 0.6 V/ECS. Les sensibilités déterminées pour chaque potentiel, sont regroupées sur la figure IV.19.

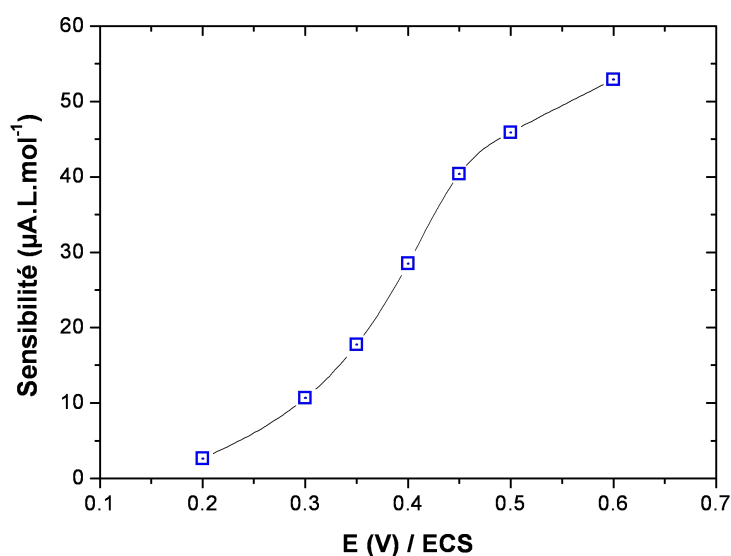


Figure IV.19 – Evolution de la sensibilité des structures hybrides à base de films LB de Pt-PMAA en fonction du potentiel.

Avec cette représentation, nous remarquons que la sensibilité évolue linéairement entre 0.35 et 0.45 V/ECS. A des potentiels supérieurs, il semble que nous observons à nouveau un phénomène de saturation. Cet effet est probablement relié au fait que la quasi-totalité de H_2O_2 produite par les enzymes est déjà consommée lorsque le potentiel est à 0.5 V/ECS. La sensibilité mesurée pour des potentiels inférieurs à 0.35 V/ECS décroît rapidement et rend difficile la détection de faibles concentrations en glucose dans ces conditions.

Dans le paragraphe suivant, l'étude de la structure brosse en configuration biocapteur est présentée. Contrairement à l'étude précédente, elle a été menée exclusivement à 0.5 V/ECS.

IV.4.2 Etude de la structure de type brosse en configuration biocapteur

Malgré les difficultés rencontrées lors de l'étude du comportement des structures de type brosse vis-à-vis de H_2O_2 , nous avons étudié celles-ci en configuration biocapteur, après greffage de la GOx. Ces systèmes présentent une structure et une composition chimique différentes des films LB de Pt-PMAA. Il faut souligner que la quantité d'enzymes immobilisées est ici 4 fois supérieure par rapport à la structure hybride à base de films LB de Pt-PMAA.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé seulement les trois échantillons du lot de brosse n°2. Ces derniers présentaient les meilleures sensibilités lors de l'étude préliminaire vis-à-vis de H_2O_2 . Les mesures ont été réalisées dans des conditions identiques à celles utilisées pour les structures hybrides précédentes. Les courants de plateau, mesurés après chaque ajout de glucose, sont reportés sur la figure IV.20.

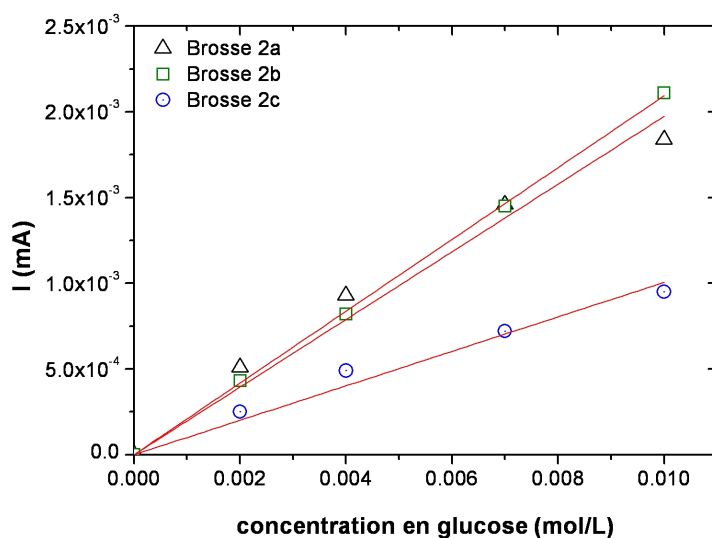


Figure IV.20 – Evolution du courant d'oxydation mesuré à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration en glucose pour les structures de type brosse.

Nous constatons que pour les 3 échantillons, les sensibilités sont significatives. Ceci confirme donc que les enzymes greffées sont toujours actives et que le H_2O_2 produit par ces dernières, diffusent jusqu'au film LB de nanoparticules amorçantes. Les sensibilités calculées à partir des pentes mesurées sur la figure IV.20, sont résumées dans le tableau IV.5.

Nous retrouvons une forte divergence dans les sensibilités. Il existe cette fois un rapport 2 entre les échantillons les plus et les moins sensibles, probablement liés à des différences dans

Echantillons	Sensibilité ($\mu A.L.mol^{-1}.cm^{-2}$)
Brosse 2-a	271
Brosse 2-b	256
Brosse 2-c	131

Table IV.5 – Sensibilité des structures de type brosse issues du lot 2, vis-à-vis du glucose, mesuré à 0.5 V/ECS.

les taux d'hydrolyses. Il faut toutefois noter que les sensibilités ici mesurées, sont élevées et nettement supérieures à celles obtenues sur la structure basée sur les films LB de Pt-PMAA. Nous reviendrons sur les origines probables de ces différences dans la conclusion.

IV.4.3 Etude des structures hybrides obtenues en solution en configuration biocapteur

Les dernières structures hybrides Pt-PMAA-GOx que nous avons étudiées, ont été réalisées à partir des systèmes hybrides Pt-PMAA-GOx obtenus et conservés en solution. Nous avons déterminé dans le chapitre III que la solution mère utilisée contenait 5 mg/mL de Pt-PMAA et 1.9 mg/mL d'enzymes actives. Dans cette étude, cette solution mère a été diluée d'un facteur 5 pour réaliser des dépôts sur les supports de verre recouverts d'or à l'aide d'une micropipette. Le protocole simple, que nous avons utilisé pour effectuer les dépôts, est schématisé dans la figure IV.21.

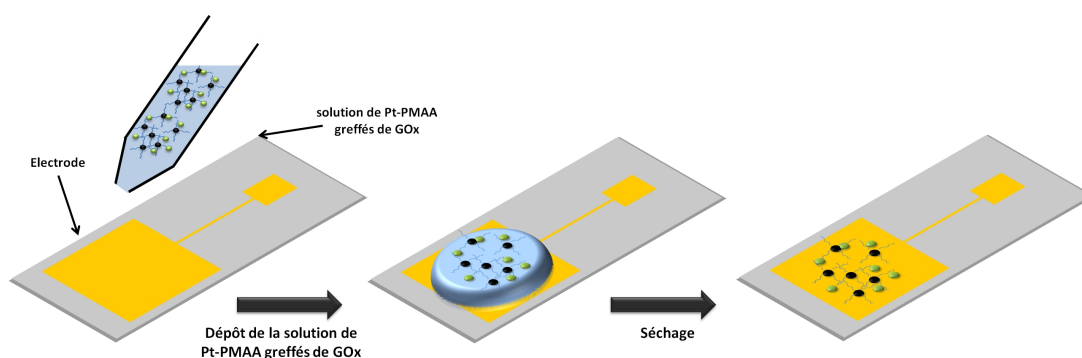


Figure IV.21 – Schéma du protocole de dépôt sur les électrodes de la structure hybride platine-polymère-enzyme obtenue en solution.

Un avantage de cette approche est qu'elle permet de maîtriser les quantités d'enzymes et de nanoparticules de platine introduites sur l'électrode. Comme nous le verrons, la quantité d'enzymes déposée est d'ailleurs plus élevée dans cette approche que dans les autres struc-

tures en films ultra-minces, où le greffage ne se fait qu'à la surface. Les tests de détection du glucose ont été effectués dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment.

IV.4.3.1 Influence de la quantité de matière déposée

Lors de cette étude, nous avons effectué des dépôts successifs de 10 μL directement sur les électrodes d'or, à partir de la solution initiale de Pt-PMAA greffé de GOx, préalablement diluée 5 fois. Ce volume correspond à un dépôt de 3 μg de platine et 3.8 μg de glucose oxydase (≈ 24 pmoles). Dans ces expériences, nous n'avons pas de réel contrôle sur la structure des dépôts successifs, qui le plus souvent, se superposent. Les courants mesurés pour chaque concentration en glucose sont reportées sur la figure IV.22.

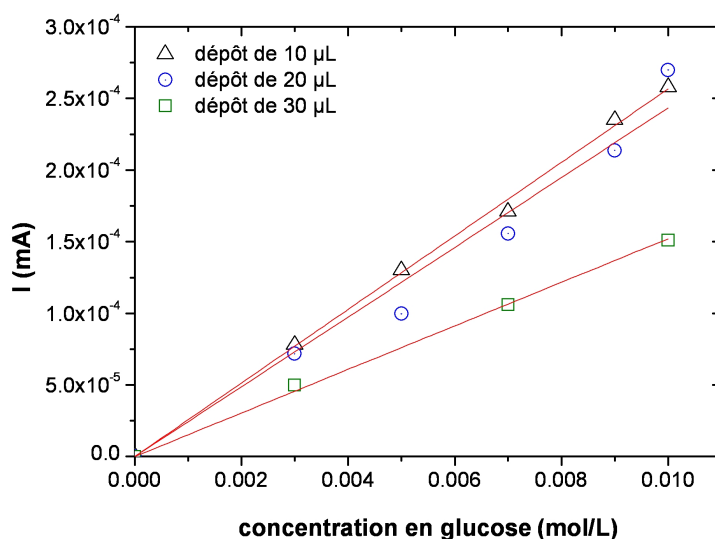


Figure IV.22 – Evolution du courant d'oxydation mesuré à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration en glucose, pour les dépôts de 10, 20 et 30 μL de solution contenant 1 mg/mL de Pt-PMAA et 0.38 mg/mL de glucose oxydase active greffée sur une électrode d'or.

Nous observons que, dans tous les cas, l'activité catalytique de l'enzyme est bien convertie en courant électrique et que le courant mesuré évolue linéairement avec la concentration en glucose. Nous constatons ensuite que les intensités de courant mesurées sont proches quel que soit le volume de solution épandu. Nous avons indiqué ci-dessus que la quantité de platine déposée pour un volume de 10 μL est de 3 μg . La densité de platine minimale présente sur l'électrode est, dans ces conditions, de l'ordre de 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cette valeur peut être comparée à celle mesurée pour une monocouche de nanoparticules de Pt-PMAA qui est de 0.23 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En supposant que le dépôt de 10 μL soit homogène, il correspondrait à une structure de 17 monocouches de films LB de Pt-PMAA superposées. Les volumes de 20 et 30 μL correspondent donc à des épaisseurs 34 et 51 monocouches. La faible évolution

du courant en fonction du volume déposé s'explique donc probablement par le fait que l'un des phénomènes mis en jeu dans la détection (diffusion du glucose, de H_2O_2 , transport des charges...) ne se produit pas dans l'épaisseur du dépôt.

Les sensibilités mesurées sont résumées dans le tableau IV.6 et sont comprises entre 20 et 33 $\mu A.L.mol^{-1}$. Indépendamment du volume déposé, nous pouvons noter qu'elles sont du même ordre de grandeur que celles mesurées sur les structures à base de films LB de Pt-PMAA.

volume déposé (μL)	Sensibilité ($\mu A.L.mol^{-1}.cm^{-2}$)
10	33
20	32
30	20

Table IV.6 – Sensibilité vis-à-vis du glucose des électrodes obtenues par dépôts sur or de la structure Pt-PMAA-GOx en solution (mesurées à 0.5 V/ECS).

Ce résultat peut paraître surprenant car la quantité de GOx présente dans de tels dépôts est très supérieure (dans un rapport de 1 à 100) à celle introduite dans les structures en films ultra-minces. Nous pouvons évidemment nous interroger sur l'accessibilité du glucose jusqu'aux enzymes dans la structure. Compte tenu du rapport enzyme/platine dans le système hybride formé en solution (1 NP pour 0,7 GOx), nous nous sommes plutôt penchés sur le rôle des nanoparticules de platine. Celles-ci peuvent ne pas être toutes connectées au collecteur d'or, ou se trouver en quantité insuffisante pour oxyder la quantité importante de H_2O_2 produite par les enzymes. Nous avons décidé de mener quelques expériences supplémentaires consistant à déposer les structures hybrides en solution sur des films LB de Pt-PMAA et de nanoparticules amorçantes.

IV.4.3.2 Influence des sous-couches de nanoparticules

Des dépôts de 20 μL ont été réalisés sur des structures composées d'une part de 5 couches de film LB de nanoparticules amorçantes et d'autre part, de 5 couches de film LB de Pt-PMAA. Ceci permet de faire varier la quantité globale de platine dans les structures hybrides résultantes. Des mesures de détection de glucose ont été menées sur celles-ci et les résultats sont reportés sur la figure IV.23.

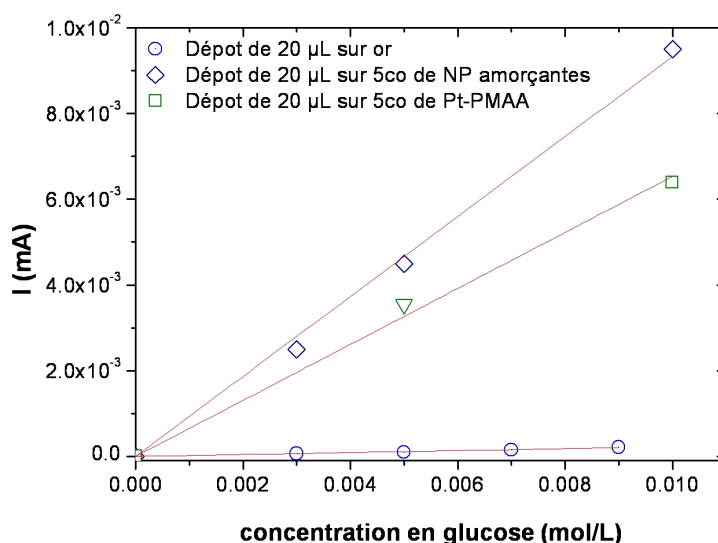


Figure IV.23 – Evolution du courant d’oxydation mesuré à 0.5 V/ECS en fonction de la concentration en glucose, pour les dépôts de 20 μL effectués sur une électrode d’or, sur une électrode recouverte de 5 couches de film LB de nanoparticules amorçantes et sur une électrode recouverte de 5 couches de film LB de Pt-PMAA.

La figure montre clairement que la présence d’une couche comportant du platine sous le dépôt modifie de manière considérable les sensibilités des électrodes. Celles-ci, sont reportées dans le tableau IV.7.

Support	Sensibilité ($\mu\text{A.L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)
Or	32
Pt-PMAA 5co	850
NP amorçantes 5co	1200

Table IV.7 – Sensibilités vis-à-vis du glucose des structures obtenues après dépôts sur différents supports, de la structure Pt-PMAA-GOx obtenue en solution (mesurées à 0.5 V/ECS).

Les sensibilités obtenues sur les électrodes préalablement couvertes de films LB de Pt-PMAA ou de nanoparticules amorçantes, sont 20 à 30 fois supérieures à celles mesurées pour des dépôts effectués sur l’or nu. Ceci suggère que le point limitant n’est pas la diffusion du glucose jusqu’à la GOx. La quantité de H_2O_2 produite étant *a priori* identique dans tous les cas, les faibles courants enregistrés pour les dépôts effectués directement sur or sont bien reliés aux nanoparticules de platine. Nous ne pouvons toutefois pas savoir si le problème est dû à l’accès de H_2O_2 au platine ou au transport électronique dans la structure.

IV.5 Conclusion

A l'issue des travaux présentés dans ce chapitre, nous avons pu étudier les comportements électrochimiques des différents systèmes hybrides, et les mettre en relation avec leur composition et leur structure. Dans les structures à base de films LB de Pt-PMAA, nous avons tout d'abord montré que les nanoparticules sont suffisamment proches pour assurer le transport des charges dans le film. L'étude du comportement électrochimique de système vis-à-vis de l'oxydation de H_2O_2 a montré que les sites actifs du platine étaient accessibles. Cependant, il est apparu nécessaire d'effectuer préalablement un conditionnement des électrodes afin d'obtenir un signal stable et reproductible. Suite à celui-ci, la réponse électrochimique montre une variation linéaire en fonction de la concentration en H_2O_2 dans une gamme de concentration allant de 10^{-6} à environ 10^{-3} mol.L $^{-1}$. Au delà, un phénomène de saturation est observé. Nous avons également montré que la réponse enregistrée dans ce système ne dépend pas du nombre de couches. Ceci tend à prouver que seule la couche à l'interface entre la structure et l'électrolyte participe aux réactions de transfert électronique hétérogène. Nous avons ensuite mis en évidence la meilleure sensibilité des films LB à base de nanoparticules amorçantes, qui s'explique par la densité de nanoparticule plus élevée dans ces films. Une corrélation peut-être soulignée entre le rapport des sensibilités enregistrées et les rapports de densité surfacique de platine dans les différentes les structures.

Enfin, les structures brosses formées à partir des films de nanoparticules amorçantes présentent également une certaine sensibilité vis à vis de H_2O_2 , ce qui indique que la formation de la brosse n'inhibe pas totalement sa diffusion jusqu'aux nanoparticules de platine. Cependant ces résultats montrent une faible reproductibilité qui est probablement due à une hydrolyse incomplète des brosses initiales de PMAAtBu. Si l'hydrolyse de la brosse n'est pas suffisante, les parties non hydrolysées qui sont hydrophobes, peuvent alors perturber la diffusion de H_2O_2 jusqu'aux nanoparticules. Les deux lots de brosses présentent des sensibilités différentes. Cependant, les échantillons qui montrent la meilleure sensibilité, se situent à des niveaux comparables ou supérieurs aux structures à base de films LB de Pt-PMAA. Il sera donc indispensable d'approfondir l'étude de la réaction d'hydrolyse sur les brosses de PMAAtBu afin d'obtenir des réponses reproductibles pour ce type de structures. De manière générale, les sensibilités mesurées sur les structures sans enzyme sont du même ordre de grandeur que celles observées dans la littérature sur des systèmes similaires.¹⁵⁴ Nous avons donc pu poursuivre l'étude des systèmes dans une configuration biocapteur.

Nous avons tout d'abord étudié la sensibilité des structures hybrides à base de films LB de Pt-PMAA. Les mesures effectuées ont montré que la quantité d'enzymes greffées était

suffisante pour détecter un courant d'oxydation proportionnel à la quantité de glucose à 0.5 V/ECS. Nous avons observé des résultats proches pour la structure de type brosse polymère. Ceci montre que même si l'enzyme est probablement plus éloignée des sites actifs du platine que dans le cas précédent (structure à base de films LB de Pt-PMAA), H_2O_2 diffuse efficacement jusqu'au platine. La sensibilité mesurée est d'ailleurs supérieure d'un facteur 2 à 4 dans ce système comparée à la structure à base de films LB de Pt-PMAA. Deux facteurs participent probablement à cette différence. Le premier est la quantité d'enzymes actives greffées. Cette dernière est environ 4 fois plus importante sur la structure de type brosse que sur la structure à base de films LB de Pt-PMAA. Le second est la sensibilité plus élevée de ces structures vis-à-vis de H_2O_2 , liée à la présence du film LB de nanoparticules amorçantes, dans lequel la densité de nanoparticules de platine est plus élevée.

Enfin, les mesures réalisées sur les dépôts effectués à partir des systèmes hybrides Pt-PMAA-GOx obtenus en solution, mettent en évidence une limitation liée à l'oxydation de H_2O_2 et/ou au transport des charges dans la structure. L'ajout d'une sous-couche contenant du platine permet en effet d'augmenter la sensibilité de l'électrode d'un facteur 20. Dans les systèmes formés en solution, le rapport GOx/nanoparticule est visiblement trop élevé pour exploiter au maximum l'activité enzymatique de la GOx.

Conclusion générale

Bilan de l'étude

Lors de ce travail, nous avons cherché à réaliser des structures hybrides platine-polymère-GOx permettant d'appréhender les effets conjoints de la nano structuration et de la composition sur leur comportement électrochimique global. Ces systèmes ont été élaborés par une approche bottom-up.

La première étape de notre travail a donc été la mise au point d'un protocole de synthèse reproductible permettant d'obtenir des briques élémentaires de façon contrôlée et possédant des caractéristiques modulables. A partir des nanoparticules de platine initialement surgreffées d'un amorceur, nous avons polymérisé du méthacrylate de tert-butyle à leur surface. La stratégie utilisée est basée sur l'association du « grafting from » et de la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP). Les analyses thermogravimétriques effectuées ont montré qu'il était possible de contrôler la taille de la couronne synthétisée en fonction de la masse théorique visée et du temps de polymérisation. Déterminer les caractéristiques des objets formés était également un enjeu majeur de ce travail. La diffusion de neutrons aux petits angles s'est avérée particulièrement utile pour déterminer la structure des objets mais aussi pour mieux comprendre l'importance de certains paramètres permettant d'obtenir des nanoparticules individualisées. Nous avons ensuite montré qu'entre 9 et 11 chaînes polymères étaient greffées par nanoparticule. Cette valeur correspond à une densité de greffage élevée, comprise entre 0.7 et 0.9 chaîne par nm².

La structure des briques élémentaires étant précisément caractérisée, nous avons cherché à élaborer des structures hybrides platine-polymère-GOx et à définir aussi précisément que possible leur structure et leur composition. Le premier système hybride a été formé en solution, après modification chimique de la couronne polymère pour obtenir du PMAA. La formation d'un ester activé nous a ainsi permis de greffer de façon covalente la GOx à proximité des cœurs de platine. Même si la structure exacte des objets formés après greffage n'est

pas connue, nous avons déterminé qu'en moyenne, le rapport nanoparticule/enzyme était de 1/0.7. Nous avons également montré que la GOx conservait 50% de son activité après greffage.

Des structures hybrides en film mince ont été réalisées dans un second temps. Deux architectures différentes ont été élaborées. La première correspond à l'organisation des nanoparticules de platine greffées de PMAA sous forme de films de Langmuir-Blodgett. Les caractérisations réalisées sur cette structure montrent que l'épaisseur d'une couche est proche du diamètre de cœur de platine. Ceci suggère que les chaînes polymères s'organisent latéralement, dans le plan du film.

La seconde architecture que nous avons obtenue est une structure de type brosse polymère. Elle est basée sur un film LB de nanoparticules amorçantes sur lequel le méthacrylate de tert-butyle a été directement polymérisé. Dans cette structure, la densité surfacique du platine est environ cinq fois plus grande que dans la structure basée sur les films LB de Pt-PMAA. Les mesures d'épaisseur suggèrent que la densité de greffage à la surface du film de nanoparticules amorçantes est d'environ 0.7 chaîne/nm², valeur proche de celle que nous avons estimée sur les objets formés en solution. Cependant, il semble que la réaction d'hydrolyse des chaînes visant à former du PMAA soit limitée dans cette configuration.

Sur ces deux structures en film mince, l'enzyme a été immobilisée *a posteriori*. Les mesures d'activité enzymatique réalisées ont montré que la structure de type brosse permettait d'immobiliser environ 4 fois plus d'enzymes par rapport à la structure basée sur les films LB de Pt-PMAA. Ceci est probablement dû à une meilleure mobilité et accessibilité des chaînes polymères dans la structure de type brosse.

Les propriétés électrochimiques des structures hybrides ont ensuite été étudiées. Dans les systèmes précurseurs en film mince, nous avons montré que les distances entre nanoparticules de platine étaient suffisamment faibles pour assurer un transport des électrons jusqu'au collecteur de courant. Nous avons également montré que les sites actifs du platine restaient accessibles à H₂O₂ et que les différences de sensibilité sont reliées à la densité surfacique de platine. Nous avons mis en évidence que dans la structure de type brosse, le manque de reproductibilité des sensibilités enregistrées était probablement dû à un mauvais contrôle de l'étape d'hydrolyse. Les structures hybrides incorporant la GOx ont ensuite été testées en détection de glucose. Les structures à base de brosses polymères sont plus sensibles que celle à base de films LB de Pt-PMAA. Ceci est probablement dû à la densité de platine et à la quantité d'enzymes immobilisées plus élevées pour la structure de type brosse. Les dépôts effectués à partir de la structure hybride formée en solution ont mis en évidence une limitation de la sensibilité due à un problème de transport de charge dans le film ou à une oxydation

d' H_2O_2 limitée. Ce problème est probablement lié à l'organisation des nanoparticules dans les dépôts qui peuvent être trop isolées les une des autres soit par les enzymes, soit par les chaînes polymères. La présence d'une sous-couche contenant des nanoparticules de platine sous ces dépôts a permis d'atténuer ce problème.

Ainsi à l'issue de nos travaux nous pouvons dire que notre objectif final est atteint. Nous avons montré qu'il était possible de réaliser différentes nanostructures hybrides, toutes basées sur les mêmes constituants (nanoparticules, polymère et enzyme). Les premiers résultats enregistrés en configuration biocapteur illustrent ce succès puisque nous avons pu mettre en évidence des comportements différents pour les différents systèmes. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives et montrent l'intérêt de notre approche quand à la réalisation de nanostructures hybrides modèles permettant d'améliorer la compréhension et l'optimisation du fonctionnement de biocapteurs nanostructurés.

Perspectives

En premier lieu, des études doivent être réalisées pour compléter ce travail. Il sera ainsi nécessaire de revenir sur le contrôle de l'étape d'hydrolyse sur la structure de type brosse afin d'améliorer la reproductibilité de son comportement électrochimique. Un autre aspect devant être abordé concerne l'évaluation de la réponse des différentes nanostructures vis-à-vis d'interférents (acide ascorbique, acétaminophène...). En effet, le potentiel utilisé lors de nos expériences reste assez élevé (+0.5 V/ECS) et suffisamment haut pour oxyder d'autres espèces que H_2O_2 . Ces interférents étant généralement des molécules plus grandes que H_2O_2 ou O_2 , il est possible que l'enrobage des nanoparticules constitue une barrière limitant leur diffusion.

Dans les perspectives ouvertes par ce travail, figurent la modification de différents paramètres permettant de moduler les caractéristiques des nanostructures. Les possibilités sont ici nombreuses du fait de la versatilité de l'approche adoptée et nous pouvons en indiquer quelques exemples. Concernant les systèmes à base de films LB de Pt-PMAA, il est possible, comme nous l'avons vu, d'augmenter la densité surfacique de platine en jouant sur la taille des chaînes polymères. Il sera donc particulièrement intéressant de procéder au greffage de GOx et de mesurer l'impact du changement de ce seul paramètre structural sur la performance de détection. Pour ces structures, il est également envisageable d'augmenter la densité de platine au sein de la structure en y ajoutant une certaine proportion de nanoparticules dotées d'enrobage de faible poids moléculaire. Concernant les structures de type brosse, la

longueur des chaînes peut également être modifiée. Mais nous pouvons ici aussi jouer sur la densité de greffage en formant la brosse à partir d'un film comportant un mélange de nanoparticules amorçantes et de nanoparticules dotées d'enrobages non amorçants.

De nouvelles expériences sont également à mener en utilisant la structure hybride Pt-Polymère-GOx formée en solution. Il faudra naturellement tenter de mieux caractériser sa constitution. En l'état, ce système présente déjà l'intérêt d'une manipulation aisée qui permet d'envisager son association avec différents types de supports et en particuliers des supports poreux conducteurs. Nous pourrions ainsi accéder à des biocapteurs présentant une véritable structure tridimensionnelle.

A plus long terme, il est possible d'étendre l'approche développée dans ce travail à l'utilisation d'autres espèces biologiques (enzymatiques ou non), ou d'autres types de polymères. Tandis que nous avons utilisé la technique du « grafting from », l'approche dite du « grafting to » pourrait être par exemple utilisée, avec pour conséquence une liberté plus importante dans le choix de la composante polymère.

ANNEXES

Annexe A

Protocoles de synthèse

A.1 Synthèse des nanoparticules amorçantes

A.1.1 Synthèse des nanoparticules fonctionnalisées

Le protocole de synthèse des nanoparticules de platine, utilisé lors de cette étude, est celui décrit par H. Perez dans l'article *Synthesis and Characterization of Functionalized Platinum Nanoparticles*, publié en 1999 dans *Chemistry of Materials*.¹²³

612 mg de PtCl_4 sont dissouts sous agitation dans un tricol de 1L contenant 150 mL d'hexylamine, jusqu'à obtenir une solution orange (solution 1). 664 mg de 2,2'-disulfure de diamino-diphényle sont dissouts dans une solution de méthanol/hexylamine (30 mL/30 mL)(solution 2). 606 mg de borhydrure de sodium (NaBH_4) sont dissouts dans une solution de méthanol/eau (40 mL/40 mL). Une fois la dissolution de ce dernier complète, 40 mL d'hexylamine sont ajoutés (solution 3). La solution 3 est alors rapidement ajoutée à la solution 1, sous une agitation vigoureuse, à température ambiante. Le milieu devient alors marron au bout de quelques secondes. 20 s après le changement de couleur, la solution 2 est ajoutée au milieu réactionnel. 3 min 30 s après le changement de couleur, 400 mL d'eau distillée sont ajoutés. La solution obtenue est alors agitée pendant 10 min avant d'être transférée dans une ampoule à décanter. Une fois la séparation de phase visible, la phase aqueuse est évacuée. La phase organique est alors lavée à plusieurs reprises (3 fois) avec la même quantité d'eau (400 mL). Le volume du milieu réactionnel est alors réduit à 5-6 mL avec un évaporateur rotatif à 35°C. 600 mg de 2,2'-disulfure de diamino-diphényle et 30 mL d'éthanol sont ajoutés à la solution réduite et le tout est laissé sous agitation pendant 12h. La solution est ensuite centrifugée pour obtenir un précipité noir. Ce dernier est alors lavé à 2 reprises avec une solution éthanol/éther (10 mL /20 mL), puis une dernière fois uniquement à l'éther.

Le précipité est finalement séché sous azote pour obtenir une poudre noire de nanoparticules fonctionnalisées.

A.1.2 Surgreffage de l'amorceur

A partir des nanoparticules de platine fonctionnalisées, il est possible de greffer sur les fonctions amines diverses molécules. Nous avons introduit à la surface un amorceur de polymérisation en suivant le protocole décrit dans l'article *Polymer-Grafted-Platinum Nanoparticles : From Three-Dimensional Small-Angle Neutron Scattering Study to Tunable Two-Dimensional Array Formation* publié en 2009 dans *Langmuir*.¹²⁷ Les quantités de réactifs utilisées sont calculées pour des nanoparticules fonctionnalisées dont le %_wMO est de 14%.

250 mg de nanoparticules de platine fonctionnalisées sont dissouts sous agitation et sous azote, dans un tricol de 250 mL contenant 80 mL de diméthylacétamide (DMAc). Lorsque la dissolution est totale, 129 mg de diméthylaminopyridine (DMAP) sont ajoutés au milieu réactionnel. Une fois la DMAP dissoute, 415 mg (223 mL) de bromure de bromo-isobutyrate sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24h. La solution est alors précipitée goutte à goutte dans 500 mL d'acétonitrile. Le précipité obtenu est ensuite lavé à 2 reprises avec une solution acétonitrile/éther (10 mL /20 mL), puis une dernière fois avec 20 mL d'éther. Le précipité est alors séché sous azote pour obtenir une poudre noire de nanoparticules amorçantes.

A.2 Polymérisation en solution sur les nanoparticules et hydrolyse

A.2.1 Synthèse

A partir des nanoparticules amorçantes synthétisées, nous avons polymérisé à leur surface du méthacrylate de n-butyle (MAnBu) et du méthacrylate de tert-butyle (MAtBu). Le protocole présenté ci-dessous correspond à la synthèse de Pt-PMAtBu à partir d'une solution initiale à 5 mg/mL en nanoparticules amorçantes.

60 mg de nanoparticules amorçantes sont dissouts dans un ballon de 250 mL contenant 12 mL de diméthylacétamide (DMAc). La solution de nanoparticules amorçantes ainsi que les solutions de monomères de DMAc et de PMDETA (ligands) sont dégazées à l'azote pendant 30 min. 8 mg de bromure de cuivre (CuBr) sont introduits dans un tricol muni

d'un réfrigérant, préalablement conditionné sous azote. 1mL de DMAc dégazé et 17.3 μL de PMDETA sont alors ajoutés et la solution est agitée jusqu'à dissolution complète du cuivre. La solution de nanoparticules amorçantes est alors ajoutée. Les réactifs ont été introduits dans des proportions Cu/ligand/amorceur de 2/3/1. 1.70 mL de méthacrylate de butyle sont alors ajoutés ($(M_n^{\text{théorique}}=55\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1})$) avant que le milieu réactionnel soit plongé dans un bain à 60°C. En fin de réaction, le tricol est plongé dans la glace pour stopper la réaction. La solution est alors lavée plusieurs fois avec un mélange chloforme/eau (20 mL/20 mL) pour extraire le cuivre. Le milieu réactionnel est finalement précipité dans un mélange froid de méthanol/eau (90/10) pour récupérer les nanoparticules greffées.

A.2.2 Détermination du taux de conversion par mesures gravimétriques

Les taux de conversion ont été déterminés par gravimétrie. Pour ce faire, les échantillons prélevés au cours d'une polymérisation sont transférés dans une coupelle en aluminium dont on connaît la masse à vide. Les échantillons sont pesés avant et après séchage. A $t=0$, un échantillon est prélevé, cet échantillon permet de calculer le taux de solide (sels métalliques par exemple dans le cas d'une ATRP, auxquels il faut rajouter les nanoparticules amorçantes pour une polymérisation en surface).

Théoriquement, le taux de conversion (p) est défini par l'expression suivante :

$$p = \frac{[M]_0 - [M]}{[M]_0} \quad (\text{A.1})$$

Avec $[M]$ la concentration en monomère dans le milieu et $[M]_0$ la concentration initiale.

Expérimentalement, dans le cas d'une polymérisation sur les nanoparticules, le taux de conversion peut être calculé à partir des prélèvements effectués selon la formule suivante :

$$p = \frac{m_{\text{sec}}/m_{\text{liq}} - \Phi_{\text{sel}}}{\Phi_{\text{monomère}}} \quad (\text{A.2})$$

Avec m_{sec} , la masse sèche du prélèvement, m_{liq} sa masse initiale, Φ_{sel} la fraction massique de sel (metal + nanoparticules) et $\Phi_{\text{monomère}}$, la fraction massique initiale en monomère.

A.3 Synthèse de brosses de PMAtBu

Le protocole utilisé pour synthétiser les brosses polymères est proche de celui utilisé lors de la polymérisation sur les nanoparticules en solution.

Le support (électrode ou wafer recouvert de nanoparticules amorçantes) est préalablement introduit dans le réacteur qui est ensuite conditionné pour être sous atmosphère inerte. Des solutions de méthacrylate de tert-butyle (monomère), d'éthyl- α -isobutyrate (amorçeur), de PMDETA (ligand) et d'acétonitrile sont dégazées sous azote pendant 30 min. 662 mg de cuivre sont introduits dans un tricol de 250 mL. 1.92 mL de PMDETA et 31.8 mL d'acétonitrile sont ajoutés et le milieu est agité jusqu'à dissolution complète du cuivre (couleur verte). La solution est alors transférée dans le réacteur contenant les supports. Le monomère (125 mL, correspondant à $M_n^{théorique}=71\ 100\ \text{g.mol}^{-1}$) puis l'amorçeur (0.226 mL) sont ensuite ajoutés. Le réacteur est alors plongé dans un bain à 60°C en conservant un bullage d'azote. En fin de réaction, le réacteur est plongé dans la glace, puis les supports sont extraits et plongés dans le chloroforme pour éliminer les chaînes non greffées. Le reste de la solution est lavée dans un mélange chloroforme/eau, puis précipitée dans une solution froide méthanol/eau (90/10) pour récupérer les chaînes polymérisées en solution.

Annexe B

Diffusion de Neutrons aux Petits Angles

La Diffusion de Neutrons aux Petits Angles (DNPA) est la principale technique que nous avons utilisé pour caractériser en détail les nanoparticules greffées de polymère dans cette étude. La description présentée dans cette annexe, complète celle effectuée dans le chapitre II. Le principe de la technique ainsi que le déroulement d'une expérience et le traitement des données sont ici décrits.

B.1 Les neutrons

Les neutrons ont été découverts en 1932 par James Chadwick. Ils sont à la fois une onde et une particule, cette dualité leur confère donc une longueur d'onde et une énergie. La longueur d'onde λ , associée à la particule, est définie par la relation suivante :

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (\text{B.1})$$

où h est la constante de Planck, m la masse du neutron et v sa vitesse.

Le neutron étant une particule, il est également défini par son énergie cinétique :

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{\hbar^2 k^2}{2m} \quad (\text{B.2})$$

avec k , le nombre d'onde ($k=2\pi/\lambda$). Cette expression donne l'énergie en joules. Elle est donnée en électron-volt par l'expression suivante :

$$E = \frac{\hbar^2}{2m\lambda^2} \quad (\text{B.3})$$

Lorsque les neutrons sont produits par un réacteur, les neutrons utilisés pour l'étude de la matière molle sont produits par une source froide donc la longueur d'onde se situe typiquement entre 3 et 25 Å, ce qui correspond à une énergie comprise entre 10^{-1} et 10 meV.

B.2 Interaction neutron-matière

Une expérience de DNPA consiste à envoyer sur un échantillon un faisceau collimaté de neutrons monochromatique, de longueur d'onde λ , et à analyser la variation du nombre de neutrons diffusés (l'intensité) en fonction de leur angle de diffusion, grâce à un détecteur. L'interaction entre les neutrons et les atomes présents dans l'échantillon est ici brièvement introduite, des informations complémentaires sont disponibles dans la littérature.^{140,141}

Un faisceau de neutrons monochromatique de longueur d'onde λ est considéré comme une onde plane dont la fonction de propagation peut s'écrire de la forme suivante (ν étant la fréquence de l'onde) :

$$\Psi = e^{i(kz - 2\pi\nu t)} \quad (\text{B.4})$$

Lorsque cette onde interagit avec un atome de l'échantillon, elle est diffusée dans toutes les directions. Cette onde diffusée est sphérique et de même longueur d'onde λ que l'onde incidente (car on supposera la diffusion élastique), et sa fonction d'onde est définie par :

$$\Psi_{diff} = -f(\vec{k}, \vec{k}') \frac{e^{i(k'z - 2\pi\nu t)}}{r} \quad (\text{B.5})$$

Avec $-f(\vec{k}, \vec{k}')$ l'amplitude de la diffusion et \vec{k} et \vec{k}' , les vecteurs d'onde incidents et diffusés. On définit alors un vecteur de diffusion \vec{q} tel que $\vec{q} = \vec{k} - \vec{k}'$ (figure B.1)

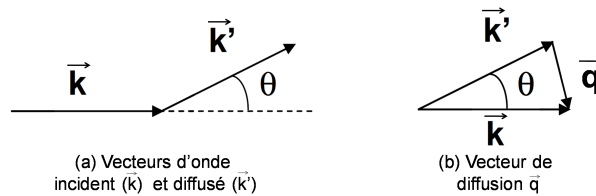


Figure B.1 – Définition du vecteur de diffusion \vec{q}

Le vecteur de diffusion a une amplitude, notée q , telle que :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{B.6})$$

Ce paramètre q , est le plus important. Sa dimension est l'inverse d'une longueur. Le domaine des valeurs de q doit être du même ordre de grandeur que l'inverse des tailles caractéristiques de l'échantillon mesuré.

On considère maintenant un flux de neutrons, $\phi(\lambda)$ ($\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$), qui arrive sur l'échantillon, lequel diffuse alors un nombre de neutrons $I(\theta)$ (s^{-1}), sur une surface S située à une distance r (correspondant à un angle $\Delta\Omega=S/r$) (figure B.2).

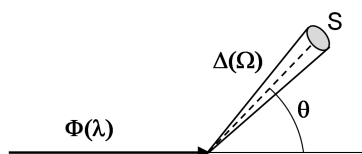


Figure B.2 – Section efficace de diffusion.

L'intensité peut alors s'écrire :

$$I(\theta) = \phi(\lambda) \frac{d\sigma(\theta)}{d\Omega} \cdot \Delta\Omega \quad (\text{B.7})$$

Où $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ représente la section efficace différentielle de diffusion, qui correspond au nombre total de neutrons diffusés par seconde dans l'angle $\Delta\Omega$.

Il est possible de réécrire l'expression $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ en considérant l'amplitude de diffusion $A(q)$ (équation B.9, qui est la transformée de fourier de la densité de longueur de diffusion $\rho(r)$ (équation B.8) de l'échantillon de volume V contenant n atomes de longueur de diffusion b_i .

$$\rho(r) = 1/V \sum_i^n b_i \delta(r - r_i) \quad (\text{B.8})$$

$$A(q) = \int \rho(r) e^{iqr} dr \quad (\text{B.9})$$

$\frac{d\sigma}{d\Omega}$ peut alors s'écrire sous la forme suivante :

$$\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega} = \langle A(q)A(-q) \rangle = \sum_{i,j}^{n,n} \langle \rho_i \rho_j \rangle \langle e^{iq(r_i - r_j)} \rangle \quad (\text{B.10})$$

Les crochets $\langle \rangle$ indiquent une moyenne sur l'ensemble de l'échantillon. Cette relation peut finalement s'écrire selon la formule suivante¹⁴⁰ :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = nb_{inc}^2 + b^2 \sum_{i,j}^{n,n} \langle e^{iq(r_i - r_j)} \rangle \quad (\text{B.11})$$

avec $b_{inc}^2 = \langle b_i^2 \rangle - \langle b_i \rangle^2$ et $b = b_{coh} = \langle b_i \rangle$

L'intensité totale diffusée est donc la somme d'un terme de diffusion incohérente et d'un terme de diffusion cohérente. Ce dernier est lié aux corrélations spatiales entre noyaux et permet d'avoir accès aux informations sur la structure des objets. C'est ce terme qui nous intéresse ici. Le terme de diffusion incohérente provient de l'absence de corrélation entre la position considérée et l'état de spin ou l'isotope du noyau qui l'occupe. La diffusion incohérente est utilisée pour obtenir des informations sur la dynamique de l'échantillon. Dans notre cas, la diffusion incohérente sera considérée comme un bruit de fond plat qu'il faudra soustraire à notre signal.

B.3 Contraste et variation de contraste

B.3.1 Contraste

Pour pouvoir mesurer une intensité diffusée significative, il est nécessaire que l'objet présente un contraste suffisant avec le milieu dans lequel il se trouve. Ce contraste se calcule à partir de la différence entre les densités de longueur de diffusion (ρ) de l'objet et du milieu. Le ρ d'un composant se calcule à partir des longueurs de diffusion cohérente b_i des atomes composant l'objet diffusant (équation B.12).

$$\rho = \frac{N_A d}{M} \sum_i a_i b_i \quad (\text{B.12})$$

Où d est la densité du composé en g.cm^{-3} , M sa masse molaire en g.mol^{-1} , N_A le nombre d'Avogadro et a_i le nombre d'atomes de longueur de diffusion b_i dans l'objet. Les valeurs de b_i des atomes les plus courants sont présentés dans le tableau B.1

élément chimique	Longueur de diffusion (b) (10^{12} cm)	Masse molaire (g.mL^{-1})
C	0.665	12
O	0.5805	16
N	0.926	14
H	-0.374	1
D	0.667	2

Table B.1 – Longueur de diffusion cohérente de différents éléments chimiques.

Le contraste se définit comme étant le carré de la différence entre densités de longueurs de diffusion de l'objet et du milieu ($(\Delta\rho)^2$) et intervient dans l'expression de l'intensité diffusée.

B.3.2 Variation de contraste

La particularité de la DNPA réside dans la possibilité de modifier le contraste entre les différents constituants d'un système grâce au marquage isotopique et la substitution entre l'hydrogène (noté H) et le deutérium (noté D). Dans le cas de l'étude d'un système à 3 composants (composant a, composant b et solvant), le signal sera complexe, dépendant des proportions volumiques des composants a et b par rapport au solvant, et également de leur contraste.

En mélangeant un solvant avec son équivalent deutéré, la densité de longueur de diffusion du mélange va changer (x est la fraction volumique en solvant deutéré) :

$$\rho_{\text{mélange}} = x \times \rho_{\text{SolvantD}} + (1 - x) \times \rho_{\text{SolvantH}} \quad (\text{B.13})$$

En ajustant la fraction volumique de solvant deutéré, il est possible d'obtenir que la densité du solvant soit égale à n'importe quelle valeur comprise entre ρ_{solvantH} et ρ_{solvantD} . Dans le système complexe précédemment décrit, il est possible de supprimer la contribution à l'intensité diffusée d'un des 2 composés, si leur densité de longueur de diffusion est comprise entre ces deux valeurs limites. Il suffit alors d'égaliser la densité de longueur de diffusion du solvant avec celle du composant dont on veut éteindre la contribution. Le contraste sera alors nul entre le solvant et ce composant, l'intensité diffusée par le système ne contiendra que la contribution de l'autre composant. Cette technique puissante est nommée variation de contraste. Son illustration appliquée à notre système est présentée dans la figure B.3.

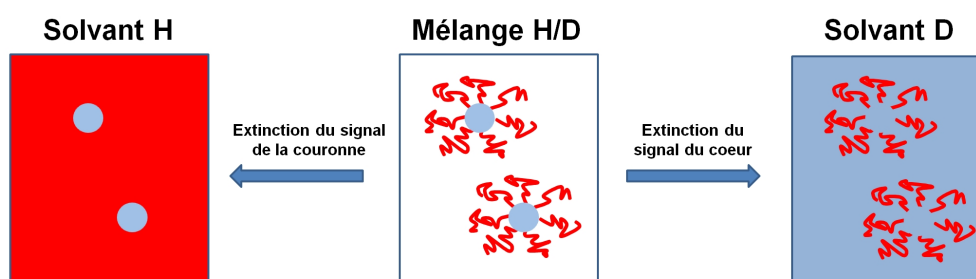


Figure B.3 – Illustration de la technique de variation de contraste dans le cas de nanoparticules de platine greffées de polymère.

B.4 Mesure et traitement

B.4.1 Mesure

Une mesure de DNPA est réalisée en envoyant un faisceau de neutrons monochromatique de longueur d'onde λ , sur l'échantillon. Les neutrons sont alors diffusés, et arrivent sur un détecteur où ils sont comptés en fonction de leur position par rapport au centre du détecteur (qui correspond au faisceau incident). Ceci est schématisé sur la figure B.4, qui représente un appareil de diffusion de neutrons aux petits angles.

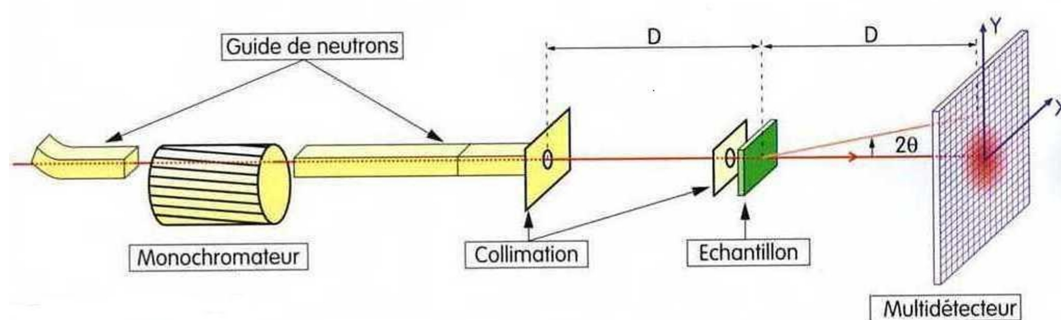


Figure B.4 – Schéma d'un spectromètre de diffusion aux petits angles.

Pour obtenir l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion (q), on regroupe les intensités diffusées à même distance du centre du détecteur (ceci est valable pour des échantillons isotropes). C'est à partir de cette courbe de l'intensité en fonction du vecteur d'onde (q) que va être obtenu l'ensemble des informations concernant l'échantillon. Il est nécessaire d'adapter la gamme de q aux distances caractéristiques de l'échantillon ($R \approx 1/q$). Pour cela, il est possible de faire varier soit la distance échantillon-détecteur (D), soit la longueur d'onde (λ). Ces deux paramètres restent fixes pendant la mesure. La combinaison d'une longueur d'onde et d'une distance est appelée configuration. En fonction des dimensions de ce que l'on cherche à observer, nous aurons besoin d'une plus ou moins grande gamme de q . Il est alors possible de faire plusieurs configurations pour obtenir une gamme de q plus importante. Sur les expériences menées sur PACE, nous avons généralement utilisé 2 configurations. La première ($D=1\text{m}$, $\lambda=6\text{\AA}$) correspond à une configuration « grands angles », la seconde ($D=5\text{m}$, $\lambda=6\text{\AA}$), à une configuration « moyens angles ». Ces deux configurations nous ont permis d'étudier nos échantillons dans une gamme de q comprise entre 0.005\AA^{-1} et 0.3\AA^{-1} .

B.4.2 Traitement

Une fois la mesure effectuée, il est nécessaire de traiter l'intensité brute diffusée pour obtenir une intensité absolue. Il faut tout d'abord soustraire la contribution de la cellule de mesure (cellule vide, cv). L'intensité brute doit également être normalisée par l'épaisseur de l'échantillon (e) et par la transmission (T) qui correspond à l'atténuation du faisceau direct passant dans l'échantillon.

L'efficacité du détecteur doit ensuite être corrigée en mesurant le spectre de diffusion d'un échantillon incohérent de référence qui est 1 mm d'eau. Cette mesure permet de calculer le facteur de renormalisation (F) qui permet d'accéder à des valeurs absolues en intensité (en cm^{-1}). Plus précisément, pour mesurer le facteur de renormalisation, on mesure un échantillon qui diffuse fortement (le graphite) en présence ou non d'un atténuateur puis le faisceau direct.

Ainsi, l'intensité absolue est obtenue par :

$$I_{abs} = F \times \frac{\frac{I_{ech}}{T_{ech}e_{ech}} - \frac{I_{cv}}{T_{cv}e_{cv}}}{\frac{I_{H_2O}}{T_{H_2O}e_{H_2O}} - \frac{I_{cv}}{T_{cv}e_{cv}}} \quad (\text{B.14})$$

Enfin, il est possible de soustraire le bruit de fond électronique du détecteur en mesurant le spectre d'un fort absorbant de neutrons, le cadmium par exemple. Lorsque tout ce traitement est fait, il reste à soustraire la partie incohérente du signal qui correspond au signal du solvant pour un échantillon liquide.

B.5 Intensité diffusée

Lorsque les traitements des données brutes sont achevés, le signal obtenu correspond à l'intensité absolue diffusée en fonction de q , qui provient exclusivement de la diffusion cohérente. Ceci va nous permettre d'obtenir des informations sur la forme et l'organisation des objets dans la solution. L'expression générale de l'intensité diffusée par des objets de forme quelconque en régime concentré fait intervenir un facteur de forme $P(q)$, qui décrit la taille et la géométrie des objets, et un facteur de structure $S(q)$, qui décrit les corrélations entre objets dans le système.

Dans le cas d'objets centrosymétriques, l'expression de l'intensité diffusée peut être simplifiée et réécrite sous la forme suivante :

$$I(q) = \Phi V_{objet} (\Delta\rho)^2 P(q) S(q) \quad (\text{B.15})$$

Avec Φ , la fraction volumique en objets diffusants, $(\Delta\rho)^2$ le contraste objet/solvant, V le volume d'un objet, $P(q)$ le facteur de forme et $S(q)$ le facteur de structure.

B.5.1 Facteur de forme $P(q)$

Le facteur de forme est fonction de la forme d'un objet individuel. Pour les objets de formes géométriques simples, il peut être calculé analytiquement. En solution assez diluée, le facteur de structure est égal à 1. Le signal dépend alors seulement du facteur de forme. Il est alors possible de déterminer la forme et les dimensions caractéristiques de l'objet diffusant. Les différents modèles utilisés lors de cette étude sont présentés au fur et à mesure de leur utilisation au chapitre II.

B.5.2 Facteur de structure $S(q)$

Le facteur de structure représente les corrélations entre les objets. Il permet de vérifier si le système est attractif ou répulsif et d'observer l'intensité des interactions. Lors de l'étude effectuée, nous avons systématiquement travaillé en solution suffisamment diluée pour pouvoir négliger les corrélations inter-objets, et par conséquent nous avons considéré systématiquement que $S(q)=1$.

B.5.3 Calcul de la masse de l'objet diffusant

L'intensité diffusée lorsque q tend vers 0 est proportionnelle à la compressibilité osmotique $(Cd\pi/dC)^{-1}$. Dans le cas de la diffusion par une macromolécule homogène de masse M , de longueur de diffusion b , de volume spécifique ν , à la concentration C , dans un solvant de longueur de diffusion b_0 et de volume spécifique ν_0 , cette intensité peut alors s'exprimer sous la forme suivante :

$$\lim_{q \rightarrow 0} I(q) = (b - b_0 \frac{\nu}{\nu_0})^2 \left(\frac{C}{M} \right)^2 kT(Cd\pi/dC)^{-1} \quad (\text{B.16})$$

A la limite $C \rightarrow 0$, la solution est idéale : $(Cd\pi/dC)^{-1} = (kTC/M)^{-1}$. L'équation devient :

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I_{q \rightarrow 0}}{C} \right) = \left(\frac{b - b_0 \frac{\nu}{\nu_0}}{M} \right)^2 M \quad (\text{B.17})$$

Si la macromolécule est faite de N diffuseurs élémentaires de longueur de diffusion b_1 , de

masse m_1 de volume ν_1 , alors $M=Nm_1$, $\nu=\nu_1$ et $b=Nb_1$. L'équation devient donc :

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I_{q \rightarrow 0}}{C} \right) = K^2 M \text{ avec } K^2 = \left(\frac{b_1 - b_0 \frac{\nu_1}{\nu_0}}{m_1} \right) \quad (\text{B.18})$$

En extrapolant l'intensité diffusée à vecteur d'onde nul et à concentration nulle, il est donc possible de mesurer la masse de l'objet diffusant. En pratique, il faudra faire plusieurs mesures à faibles concentrations afin d'extrapoler les résultats à concentration en objet diffusant nulle.

En faisant un développement limité classique, la pression osmotique peut s'exprimer selon l'équation suivante :

$$(Cd\pi/dC)^{-1} = (kTC/M)^{-1}(1 - 2MA_2C + \dots) \quad (\text{B.19})$$

d'où

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I_{q \rightarrow 0}}{C} \right) = K^2 M(1 - 2MA_2C + \dots) \quad (\text{B.20})$$

où A_2 est le second coefficient du viriel. Celui-ci représente les interactions entre particules. Ce coefficient d'interaction entre deux objets est directement accessible grâce à la pente des droites représentant l'intensité diffusée en fonction de la concentration en objet diffusant. Une pente négative ($A_2 > 0$) reflète des interactions répulsives, tandis qu'une pente positive ($A_2 < 0$) est due à des interactions attractives.

Annexe C

Réflectivité de neutrons

La réflectivité de neutrons est une technique permettant de mesurer les épaisseurs et la composition chimique d'une ou plusieurs couches minces sur une surface. Les épaisseurs caractéristiques mesurables lors d'une expérience sont comprises entre 1 nm et quelques centaines de nm. Le principe de cette technique ainsi que les montages expérimentaux utilisés sont présentés dans cette annexe.

C.1 Principe de la réflectivité de neutrons

Comme nous l'avons défini dans l'annexe précédente, les neutrons sont à la fois une onde et une particule. Leur énergie peut donc être définie selon l'expression suivante :

$$E = \frac{\hbar^2 k^2}{2m} \quad (\text{C.1})$$

avec k le nombre d'onde ($k=2\pi/\lambda$), \hbar étant la constante de Planck réduite et m la masse du neutron.

Des phénomènes de réfraction et de réflexion, analogues à ceux décrits en optique classique sont observés. Il est ainsi possible de définir un indice de réfraction neutronique n , défini comme le rapport des vecteurs d'onde k dans le matériau et dans le vide :

$$n^2 = \frac{k_n^2}{k^2} = 1 - \frac{\lambda}{\pi} N_b \quad (\text{C.2})$$

avec N_b (appelé également ρ dans l'annexe précédente), la densité de longueur de diffusion du milieu, calculée à partir de la composition atomique et de la densité du milieu ($Nb = \rho = \frac{N_A d}{M} \sum_i a_i b_i$).

En utilisant les lois de Descartes pour décrire la réflexion d'un faisceau de neutrons sur une surface plane (figure C.1), il est possible de définir la réflectivité R . La réflectivité correspond au rapport des intensités du faisceau réfléchi spéculairement et du faisceau incident. La réflectivité est une fonction dépendant uniquement du vecteur de diffusion q (avec $q = 4\pi/\lambda \sin\theta$).

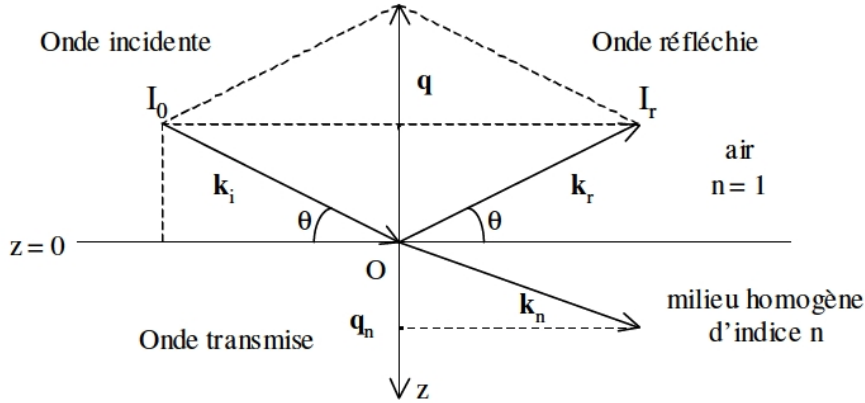


Figure C.1 – Réflexion sur une surface plane.

Pour un système composé de nombreuses couches, chacune ayant un indice n_p , la réflectivité de l'interface entre les couches p et $p+1$, à l'expression suivante :

$$R = \frac{|B_p|}{|A_p|} = \left| \frac{1 - \frac{u'(z_{p/p+1})}{iq_p u(z_{p/p+1})}}{1 + \frac{u'(z_{p/p+1})}{iq_p u(z_{p/p+1})}} \right| \quad (C.3)$$

Où A_p et B_p sont respectivement les amplitudes de l'onde se propageant vers l'intérieur et l'extérieur du matériau, $q_p = q^2 - 4\pi N_b$, et où $u(z_{p/p+1})$ et $u'(z_{p/p+1})$ sont des fonctions de $z_{p/p+1}$ et q_{p+1} .

A partir de cette équation, il est donc possible de calculer la réflectivité pour la dernière interface (dernière couche/matériaux massif), puis de calculer récursivement la réflectivité de chaque interface jusqu'à la surface, et ainsi obtenir la réflectivité du système étudié.

Jusqu'à maintenant, nous avons toujours supposé que l'interface entre la couche p et la couche $p+1$ était parfaite, c'est à dire que le N_b présentait une discontinuité à l'interface (figure C.2a). Cependant, dans la pratique, les interfaces ne sont pas si abruptes à cause de deux phénomènes. Il est possible que l'interface soit rugueuse, c'est à dire que le passage d'une couche à l'autre n'est pas toujours situé à la même distance de la surface. Ceci peut également être dû à une interdiffusion : deux matériaux formant deux couches diffusent

souvent légèrement l'un dans l'autre, créant une transition non abrupte.

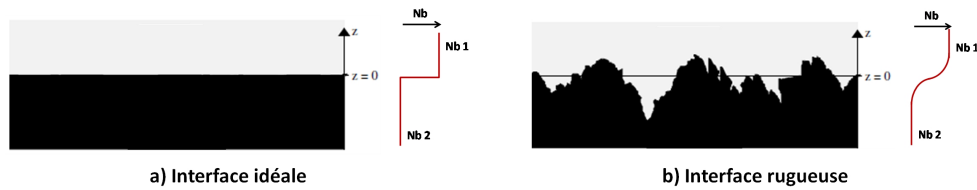


Figure C.2 – Profil de N_b d'une interface idéale (a) et d'une interface rugueuse (b).

Pour tenir compte de ce phénomène, la réflectivité R obtenue pour une interface parfaite est multipliée par un facteur de type Debye-Waller qui permet d'obtenir un profil de N_b continu dans l'échantillon (figure C.2b).

C.2 Mesure et traitement

Les expériences de réflectivité de neutrons ont été effectuées sur le réflectomètre EROS au LLB avec la collaboration de Fabrice Cousin. Les neutrons disponibles ont une longueur d'onde comprise entre 3 et 25Å. Un schéma du réflectomètre est présenté dans la figure C.3.

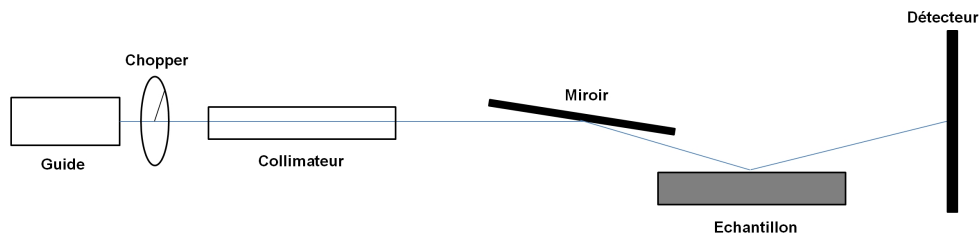


Figure C.3 – Schéma d'un réflectomètre de neutrons.

Le spectromètre utilisé fonctionne en temps de vol à l'aide d'un chopper placé à la sortie du guide. Celui-ci permet de passer d'un flux continu de neutrons à des bouffées d'une durée Δt . Les neutrons sont ensuite collimatés pour diminuer la divergence du faisceau, puis dirigés vers l'échantillon. Ce dernier est placé sur un goniomètre afin de régler son orientation. Lors de notre étude, nous avons utilisé deux types de configuration.

La première correspond à l'étude d'un échantillon à l'interface air-solide (figure C.4a). Nous l'avons utilisée notamment pour déterminer l'épaisseur des films LB. Les échantillons ont été étudiés à des angles d'incidence de 0.93°, 1.62° et 3° permettant d'avoir une gamme de q suffisamment large pour voir le plateau de réflexion totale et les oscillations situées à petits q . La seconde correspond à l'étude d'échantillons à l'interface liquide/solide (figure C.4b), utilisée pour déterminer l'épaisseur des brosses polymères en matchant le signal de

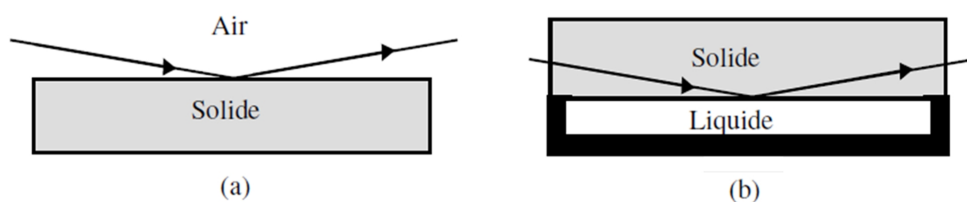


Figure C.4 – 2 types de configuration en réflectivité de neutrons : interface solide-air (a) et interface solide-liquide (b).

l'or. Dans cette configuration, le faisceau de neutron arrive par le wafer de silicium et se réfléchit à l'interface entre le matériau et le liquide. Les mesures ont ici été effectuées à des angles d'incidence de 0.987° et 2° .

Une fois les données obtenues à différents angles normalisées et regroupées sur un même spectre, les données ont été ajustées avec le logiciel du LLB *refit*. Ce dernier permet de créer un profil de couches dont il est possible de paramétrer l'épaisseur, la densité de longueur de diffusion et la rugosité puis d'ajuster la courbe de réflectivité théorique obtenue aux données expérimentales.

Annexe D

Film de Langmuir-Blodgett

Le principe de la technique de Langmuir-Blodgett a été décrite dans le chapitre III. Dans cette annexe, seule des descriptions complémentaires des isothermes, du calcul de la distance interparticules et des différents types de transfert utilisés sont présentées.

D.1 Isotherme de compression

Après l'évaporation du solvant utilisé pour épandre les objets à la surface de la cuve, ces derniers sont comprimés par déplacement de la barrière mobile. En connaissant la quantité d'objet épandu, il est alors possible d'étudier l'évolution de la surface par objet en fonction de la pression de surface (Π en mN/m). Cet enregistrement, effectué à température constante, est appelée isotherme de compression.

D.1.1 Allure de l'isotherme de compression

L'allure de l'isotherme de compression dépend des caractéristiques physico-chimiques des molécules épandues, de la température et de la nature de la sous-phase. Le tracé schématique de l'isotherme de compression pour une molécule amphiphile est présenté sur la figure D.1.

La compression du film LB peut être décrite de la manière suivante : lorsque la monocouche est comprimée, elle traverse des régions appelées phases, de plus en plus organisées, identifiées par des discontinuités dans l'isotherme. La transition d'une phase à une autre se traduit par une discontinuité, ou par la présence d'un plateau sur l'isotherme de compression. Une terminologie simple pour décrire les quatres phases principales d'une compression d'une molécule amphiphile a été introduite par Harkins en 1952 et est résumée ci-dessous.

- phase gazeuse (G) : les molécules n'interagissent pas entre elles.

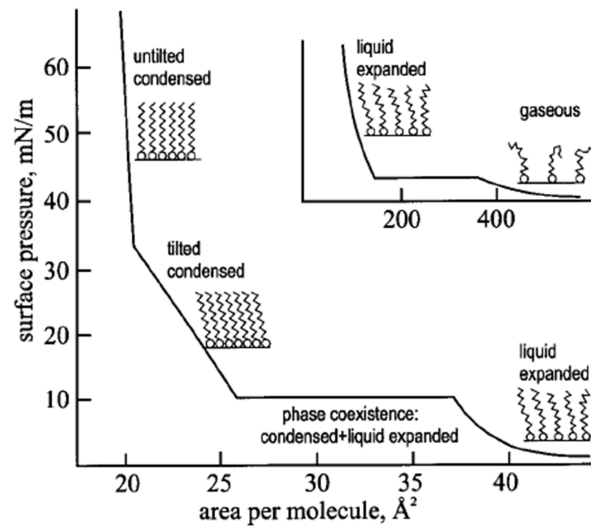


Figure D.1 – Représentation schématique d’une isotherme de compression pour une molécule amphiphile et orientation des molécules dans les différentes phases.¹⁵⁵

- phase liquide expansée (L_1) : En augmentant la pression latérale sur les molécules, l’espace disponible diminue et les nanoparticules commencent à s’organiser.
- phase liquide condensée (L_2) : L’augmentation supplémentaire de la pression de surface mène à une transition entre la phase liquide expansée et la phase liquide condensée. Cette transition est généralement marquée par un plateau traduisant une transition de phase du premier ordre. Dans la phase liquide condensée, la monocouche est moins compressible que dans la phase expansée. La compacité du film augmente.
- phase solide (S) : A haute pression, les molécules s’organisent pour former un film solide bidimensionnel solide (film de Langmuir) de compressibilité réduite. Au delà d’une pression limite (pression d’effondrement), le film s’effondre et la couche monomoléculaire est détruite pour former des systèmes multicouches ou des agrégats tridimensionnels.

D.1.2 Calcul de la distance inter-particule

A partir de la surface par objet mesurée tout au long de la compression, il est possible de calculer la distance moyenne inter-particules dans le film. Pour effectuer ce calcul, nous avons assimilé l’organisation des objets dans le film à un empilement hexagonal compact (figure D.2).

La surface moyenne par nanoparticule correspond à la surface du losange. La distance inter-particules d peut être donc calculée à partir de cette surface selon l’expression suivante :

$$d = \left(\frac{2S}{\sqrt{3}} \right)^{1/2} \quad (\text{D.1})$$

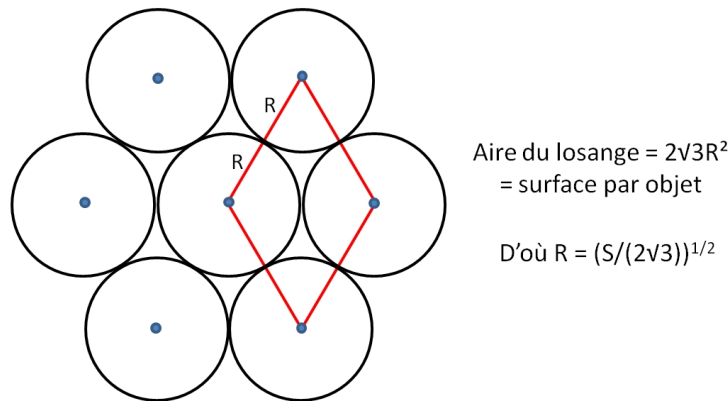


Figure D.2 – Représentation schématique de la distance inter-particule dans un empilement hexagonal compact.

Il est ainsi possible de déterminer la distance moyenne inter-particules dans le film et de la comparer aux distances caractéristiques préalablement déterminées *via* l'utilisation d'autres techniques de caractérisation.

D.2 Transfert du film de Langmuir

D.2.1 Transfert vertical

Le transfert vertical est la technique la plus couramment employée pour le film de Langmuir. Cette technique consiste à descendre et remonter séquentiellement le support à travers l'interface air-liquide. Ce transfert est effectué à une pression de surface constante exercée par la barrière. Cette dernière avance donc au fur et à mesure que les dépôts sont effectués. L'adhésion de la première couche va dépendre de la nature du support. Si l'on considère le cas d'une molécule amphiphile, lorsque le support est hydrophile, la première couche est déposée à la montée du support, par interaction des parties hydrophiles avec le substrat. Si par contre il est hydrophobe, le premier transfert a lieu à la descente, par interaction hydrophobe entre le support et les zones hydrophobes de la molécules.

Trois types de films LB peuvent être obtenus par transferts successifs sur un substrat. Le plus commun est le transfert de type Y (figure D.3), qui est réalisé lorsque le dépôt sur le support est réalisé dans les deux directions (montée et descente). Quand la couche n'est déposée qu'à la montée ou à la descente du support, on parle de transfert de type Z ou X. Dans le cas du dépôt de films mixtes de nanoparticules amorçantes, le transfert est de type Y. Par contre, dans le cas du film mixte de Pt-PMAA, le film ne transfère qu'à la montée. C'est un transfert de type Z.

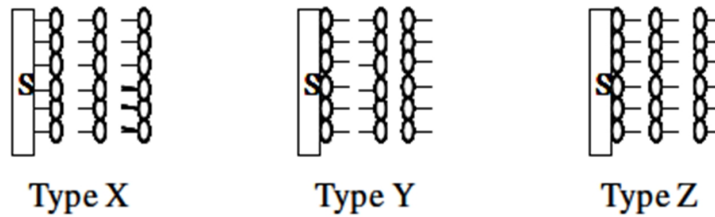


Figure D.3 – Types de transfert sur des supports solides.

D.2.2 Transfert horizontal

Lorsque le transfert vertical d'un film pur n'est pas possible à cause d'interactions trop faibles avec le support, nous avons vu qu'il était possible de réaliser un film mixte en introduisant une molécule ayant une bonne aptitude au transfert. Il est également possible de transférer le film pur sur le support en utilisant d'autres techniques et notamment le transfert horizontal.

Pour réaliser ce type de transfert, le support est placé dans la phase liquide avant de réaliser l'épandage de la solution contenant les objets à organiser sous forme de film. Les étapes d'épandage et de compression sont identiques à celles décrites précédemment. Une fois la pression de surface suffisamment élevée pour obtenir une monocouche compacte, la barrière est maintenue à une position fixe. Le niveau d'eau dans la cuve est alors lentement diminué jusqu'à ce que le film se dépose à la surface du substrat (figure D.4)

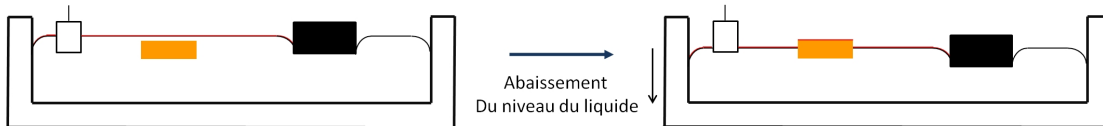


Figure D.4 – Transfert horizontal

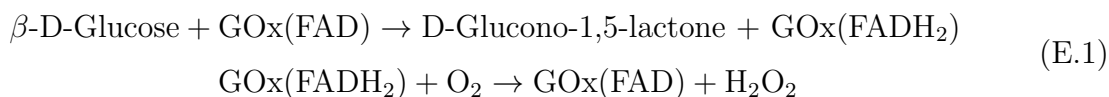
Le principal inconvénient de cette technique vient du fait qu'il faut refaire un nouvel épandage pour chaque couche déposée. Il est donc plus difficile de superposer des couches qu'en utilisant le transfert vertical. L'information concernant le taux de transfert est également perdu.

Annexe E

Mesure d'activité enzymatique

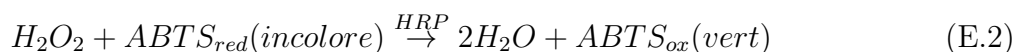
E.1 Principe de la mesure

La technique de spectroscopie UV visible permet de mesurer l'activité d'une enzyme par l'intermédiaire de la détection indirecte de ses produits de réaction. L'enzyme dont nous souhaitons déterminer l'activité est la glucose oxydase. Cette enzyme consomme le glucose et produit du gluconolactone et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 selon le processus décrit ci-dessous.



Où FAD est la flavine adénine dinucléotide, site actif de la GOx, et FADH₂ sa forme réduite, qui est régénérée en oxydant O₂ en H₂O₂.

L'activité de la glucose oxydase se traduit par l'augmentation de la quantité d'H₂O₂ dans le milieu. Elle est quantifiée par le nombre de μ moles de H₂O₂ produits par minute et par gramme d'enzyme (en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). La mesure de l'activité enzymatique repose donc sur la détection de la quantité d'H₂O₂ produit en fonction du temps pour une concentration donnée en enzyme. Cette détection se fait en utilisant une seconde enzyme, la HRP (Horse Radish Peroxydase), et un chromophore, l'ABTS (2,2-amino-bis(3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonic-acid)). Selon l'équation E.2, H₂O₂ est réduite par la HRP qui se régénère en oxydant l'ABTS, ce dernier se colore alors en vert ($\epsilon=3.68 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 420 nm).



En mesurant la vitesse d'apparition du pic d'absorption situé à 420 nm, il est donc possible de mesurer l'activité de la GOx. Dans ces mesures, l'HRP, l'ABTS et le glucose doivent être

introduits en excès pour que la quantité d'enzyme et son « turnover » soit le seul facteur limitant la cinétique.

Généralement, ces mesures d'activité sont utilisées pour déterminer la quantité d'enzymes actives dans un système. La première étape consiste donc à effectuer une calibration de l'activité enzymatique en fonction de la concentration du lot d'enzyme utilisé. Dans un second temps, l'activité enzymatique du système étudié est mesuré dans les mêmes conditions que la calibration. Il est possible de déduire la quantité d'enzymes actives présentes dans le système à partir de la droite d'étalonnage.

E.2 Protocole

E.2.1 Calibration

La première étape correspond à la calibration de l'activité enzymatique du lot utilisé en fonction de la masse. Dans notre cas, cette mesure a été faite à pH 7.4. Toutes les solutions ont donc été préparées dans une solution de PBS. Pour réaliser cette calibration nous avons introduit les produits suivants dans une cuve en quartz de 3ml, placée dans le spectromètre thermostatée à 35 °C.

- 2,4 mL de solution tampon (PBS)
- 75 μ L d'ABTS à 0.1 mol/L
- 75 μ L de HRP à 50 U/mL
- 150 μ L de solution de GOx
- 300 μ L de glucose à 1 mol/L

La concentration de la solution de GOx est calculée pour introduire dans la cuve une masse précise : 20 ng pour le premier point, 60, 80 et 120 ng pour les suivants. La mesure d'absorbance est lancée dès l'introduction du glucose dans le milieu.

Un exemple de résultat obtenu lors d'une calibration est présenté dans la figure E.1. Pour des absorbance inférieure à 1, la loi de Beer-Lambert donne :

$$A = \epsilon.l.c = \frac{\epsilon.l}{V}.n \quad (\text{E.3})$$

Avec c la concentration et n, le nombre de mole d'ABTS oxydé, ϵ son coefficient d'extinction molaire (36 800 L.mol⁻¹.cm⁻¹) et V, le volume de la cuve. En dérivant cette expression, nous obtenons :

$$\frac{dA}{dt} = \frac{\epsilon.l}{V} \cdot \frac{dn}{dt} = \frac{\epsilon.l}{V} \cdot V_{max} \quad (\text{E.4})$$

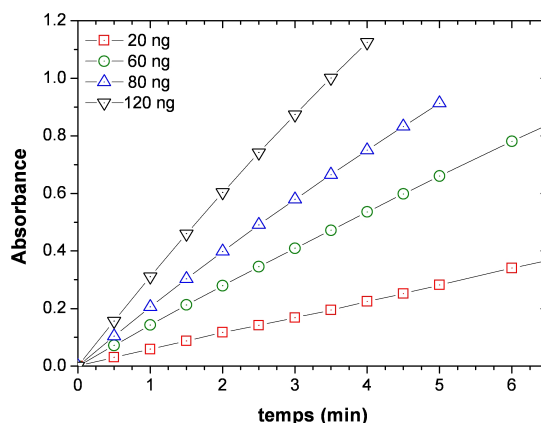


Figure E.1 – Mesures du V_{max} de solutions contenant de 20, 60, 80 et 120 ng de GOx dans 3 mL de PBS.

Où V_{max} correspond à la vitesse maximale de catalyse enzymatique (en $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}$). A partir de la pente de chaque droite, nous pouvons donc calculer $V_{max} = \frac{dA}{dt} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot l}$ pour chaque masse d'enzyme. Les résultats sont présentés dans le tableau E.1. A partir de ces valeurs, il

Masse de Gox (ng)	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)
20	0.005
60	0.011
80	0.015
120	0.024

Table E.1 – Résumé des valeurs de V_{max} mesurées pour 20, 60, 80 et 120 ng de GOx.

est possible de tracer la droite de calibration reliant V_{max} à la masse d'enzyme (figure E.2). La pente de la droite de calibration correspond à l'activité enzymatique du lot de Gox utilisé (en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, également appelé $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Pour ce lot, l'activité est de $190 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$.

E.2.2 Détermination de la quantité d'enzymes actives d'un échantillon

Une fois la courbe de calibration obtenue, il est facile de déterminer la quantité d'enzymes actives sur un échantillon. Si ce dernier est une solution, le V_{max} de la solution est déterminé (après dilution) selon le même protocole que celui utilisé lors de la calibration. En utilisant la droite d'étalonnage, il est alors possible de calculer la masse d'enzyme présente dans la cuve, puis en tenant compte des facteurs de dilution, de calculer la concentration en enzymes actives dans la solution initiale.

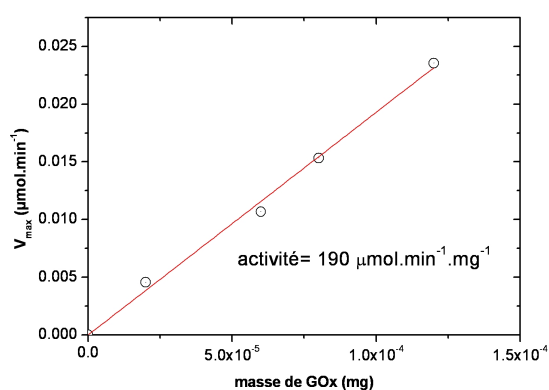


Figure E.2 – Droite de calibration de V_{max} en fonction de la masse d'enzyme.

Lors de notre étude, nous avons également été amenés à déterminer la quantité d'enzymes actives présentes à la surface des électrodes modifiées que nous avons élaborées. Les électrodes ont une taille suffisamment réduite pour être introduite dans la cuve de quartz. Nous avons donc ajouté dans la cuve les solutions de PBS, d'ABTS, d'HRP et de glucose dans les conditions décrites précédemment. L'électrode est alors introduite dans la cuve de telle manière que seule la face où se trouve la partie couverte d'or soit en contact avec la solution. L'électrode est alors laissée pendant un temps t dans la cuve, puis retirée. La solution est alors homogénéisée et la mesure UV-visible est effectuée. Nous avons ainsi déterminé la vitesse de catalyse correspondant à une électrode. La figure E.3 ci-dessous présente le résultat obtenu pour une électrode modifiée avec une structure de type brosse.

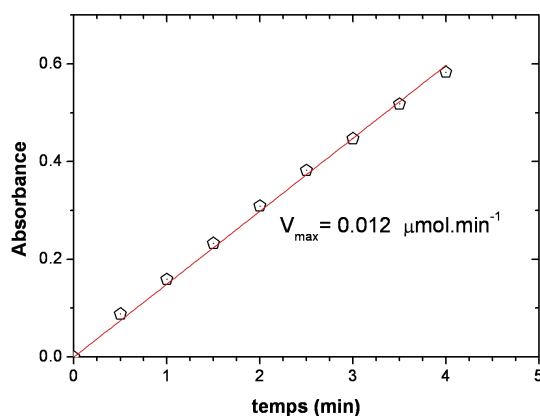


Figure E.3 – Détermination du V_{max} d'une électrode modifiée de type brosse.

La pente correspond à un V_{max} de $0.012 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. A partir de la droite de calibration, nous pouvons déterminer que les électrodes ont une activité équivalente à la présence de 65 ng d'enzymes en solution. Nous avons donc considéré qu'en moyenne, 65 ng d'enzymes actives étaient greffées et accessibles sur ces structures.

Bibliographie

- [1] M. De, P. S. Ghosh, and V. M. Rotello. Applications of nanoparticles in biology. *Advanced Materials*, 20(22) :4225–4241, 2008.
- [2] E. Katz and I. Willner. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems : Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(45) :6042–6108, 2004.
- [3] M. Knauth, T. Egelhof, S. U. Roth, C. R. Wirtz, and K. Sartor. Monocrystalline iron oxide nanoparticles : Possible solution to the problem of surgically induced intracranial contrast enhancement in intraoperative mr imaging. *American Journal of Neuroradiology*, 22(1) :99–102, 2001.
- [4] C. Bergemann, D. Muller-Schulte, J. Oster, L. a Brassard, and A. S. Lubbe. Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194(1-3) :45–52, 1999.
- [5] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, and E. Duguet. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14) :2161–2175, 2004.
- [6] N. Kohler, G. E. Fryxell, and M. Q. Zhang. A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents. *Journal of the American Chemical Society*, 126(23) :7206–7211, 2004.
- [7] N. Kohler, C. Sun, A. Fichtenholtz, J. Gunn, C. Fang, and M. Q. Zhang. Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for mr imaging and drug delivery. *Small*, 2(6) :785–792, 2006.
- [8] A. K. Gupta and M. Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18) :3995–4021, 2005.
- [9] Overgaar.K and Overgaar.J. Investigations on possibility of a thermic tumor therapy .1. short-wave treatment of a transplanted isologous mouse mammary-carcinoma. *European Journal of Cancer*, 8(1), 1972.
- [10] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fahling, J. Krause, W. Wlodarczyk, B. Sander, T. Vogl, and R. Felix. Effects of magnetic fluid hyperthermia MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *International Journal of Hyperthermia*, 13(6) :587–605, 1997.
- [11] A. Ito, K. Tanaka, H. Honda, S. Abe, H. Yamaguchi, and T. Kobayashi. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4) :364–369, 2003.

- [12] R. Hong, G. Han, J. M. Fernandez, B. J. Kim, N. S. Forbes, and V. M. Rotello. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *Journal of the American Chemical Society*, 128(4) :1078–1079, 2006.
- [13] C. K. Kim, P. Ghosh, C. Pagliuca, Z. J. Zhu, S. Menichetti, and V. M. Rotello. Entrapment of hydrophobic drugs in nanoparticle monolayers with efficient release into cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, 131(4) :1360–+, 2009.
- [14] R. Bhattacharya and P. Mukherjee. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11) :1289–1306, 2008.
- [15] S. R. Sershen, S. L. Westcott, N. J. Halas, and J. L. West. Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3) :293–298, 2000.
- [16] J. Zhang and R. D. K. Misra. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer : Core-shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomaterialia*, 3 :838–850, 2007.
- [17] Q. Yang, S. H. Wang, P. W. Fan, L. F. Wang, Y. Di, K. F. Lin, and F. S. Xiao. pH-responsive carrier system based on carboxylic acid modified mesoporous silica and polyelectrolyte for drug delivery. *Chemistry of Materials*, 17(24) :5999–6003, 2005.
- [18] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz. The optical properties of metal nanoparticles : The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(3) :668–677, 2003.
- [19] X. D. Hoa, A. G. Kirk, and M. Tabrizian. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors : A review of recent progress. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(2) :151–160, 2007.
- [20] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592) :607–609, 1996.
- [21] E. Oh, M. Y. Hong, D. Lee, S. H. Nam, H. C. Yoon, and H. S. Kim. Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 127(10) :3270–3271, 2005.
- [22] L. Dyadyusha, H. Yin, S. Jaiswal, T. Brown, J. J. Baumberg, F. P. Booy, and T. Melvin. Quenching of CdSe quantum dot emission, a new approach for biosensing. *Chemical Communications*, (25) :3201–3203, 2005.
- [23] L. Bahshi, M. Frascioni, R. Tel-Vered, O. Yehezkeli, and I. Willner. Following the biocatalytic activities of glucose oxidase by electrochemically cross-linked enzyme-Pt nanoparticles composite electrodes. *Analytical Chemistry*, 80(21) :8253–8259, 2008.
- [24] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, and I. Willner. "plugging into enzymes" : Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 299(5614) :1877–1881, 2003.
- [25] S. J. Guo and S. J. Dong. Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 28(1) :96–109, 2009.

- [26] J. M. Pingarron, P. Yanez-Sedeno, and A. Gonzalez-Cortes. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 53(19) :5848–5866, 2008.
- [27] C. M. McIntosh, E. A. Esposito, A. K. Boal, J. M. Simard, C. T. Martin, and V. M. Rotello. Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 123(31) :7626–7629, 2001.
- [28] N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, J. M. Simard, and V. M. Rotello. Reversible "irreversible" inhibition of chymotrypsin using nanoparticle receptors. *Journal of the American Chemical Society*, 125(44) :13387–13391, 2003.
- [29] C. M. Niemeyer. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids : Biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(22) :4128–4158, 2001.
- [30] T. Pellegrino, S. Kudera, T. Liedl, A. M. Javier, L. Manna, and W. J. Parak. On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications. *Small*, 1(1) :48–63, 2005.
- [31] W. Shenton, S. A. Davis, and S. Mann. Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody-antigen recognition. *Advanced Materials*, 11(6) :449–+, 1999.
- [32] F. Caruso. Nanoengineering of particle surfaces. *Advanced Materials*, 13(1) :11–+, 2001.
- [33] R. Hong, N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, T. Emrick, and V. M. Rotello. Control of protein structure and function through surface recognition by tailored nanoparticle scaffolds. *Journal of the American Chemical Society*, 126(3) :739–743, 2004.
- [34] M. Antonietti, E. Wenz, L. Bronstein, and M. Seregina. Synthesis and characterization of noble metal colloids in block copolymer micelles. *Advanced Materials*, 7(12) :1000–1005, 1995.
- [35] L. H. Bronstein, S. N. Sidorov, P. M. Valetsky, J. Hartmann, H. Colfen, and M. Antonietti. Induced micellization by interaction of poly(2-vinylpyridine)-block-poly(ethylene oxide) with metal compounds. micelle characteristics and metal nanoparticle formation. *Langmuir*, 15(19) :6256–6262, 1999.
- [36] G. Carrot, J. C. Valmalette, C. J. G. Plummer, S. M. Scholz, J. Dutta, H. Hofmann, and J. G. Hilborn. Gold nanoparticle synthesis in graft copolymer micelles. *Colloid and Polymer Science*, 276(10) :853–859, 1998.
- [37] J. H. Youk, M. K. Park, J. Locklin, R. Advincula, J. Yang, and J. Mays. Preparation of aggregation stable gold nanoparticles using star-block copolymers. *Langmuir*, 18(7) :2455–2458, 2002.
- [38] R. M. Crooks, M. Q. Zhao, L. Sun, V. Chechik, and L. K. Yeung. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles : Synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 34(3) :181–190, 2001.
- [39] C. W. Wang and M. G. Moffitt. Surface-tunable photoluminescence from block copolymer-stabilized cadmium sulfide quantum dots. *Langmuir*, 20(26) :11784–11796, 2004.
- [40] K. P. Krenkler, R. Laible, and K. Hamann. Polyreactions on pigment surfaces .7. reactions of polymers with chlorosilane end groups on silicon dioxide surfaces. *Angewandte Makromolekulare Chemie*, 53(JUL) :101–123, 1976.

- [41] P. Auroy, L. Auvray, and L. Leger. Silica particles stabilized by long grafted polymer-chains - from electrostatic to steric repulsion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 150(1) :187–194, 1992.
- [42] Z. K. Zhang, A. E. Berns, S. Willbold, and J. Buitenhuis. Synthesis of poly(ethylene glycol) (PEG)-grafted colloidal silica particles with improved stability in aqueous solvents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 310(2) :446–455, 2007.
- [43] E. Hubner, J. Allgaier, M. Meyer, J. Stellbrink, W. Pyckhout-Hintzen, and D. Richter. Synthesis of polymer/silica hybrid nanoparticles using anionic polymerization techniques. *Macromolecules*, 43(2) :856–867, 2010.
- [44] P. Mansky, Y. Liu, E. Huang, T. P. Russell, and C. J. Hawker. Controlling polymer-surface interactions with random copolymer brushes. *Science*, 275(5305) :1458–1460, 1997.
- [45] O. Prucker, C. A. Naumann, J. Ruhe, W. Knoll, and C. W. Frank. Photochemical attachment of polymer films to solid surfaces via monolayers of benzophenone derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 121(38) :8766–8770, 1999.
- [46] V. Koutsos, E. W. vanderVegte, E. Pelletier, A. Stamouli, and G. Hadziioannou. Structure of chemically end-grafted polymer chains studied by scanning force microscopy in bad-solvent conditions. *Macromolecules*, 30(16) :4719–4726, 1997.
- [47] V. Koutsos, E. W. van der Vegte, and G. Hadziioannou. Direct view of structural regimes of end-grafted polymer monolayers : A scanning force microscopy study. *Macromolecules*, 32(4) :1233–1236, 1999.
- [48] K. Ebata, K. Furukawa, and N. Matsumoto. Synthesis and characterization of end-grafted polysilane on a substrate surface. *Journal of the American Chemical Society*, 120(29) :7367–7368, 1998.
- [49] W. P. Wuelfing, S. M. Gross, D. T. Miles, and R. W. Murray. Nanometer gold clusters protected by surface-bound monolayers of thiolated poly(ethylene glycol) polymer electrolyte. *Journal of the American Chemical Society*, 120(48) :12696–12697, 1998.
- [50] M. Q. Zhu, L. Q. Wang, G. J. Exarhos, and A. D. Q. Li. Thermosensitive gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(9) :2656–2657, 2004.
- [51] S. Z. Luo, J. Xu, Y. F. Zhang, S. Y. Liu, and C. Wu. Double hydrophilic block copolymer monolayer protected hybrid gold nanoparticles and their shell cross-linking. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(47) :22159–22166, 2005.
- [52] M. A. White, A. Maliakal, N. J. Turro, and J. Koberstein. "click" dielectrics : Use of 1,3-dipolar cycloadditions to generate diverse core-shell nanoparticle structures with applications to flexible electronics(a). *Macromolecular Rapid Communications*, 29(18) :1544–1548, 2008.
- [53] R. Ranjan and W. J. Brittain. Combination of living radical polymerization and click chemistry for surface modification. *Macromolecules*, 40(17) :6217–6223, 2007.
- [54] X. W. Fan, Q. Y. Zhou, C. J. Xia, W. Cristofoli, J. Mays, and R. Advincula. Living anionic surface-initiated polymerization (LASIP) of styrene from clay nanoparticles using surface bound 1,1-diphenylethylene (DPE) initiators. *Langmuir*, 18(11) :4511–4518, 2002.

- [55] Q. Y. Zhou, S. X. Wang, X. W. Fan, R. Advincula, and J. Mays. Living anionic surface-initiated polymerization (LASIP) of a polymer on silica nanoparticles. *Langmuir*, 18(8) :3324–3331, 2002.
- [56] R. Jordan, N. West, A. Ulman, Y. M. Chou, and O. Nuyken. Nanocomposites by surface-initiated living cationic polymerization of 2-oxazolines on functionalized gold nanoparticles. *Macromolecules*, 34(6) :1606–1611, 2001.
- [57] R. Zirbs, W. Binder, M. Gahleitner, and D. Machl. "grafting from" -living cationic polymerization of poly(isobutylene) from silica-nanoparticle surfaces. *Macromolecular Symposia*, 254 :93–96, 2007.
- [58] H. Fischer. The persistent radical effect : A principle for selective radical reactions and living radical polymerizations. *Chemical Reviews*, 101(12) :3581–3610, 2001.
- [59] J. S. Wang and K. Matyjaszewski. Controlled living radical polymerization - atom-transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 117(20) :5614–5615, 1995.
- [60] M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, and T. Higashimura. Polymerization of methyl-methacrylate with the carbon-tetrachloride dichlorotris(triphenylphosphine)ruthenium(ii) methylaluminum bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) initiating system - possibility of living radical polymerization. *Macromolecules*, 28(5) :1721–1723, 1995.
- [61] T. E. Patten and K. Matyjaszewski. Atom transfer radical polymerization and the synthesis of polymeric materials. *Advanced Materials*, 10(12) :901–+, 1998.
- [62] K. Matyjaszewski and J. H. Xia. Atom transfer radical polymerization. *Chemical Reviews*, 101(9) :2921–2990, 2001.
- [63] Y. Q. Shen, H. D. Tang, and S. J. Ding. Catalyst separation in atom transfer radical polymerization. *Progress in Polymer Science*, 29(10) :1053–1078, 2004.
- [64] N. V. Tsarevsky and K. Matyjaszewski. "green" atom transfer radical polymerization : From process design to preparation of well-defined environmentally friendly polymeric materials. *Chemical Reviews*, 107(6) :2270–2299, 2007.
- [65] W. Jakubowski, K. Min, and K. Matyjaszewski. Activators regenerated by electron transfer for atom transfer radical polymerization of styrene. *Macromolecules*, 39(1) :39–45, 2006.
- [66] M. Ejaz, S. Yamamoto, K. Ohno, Y. Tsujii, and T. Fukuda. Controlled graft polymerization of methyl methacrylate on silicon substrate by the combined use of the Langmuir-Blodgett and atom transfer radical polymerization techniques. *Macromolecules*, 31(17) :5934–5936, 1998.
- [67] K. Matyjaszewski, P. J. Miller, N. Shukla, B. Immaraporn, A. Gelman, B. B. Luokala, T. M. Siclován, G. Kickelbick, T. Vallant, H. Hoffmann, and T. Pakula. Polymers at interfaces : Using atom transfer radical polymerization in the controlled growth of homopolymers and block copolymers from silicon surfaces in the absence of untethered sacrificial initiator. *Macromolecules*, 32(26) :8716–8724, 1999.
- [68] T. von Werne and T. E. Patten. Preparation of structurally well-defined polymer-nanoparticle hybrids with controlled/living radical polymerizations. *Journal of the American Chemical Society*, 121(32) :7409–7410, 1999.

- [69] T. von Werne and T. E. Patten. Atom transfer radical polymerization from nanoparticles : A tool for the preparation of well-defined hybrid nanostructures and for understanding the chemistry of controlled/"living" radical polymerizations from surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 123(31) :7497–7505, 2001.
- [70] K. Matyjaszewski and A. Kajiwar. (EPR study of atom transfer radical polymerization ((ATRP) of styrene. *Macromolecules*, 31(2) :548–550, 1998.
- [71] K. Ohno, K. Koh, Y. Tsujii, and T. Fukuda. Synthesis of gold nanoparticles coated with well-defined, high-density polymer brushes by surface-initiated living radical polymerization. *Macromolecules*, 35(24) :8989–8993, 2002.
- [72] P. J. Roth and P. Theato. Versatile synthesis of functional gold nanoparticles : Grafting polymers from and onto. *Chemistry of Materials*, 20(4) :1614–1621, 2008.
- [73] S. Nuss, H. Bottcher, H. Wurm, and M. L. Hallensleben. Gold nanoparticles with covalently attached polymer chains. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(21) :4016–+, 2001.
- [74] D. J. Kim, S. M. Kang, B. Kong, W. J. Kim, H. J. Paik, H. Choi, and I. S. Choi. Formation of thermoresponsive gold nanoparticle/(PNIPAAm hybrids by surface-initiated, atom transfer radical polymerization in aqueous media. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 206(19) :1941–1946, 2005.
- [75] T. K. Mandal, M. S. Fleming, and D. R. Walt. Preparation of polymer coated gold nanoparticles by surface-confined living radical polymerization at ambient temperature. *Nano Letters*, 2(1) :3–7, 2002.
- [76] X. W. Fan, L. J. Lin, and P. B. Messersmith. Surface-initiated polymerization from TiO₂ nanoparticle surfaces through a biomimetic initiator : A new route toward polymer-matrix nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 66(9) :1198–1204, 2006.
- [77] G. K. Raghuraman, J. Ruhe, and R. Dhamodharan. Grafting of PMMA brushes on titanium nanoparticulate surface via surface-initiated conventional radical and "controlled" radical polymerization (ATRP). *Journal of Nanoparticle Research*, 10(3) :415–427, 2008.
- [78] E. Marutani, S. Yamamoto, T. Ninjbadgar, Y. Tsujii, T. Fukuda, and M. Takano. Surface-initiated atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate on magnetite nanoparticles. *Polymer*, 45(7) :2231–2235, 2004.
- [79] Y. Zhou, S. X. Wang, B. J. Ding, and Z. M. Yang. Modification of magnetite nanoparticles via surface-initiated atom transfer radical polymerization ((ATRP). *Chemical Engineering Journal*, 138(1-3) :578–585, 2008.
- [80] P. Liu and T. M. Wang. Surface-graft hyperbranched polymer via self-condensing atom transfer radical polymerization from zinc oxide nanoparticles. *Polymer Engineering and Science*, 47(9) :1296–1301, 2007.
- [81] A. C. C. Esteves, L. Bombalski, T. Trindade, K. Matyjaszewski, and A. Barros-Timmons. Polymer grafting from Cds quantum dots via AGET ATRP in miniemulsion. *Small*, 3(7) :1230–1236, 2007.

- [82] A. El Harrak, G. Carrot, J. Oberdisse, C. Eychenne-Baron, and F. Boue. Surface-atom transfer radical polymerization from silica nanoparticles with controlled colloidal stability. *Macromolecules*, 37(17) :6376–6384, 2004.
- [83] G. Moad, E. Rizzardo, and D. H. Solomon. Selectivity of the reaction of free-radicals with styrene. *Macromolecules*, 15(3) :909–914, 1982.
- [84] M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, and G. K. Hamer. Narrow molecular-weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules*, 26(11) :2987–2988, 1993.
- [85] S. Grimaldi, J. P. Finet, A. Zeghdoui, and P. Tordo. Synthesis of a new class of nitroxyl radicals and application to "living" free radical polymerization. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 213 :302–POLY, 1997.
- [86] D. Benoit, V. Chaplinski, R. Braslau, and C. J. Hawker. Development of a universal alkoxyamine for "living" free radical polymerizations. *Journal of the American Chemical Society*, 121(16) :3904–3920, 1999.
- [87] C. J. Hawker, A. W. Bosman, and E. Harth. New polymer synthesis by nitroxide mediated living radical polymerizations. *Chemical Reviews*, 101(12) :3661–3688, 2001.
- [88] M. Husseman, E. E. Malmstrom, M. McNamara, M. Mate, D. Mecerreyes, D. G. Benoit, J. L. Hedrick, P. Mansky, E. Huang, T. P. Russell, and C. J. Hawker. Controlled synthesis of polymer brushes by "living" free radical polymerization techniques. *Macromolecules*, 32(5) :1424–1431, 1999.
- [89] R. Matsuno, K. Yamamoto, H. Otsuka, and A. Takahara. Polystyrene-grafted magnetite nanoparticles prepared through surface-initiated nitroxyl-mediated radical polymerization. *Chemistry of Materials*, 15(1) :3–5, 2003.
- [90] R. Matsuno, H. Otsuka, and A. Takahara. Polystyrene-grafted titanium oxide nanoparticles prepared through surface-initiated nitroxide-mediated radical polymerization and their application to polymer hybrid thin films. *Soft Matter*, 2(5) :415–421, 2006.
- [91] J. Parvole, G. Laruelle, C. Guimon, J. Francois, and L. Billon. Initiator-grafted silica particles for controlled free radical polymerization : Influence of the initiator structure on the grafting density. *Macromolecular Rapid Communications*, 24(18) :1074–1078, 2003.
- [92] C. Bartholome, E. Beyou, E. Bourgeat-Lami, P. Chaumont, and N. Zydowicz. Nitroxide-mediated polymerizations from silica nanoparticle surfaces : "graft from" polymerization of styrene using a triethoxysilyl-terminated alkoxyamine initiator. *Macromolecules*, 36(21) :7946–7952, 2003.
- [93] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, and S. H. Thang. Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer : The RAFT process. *Macromolecules*, 31(16) :5559–5562, 1998.
- [94] D. Charmot, P. Corpart, H. Adam, S. Z. Zard, T. Biadatti, and G. Bouhadir. Controlled radical polymerization in dispersed media. *Macromolecular Symposia*, 150 :23–32, 2000.
- [95] M. Baum and W. J. Brittain. Synthesis of polymer brushes on silicate substrates via reversible addition fragmentation chain transfer technique. *Macromolecules*, 35(3) :610–615, 2002.

- [96] C. Z. Li and B. C. Benicewicz. Synthesis of well-defined polymer brushes grafted onto silica nanoparticles via surface reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Macromolecules*, 38(14) :5929–5936, 2005.
- [97] J. Raula, J. Shan, M. Nuopponen, A. Niskanen, H. Jiang, E. I. Kauppinen, and H. Tenhu. Synthesis of gold nanoparticles grafted with a thermoresponsive polymer by surface-induced reversible-addition-fragmentation chain-transfer polymerization. *Langmuir*, 19(8) :3499–3504, 2003.
- [98] B. Hojjati, R. H. Sui, and P. A. Charpentier. Synthesis of TiO₂/PAA nanocomposite by RAFT polymerization. *Polymer*, 48(20) :5850–5858, 2007.
- [99] H. Skaff and T. Emrick. Reversible addition fragmentation chain transfer ((RAFT) polymerization from unprotected cadmium selenide nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(40) :5383–5386, 2004.
- [100] L. C. Clark and C. Lyons. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 1962.
- [101] J. Wang. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2) :814–825, 2008.
- [102] A. Heller and B. Feldman. Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chemical Reviews*, 108(7) :2482–2505, 2008.
- [103] R. Wilson and A. P. F. Turner. Glucose-oxidase - an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 7(3) :165–185, 1992.
- [104] S. J. Updike and G. P. Hicks. Enzyme electrode. *Nature*, 214(5092), 1967.
- [105] G. G. Guilbault and G. J. Lubrano. Enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytica Chimica Acta*, 64(3) :439–455, 1973.
- [106] A. E. G. Cass, G. Davis, M. J. Green, and H. A. O. Hill. Ferricinium ion as an electron-acceptor for oxido-reductases. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 190(1-2) :117–127, 1985.
- [107] S. A. Jaffari and A. P. F. Turner. Novel hexacyanoferrate((III) modified graphite disc electrodes and their application in enzyme electrodes .1. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(1) :1–9, 1997.
- [108] E. S. Ryabova, V. N. Goral, E. Csoregi, B. Mattiasson, and A. D. Ryabov. Coordinative approach to mediated electron transfer : Ruthenium complexed to native glucose oxidase. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38(6) :804–807, 1999.
- [109] J. J. Kulys and N. K. Cenas. Oxidation of glucose-oxidase from penicillium-vitale by one-electron and 2-electron acceptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 744(1) :57–63, 1983.
- [110] T. Ikeda, T. Shibata, and M. Senda. Amperometric enzyme electrode for maltose based on an oligosaccharide dehydrogenase-modified carbon paste electrode containing para-benzoquinone. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 261(2B) :351–362, 1989.
- [111] Y. Degani and A. Heller. Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal-electrodes .1. electron-transfer from glucose-oxidase to metal-electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme. *Journal of Physical Chemistry*, 91(6) :1285–1289, 1987.

- [112] M. V. Pishko, I. Katakis, S. E. Lindquist, L. Ye, B. A. Gregg, and A. Heller. Direct electrical communication between graphite-electrodes and surface adsorbed glucose-oxidase redox polymer complexes. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 29(1) :82–89, 1990.
- [113] M. Gerard, A. Chaubey, and B. D. Malhotra. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(5) :345–359, 2002.
- [114] A. M. Yu, Z. J. Liang, J. H. Cho, and F. Caruso. Nanostructured electrochemical sensor based on dense gold nanoparticle films. *Nano Letters*, 3(9) :1203–1207, 2003.
- [115] S. Hrapovic, Y. L. Liu, K. B. Male, and J. H. T. Luong. Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes. *Analytical Chemistry*, 76(4) :1083–1088, 2004.
- [116] M. H. Yang, Y. H. Yang, Y. L. Liu, G. L. Shen, and R. Q. Yu. Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7) :1125–1131, 2006.
- [117] J. Njagi and S. Andreescu. Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au-polypyrrole nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(2) :168–175, 2007.
- [118] X. L. Luo, J. J. Xu, Y. Du, and H. Y. Chen. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 334(2) :284–289, 2004.
- [119] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, and I. Willner. "plugging into enzymes" : Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 299(5614) :1877–1881, 2003.
- [120] P. Karam, Y. Xin, S. Jaber, and L. I. Halaoui. Active Pt nanoparticles stabilized with glucose oxidase. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(36) :13846–13850, 2008.
- [121] S. Cavaliere, F. Raynal, A. Etcheberry, M. Herlem, and H. Perez. Direct electrochemical activity and stability of capped platinum nanoparticles. *Diffusion and Defect Data Part B (Solid State Phenomena)*, 106 :31–34, 2005.
- [122] S. Cavaliere, F. Raynal, A. Etcheberry, M. Herlem, and H. Perez. Direct electrocatalytic activity of capped platinum nanoparticles toward oxygen reduction. *Electrochemical and Solid State Letters*, 7(10) :A358–A360, 2004.
- [123] H. Perez, J. P. Pradeau, P. A. Albouy, and J. Perez-Omil. Synthesis and characterization of functionalized platinum nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 11(12) :3460–3463, 1999.
- [124] Frédéric Raynal, Arnaud Etcheberry, Sara Cavaliere, Vincent Noël, and Henri Perez. Characterization of the unstability of 4-mercaptoaniline capped platinum nanoparticles solution by combining LB technique and X-ray photoelectron spectroscopy. *Applied Surface Science*, 252(6) :2422–2431, 2006.
- [125] H. Perez, V. Noël, S. Cavaliere-Jaricot, A. Etcheberry, and P. A. Albouy. Nanocomposite Langmuir-Blodgett films based on crown derivatized platinum nanoparticles : Synthesis, characterization, and electrical properties. *Thin Solid Films*, 517(2) :755–763, 2008.

- [126] Sara Cavaliere-Jaricot, Arnaud Etcheberry, Vincent Noël, Michel Herlem, and Henri Perez. Electronic transfer through Langmuir-Blodgett layers of capped platinum nanoparticles : An electrochemical approach. *Electrochimica Acta*, 51(27) :6076–6080, 2006.
- [127] G. Carrot, F. Gal, C. Cremona, J. Vinas, and H. Perez. Polymer-grafted-platinum nanoparticles : From three-dimensional small-angle neutron scattering study to tunable two-dimensional array formation. *Langmuir*, 25(1) :471–478, 2009.
- [128] H. Perez, R. M. L. de Sousa, J. P. Pradeau, and P. A. Albouy. Elaboration and electrical characterization of Langmuir-Blodgett films of 4-mercaptoaniline functionalized platinum nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 13(5) :1512–1517, 2001.
- [129] G. Carrot, A. El Harrak, J. Oberdisse, J. Jestin, and F. Boue. Polymer grafting from 10-nm individual particles : proving control by neutron scattering. *Soft Matter*, 2(12) :1043–1047, 2006.
- [130] Stephen G. Boyes, Bulent Akgun, William J. Brittain, and Mark D. Foster. Synthesis, characterization, and properties of polyelectrolyte block copolymer brushes prepared by atom transfer radical polymerization and their use in the synthesis of metal nanoparticles. *Macromolecules*, 36(25) :9539–9548, 2003.
- [131] J. Ruhe, M. Ballauff, M. Biesalski, P. Dziezok, F. Grohn, D. Johannsmann, N. Houbenov, N. Hugenberg, R. Konradi, S. Minko, M. Motornov, R. R. Netz, M. Schmidt, C. Seidel, M. Stamm, T. Stephan, D. Usov, and H. N. Zhang. *Polyelectrolyte brushes*, volume 165 of *Advances in Polymer Science*, pages 79–150. 2004.
- [132] N. D. Treat, N. Ayres, S. G. Boyes, and W. J. Brittain. A facile route to poly(acrylic acid) brushes using atom transfer radical polymerization. *Macromolecules*, 39(1) :26–29, 2006.
- [133] A. Y. Sankhe, S. M. Husson, and S. M. Kilbey. Effect of catalyst deactivation on polymerization of electrolytes by surface-confined atom transfer radical polymerization in aqueous solutions. *Macromolecules*, 39(4) :1376–1383, 2006.
- [134] K. Matyjaszewski, J. L. Wang, T. Grimaud, and D. A. Shipp. Controlled/”living” atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate using various initiation systems. *Macromolecules*, 31(5) :1527–1534, 1998.
- [135] J. H. Xia and K. Matyjaszewski. Controlled/”living” radical polymerization. atom transfer radical polymerization using multidentate amine ligands. *Macromolecules*, 30(25) :7697–7700, 1997.
- [136] F. Perrot. Greffage de polymères à la surface de nanoparticules de platine. *Rapport de stage de DEA de l’université Paris VI*, 2003.
- [137] H. Fischer. The persistent radical effect in controlled radical polymerizations. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 37(13) :1885–1901, 1999.
- [138] J. B. Kim, M. L. Bruening, and G. L. Baker. Surface-initiated atom transfer radical polymerization on gold at ambient temperature. *Journal of the American Chemical Society*, 122(31) :7616–7617, 2000.
- [139] V. S. Khire, T. Y. Lee, and C. N. Bowman. Synthesis, characterization and cleavage of surface-bound linear polymers formed using thiol-ene photopolymerizations. *Macromolecules*, 41(20) :7440–7447, 2008.

- [140] J.P Cotton and F. Nallet. Diffusion de neutrons aux petits angles. *Journal de Physique IV*, 09, 1998.
- [141] P. Lindner and T. Zemb. In neutrons, X-ray and light scattering methods applied to soft condensed matter. *North-Holland Delta Series*, 2002.
- [142] C. Chevigny, D. Gimes, D. Bertin, J. Jestin, and F. Boue. Polystyrene grafting from silica nanoparticles via nitroxide-mediated polymerization (NMP) : synthesis and SANS analysis with the contrast variation method. *Soft Matter*, 5(19) :3741–3753, 2009.
- [143] H. Benoit. On the effect of branching and polydispersity on the angular distribution of the light scattered by gaussian coils. *Journal of Polymer Science*, 11(5) :507–510, 1953.
- [144] L. S. Wong, F. Khan, and J. Micklefield. Selective covalent protein immobilization : Strategies and applications. *Chemical Reviews*, 109(9) :4025–4053, 2009.
- [145] R. Wilson and A. P. F. Turner. Glucose-oxidase - an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 7(3) :165–185, 1992.
- [146] S. Acharya, J. P. Hill, and K. Ariga.
- [147] C. A. Devereaux and S. M. Baker. Surface features in Langmuir-Bodgett monolayers of pre-dominantly hydrophobic poly(styrene)-poly(ethylene oxide) diblock copolymer. *Macromolecules*, 35(5) :1921–1927, 2002.
- [148] J. Kim, I. A. Levitsky, D. T. McQuade, and T. M. Swager. Structural control in thin layers of poly(p-phenyleneethynylene)s : Photophysical studies of langmuir and Langmuir-Blodgett films. *Journal of the American Chemical Society*, 124(26) :7710–7718, 2002.
- [149] Y. X. Hou, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, C. Tlili, A. Zhang, J. C. Pernollet, L. Briand, G. Gomila, A. Errachid, J. Samitier, L. Salvagnac, B. Torbiero, and P. Temple-Boyer. Study of langmuir and Langmuir-Blodgett films of odorant-binding protein/amphiphile for odorant biosensors. *Langmuir*, 21(9) :4058–4065, 2005.
- [150] A. Bhaumik, M. Ramakanth, L. K. Brar, A. K. Raychaudhuri, F. Rondelez, and D. Chatterji. Formation of a DNA layer on Langmuir-BLODGETT films and its enzymatic digestion. *Langmuir*, 20(14) :5891–5896, 2004.
- [151] S. Cavaliere-Jaricot, A. Etcheberry, M. Herlem, V. Noel, and H. Perez. Electrochemistry at capped platinum nanoparticle Langmuir Blodgett films : A study of the influence of platinum amount and of number of LB layers. *Electrochimica Acta*, 52(6) :2285–2293, 2007.
- [152] S. Cavaliere-Jaricot, J. Haccoun, A. Etcheberry, M. Herlem, and H. Perez. Oxygen reduction of pre-synthesized organically capped platinum nanoparticles assembled in mixed Langmuir-Blodgett films : Evolutions with the platinum amount and leveling after fatty acid removal. *Electrochimica Acta*, 53(20) :5992–5999, 2008.
- [153] S. Sanjuan and Y. Tran. Synthesis of random polyampholyte brushes by atom transfer radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 46(13) :4305–4319, 2008.

- [154] P. Karam and L. I. Halaoui. Sensing of H₂O₂ at low surface density assemblies of Pt nanoparticles in polyelectrolyte. *Analytical Chemistry*, 80(14) :5441–5448, 2008.
- [155] V. M. Kaganer, H. Mohwald, and P. Dutta. Structure and phase transitions in langmuir monolayers. *Reviews of Modern Physics*, 71(3) :779–819, 1999.

Résumé

Les nanoparticules de platine fonctionnalisées présentent des propriétés catalytiques qui les rendent particulièrement intéressantes pour l'élaboration de biocapteurs électrochimiques. Afin d'améliorer la compréhension des phénomènes mis en jeu dans de tels systèmes, nous avons réalisé des structures hybrides modèles platine-polymère-enzyme selon une approche « bottom-up ». Ces structures ont été élaborées à partir de briques élémentaires composées de nanoparticules de platine de 2 nm de diamètre, greffées de polymère, obtenues en combinant la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome et la technique du « grafting from ». Les caractérisations, réalisées principalement par diffusion de neutrons aux petits angles, ont permis de déterminer la structure de ces objets ainsi que la masse molaire et la densité de greffage des chaînes polymères. A partir de ces briques élémentaires, nous avons tout d'abord réalisé des structures hybrides en solution. Nous avons déterminé leur composition et vérifié que l'enzyme conservait une activité significative après greffage. En utilisant la technique de Langmuir-Blodgett (LB), nous avons ensuite élaboré deux types de structure en film mince (film LB et brosse polymère), sur lesquelles l'enzyme a été immobilisée a posteriori. Après avoir caractérisé ces systèmes, l'étude de leur comportement électrochimique vis-à-vis de H_2O_2 puis du glucose, a mis en évidence des différences significatives, liées à leur structure et leur composition.

Mots-clés : nanoparticules de platine, polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP), nanostructures hybrides, enzymes, diffusion de neutrons, films de Langmuir-Blodgett

Abstract

Functionalized platinum nanoparticles possess catalytic properties leading to a great interest in the elaboration of electrochemical biosensors. To improve the understanding of phenomena involved in such systems, we designed platinum-polymer-enzyme model hybrid structures according to a « bottom-up » approach. These structures have been constructed from 2-nm platinum nanoparticles grafted with polymer, combining atom transfer radical polymerization and « grafting from » technique. The structure of these objects, the molecular weight and the grafting density of polymer chains were mainly determined by small angle neutron scattering. From these building blocks, we first designed hybrid structures in solution. We determined their composition and checked that enzymes remained significant activity after the grafting reaction. Using Langmuir-Blodgett (LB) technique, we also elaborated two different thin-film architectures (LB films and polymer brushes) where enzymes were subsequently grafted. After the physical characterization of these systems, the study of their electrochemical behavior towards H_2O_2 and glucose revealed significant differences regarding to their structure and their composition.

Key-words : platinum nanoparticles, atom transfer radical polymerization (ATRP), hybrid nanostructures, enzymes, neutron scattering, Langmuir-Blodgett films.