Développement d'une microscopie électrochimique à médiateur lié à la sonde en vue de son application à l'étude du fonctionnement d'une molécule d'enzyme unique.

Cédric Goyer

▶ **To cite this version:**

Cédric Goyer. Développement d'une microscopie électrochimique à médiateur lié à la sonde en vue de son application à l'étude du fonctionnement d'une molécule d'enzyme unique.. Chimie. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2008. Français. NNT : . tel-00350666

HAL Id: tel-00350666
https://theses.hal.science/tel-00350666

Submitted on 7 Jan 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

Présentée devant
L'Université Paris.Diderot – Paris 7

Pour obtenir
Le grade de docteur

Formation doctorale
Electrochimie

École doctorale
Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre (ED 388)

Par

Cédric GOYER

Sujet :

Développement d'une microscopie électrochimique à médiateur lié à la sonde en vue de son application à l'étude du fonctionnement d'une molécule d'enzyme unique

Soutenue le 21 Novembre 2008 devant la Commission d'examen

Jury :

Directeur de thèse :	C. Demaille	Université Paris 7 / CNRS
Rapporteurs :	J. Charlier	CEA Saclay
	P. Mailley	Université Joseph Fourier Grenoble / CEA Grenoble
Examinateurs:	C. Amatore	ENS Paris / CNRS
	J-P. Aimé	Université Bordeaux 1 / CNRS

Effectuée au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire (LEM) – Paris 7

A mes parents

*Ce travail a été dirigé par Monsieur **Christophe DEMAILLE** que je remercie vivement pour son intérêt, sa patience, sa rigueur et tout ce savoir qu'il m'a transmis. Merci aussi à Madame **Agnès ANNE** pour son apport scientifique indispensable, sa relecture attentive de ce manuscrit et pour tous ses encouragements.*

*J'adresse toute ma gratitude aux rapporteurs de mon manuscrit, Madame **Julienne CHARLIER** et Monsieur **Pascal MAILLEY**, qui m'ont fait l'honneur d'accepter cette tâche.*

*Je remercie vivement Monsieur **Jean-pierre AIME** et Monsieur **Christian AMATORE** de m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.*

*Je remercie **Michel DRUET** pour avoir su faire évoluer l'instrumentation et pour les réparations toujours rapides qui m'ont permis de « sauver » des expériences à maintes reprises .*

*Un grand merci à **Christian GUIOLET**, l'homme à l'éternel jeunesse du corps et de l'esprit, pour sa disponibilité professionnelle et pour ses tranches de saucissons si agréable à des heures tardives.*

*Toute ma reconnaissance va également à Monsieur **Yann LEGOAS** pour la construction des nombreuses pièces mécaniques dont nous avons eu besoin pour faire fonctionner l'AFM-SECM.*

*Merci à **Marie-Noëlle OLLIVIER** pour avoir relu ce manuscrit et avoir fait preuve d'une si grande gentillesse. Sache que tu as toute mon amitié.*

*A mes camarades de « classe » et amis, **Thibaut DEFEVER**, **Anne-lucie TEILLOUT**, **François MAVRE**, **Cyril LOUAULT**, **Kang WANG**, je suis très heureux d'avoir partagé avec vous ces années remplies d'éclats de rire qui ont animé les murs du LEM de Jussieu. J'espère que notre relation perdurera au-delà de la soutenance…*

Un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur disponibilité et leur amabilité, qui ont contribué au bon déroulement de ces quelques années.

*Une petite dédicace à mes amis de Grenoble, **José**, **Julien** et **Alexis** qui ont suivi la même route que moi et que j'encourage.*

*Merci à mon frère **Christophe** pour m'avoir aidé lors de mon arrivée sur Paris.*

*Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mes **Parents** qui m'ont toujours soutenu dans cette voie et sans qui rien n'aurait été possible.*

Table des matières

INTRODUCTION **6**

Les microscopies électrochimiques (SECM), à force atomique (AFM) et leur couplage **8**
1 La microscopie électrochimique - SECM 9
2 La microscopie à force atomique - AFM 15
3 La microscopie couplée AFM-SECM 21
4 Conclusions 33
Bibliographie 34

CARACTERISATION DE COUCHES MOLECULAIRES DE BRINS D'ADN REDOX NANOMETRIQUES ANCRES SUR SURFACE D'OR PLANE **36**

Exploration du mouvement de brins d'ADN par microscopie AFM-SECM **36**
1 Introduction 37
2 Etude du système à ADN rédox simple brin, Fc-sbADN 38
3 Etude du système à ADN rédox double brin, Fc-dbADN 52
4 Conclusions 57
Bibliographie 59

CARACTERISATION PAR AFM-SECM DE COUCHES MOLECULAIRES DE CHAINES FC-PEG ANCREES SUR SUBSTRAT D'OR PLAN **61**

Rappel des résultats antérieurs **61**
1 Introduction 62
2 Greffage de chaînes Fc-PEG par ancrage thiol sur surface d'or. Caractérisation électrochimique de la surface Fc-PEGylée 62
3 Conformation des chaînes de Fc-PEG : en solution et immobilisées sur surface d'or 66
4 Détermination de la conformation et de la dynamique du mouvement des chaînes Fc-PEG en AFM-SECM 69
5 Conclusions 72
Bibliographie 73

SONDES COMBINEES AFM-SECM PORTANT DES CHAINES FC-PEG **74**

Fabrication et caractérisation **74**
1 Introduction 75
2 Fonctionnalisation d'une sonde AFM-SECM en deux étapes : utilisation du Fc-PEG-NHS 75
3 Caractérisation de la pointe Fc-PEGylée par AFM-SECM : courbes d'approche en force et en courant 77

4 Détection spécifique de la présence des chaînes Fc-PEG portées par la pointe. Etude de la dépendance du courant de pointe en fonction du potentiel de pointe et du potentiel de substrat 82
5 Mise en évidence du « positive feedback » et détermination du coefficient de diffusion d'une sonde Fc-PEGylée en AFM-SECM 86
6 Conclusions 89
Bibliographie 90

FIABILISATION DES SONDES FC-PEGYLEES 91
1 Introduction 92
2 Les sources d'irreproductibilité 92
3 Greffage simplifié en une seule étape : Fonctionnalisation de la sonde par une nouvelle molécule, le Fc-PEG-disulfure 95
4 Identification des facteurs d'instabilité – Les précautions 99
5 Greffage du Fc-PEG-disulfure sur pointe AFM-SECM : Validation de l'emploi de cette molécule pour la production de sonde Fc-PEGylée 101
6 Conclusions 102

MICROSCOPIE AFM-SECM EN MODE TAPPING AVEC UNE POINTE FC-PEGYLEE 103
1 Comment utiliser une sonde Fc-PEGylée pour imager un substrat ? Vers l'utilisation du mode tapping 104
2 Utilisation du mode tapping en AFM-SECM 105
3 Réponse en amplitude et en courant d'une sonde Fc-PEGylée amenée en mode tapping au voisinage d'un substrat d'HOPG 108
4 Imagerie topographique et électrochimique d'un substrat de HOPG en mode tapping avec une sonde Fc-PEGylée 114
5 Conclusions 124
Bibliographie 125

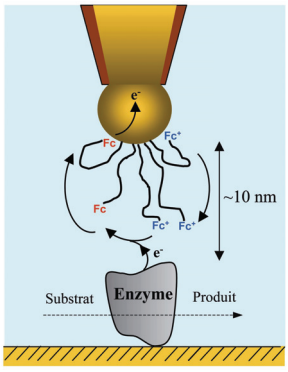
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 126

PARTIE EXPERIMENTALE 128
1 Fabrication des sondes AFM-SECM 129
2 Fabrication des surfaces d'or planes 137
3 Greffage sur pointe AFM-SECM de chaînes Fc-PEG 138
4 Fabrication du tampon phosphate pH = 7, I = 0,1 M 139
5 Provenance des produits chimiques 139

Introduction

Alors que les techniques à champ proche les plus couramment utilisées permettent aisément d'avoir accès à des informations topographiques à l'échelle du nanomètre, le microscope électrochimique (SECM),[1a] véritable microscope du chimiste donnant une image de la réactivité locale d'un échantillon, semble devoir durablement se limiter au domaine du micron, en particulier pour l'étude fonctionnelle de systèmes biologiques.[1b-c] Cette limitation tient en partie aux contraintes technologiques relatives à la préparation d'électrodes sondes mais surtout à un obstacle fondamental : comme ce microscope « sonde » la surface par l'intermédiaire de la diffusion d'espèces en solution, seul le fonctionnement de systèmes suffisamment rapides pour pouvoir interagir avec les espèces formées à l'électrode avant que celles-ci ne soient dispersées par la diffusion sphérique peut être étudié.[2] L'accès du microscope électrochimique au domaine du nanomètre permettrait pourtant d'étudier le fonctionnement de systèmes biologiques nanométriques au premier rang desquels les machineries moléculaires biochimiques telles les enzymes. A cette échelle, cela signifierait avoir accès au fonctionnement d'une seule molécule d'enzyme.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet visant à l'élaboration d'une microscopie électrochimique à l'échelle du nanomètre rendue possible par la mise au point de microélectrodes, utilisées comme sondes locales, à la surface desquelles seront greffées des chaînes flexibles de polyéthylène glycol à tête rédox ferrocène (Fc-PEG), interagissant (idéalement) avec une molécule unique d'enzyme immobilisée sur une surface. L'intérêt de cette configuration est de pouvoir confiner indéfiniment les têtes ferrocènes au voisinage de l'enzyme, leur donnant ainsi le temps de servir de médiateur enzymatique, là où un médiateur libre en solution serait, à cette échelle, trop rapidement dispersé par diffusion. Notons également que cette microscopie permettra aux têtes rédox de véhiculer localement les électrons vers/depuis les sites rédox enzymatiques, qui sont en règle générale enfouis au sein du cœur protéique des enzymes et donc inaccessibles à une simple microélectrode métallique nue. Afin de pouvoir positionner la microélectrode portant les chaînes à une échelle nanométrique,



cette dernière sera utilisée comme sonde combinée au sein d'un appareillage couplant la microscopie à force atomique (AFM) et électrochimique (SECM).

La mise au point de ce microscope combiné AFM-SECM a fait l'objet de la thèse de Jeremy ABBOU (soutenue en 2004). Le couplage des microscopies électrochimique et à force atomique a nécessité le développement d'un procédé inédit de fabrication de microélectrodes sphériques, d'une taille de quelques centaines de nanomètres, au comportement électrochimique irréprochable et pouvant être utilisées comme sondes combinées AFM-SECM. En approchant une sonde combinée AFM-SECM *nue* d'une surface d'or portant des chaînes de Fc-PEG, la relation entre la force appliquée à la couche de PEG et la dynamique du mouvement des têtes ferrocènes a également été étudiée expérimentalement.

Mon travail de thèse a donc consisté à reprendre les travaux de Jeremy Abbou et à *poursuivre* le développement de la microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde. Ma première tâche a été de mettre au point une technique permettant la fonctionnalisation des sondes combinées AFM-SECM par des chaînes Fc-PEG. La caractérisation du comportement en AFM-SECM des sondes ainsi « Fc-PEGylées », ainsi que la fiabilisation de leur procédé de fabrication, ont ensuite été abordées. Enfin la possibilité d'employer les sondes Fc-PEGylées pour acquérir simultanément l'image topographique et électrochimique d'un substrat a été démontrée.

Mais, en tout premier lieu, il m'a fallu acquérir le savoir-faire nécessaire à la mise en œuvre de la microscopie à force atomique combinée à la microscopie électrochimique.

Aussi, le principe de fonctionnement respectif de ces deux types de microscopie, ainsi que les contraintes inhérentes à leur couplage, sont exposés ci-après.

---

1 - (a) *Scanning Electrochemical Microscopy*, Bard, A. J.; Mirkin, M. V., Eds.; Marcel Dekker: New York, **2001**. (b) Sun, P.; Laforge, F.O.; Mirkin, M.V. *Phys.Chem*. **2007**, *9*,802-823. (c) Wittstock, G.; Burchardt, M.; Pust, S.E.; Shen, Y.; Zhao, C. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2007**, *46*, 1584-1617.

2 - Pierce, D.T. ; Bard, A.J. *Anal. Chem*. **1993**, *65*, 3598-3604.

Les microscopies électrochimiques (SECM), à force atomique (AFM) et leur couplage

1 La microscopie électrochimique - SECM

1.1 Principe de fonctionnement

1.2 Pourquoi coupler SECM et AFM ?

2 La microscopie à force atomique - AFM

2.1 Principe et possibilités

2.2 Etude par AFM de surfaces indéformables en mode contact

3 La microscopie couplée AFM-SECM

3.1 Fabrication des pointes AFM-SECM

3.2 Caractérisation des pointes AFM-SECM

4 Conclusions

1 La microscopie électrochimique - SECM

1.1 Principe de fonctionnement

La microscopie électrochimique à balayage, SECM pour « scanning electrochemistry microscopy », est une microscopie à sonde locale dont le principe de fonctionnement[1,2] consiste à approcher une ultramicroélectrode (UME)[3] d'une surface, dite substrat, l'ensemble étant immergée dans une solution contenant une espèce rédox (couple R_{ed}/O_x).

Les sondes locales du SECM étant constituées d'UME, il est donc nécessaire d'en présenter les principales caractéristiques.

1.1.1 Comment fonctionne une ultramicroélectrode (UME) ?

Intéressons-nous au cas d'une UME immergée dans une solution contenant un électrolyte support et un médiateur rédox sous sa forme réduite R_{ed} à une concentration $C^0_{R_{ed}}$. Dans la solution sont immergées également une contre-électrode et une électrode de référence permettant, grâce à un potentiostat, d'appliquer à l'UME un potentiel suffisant pour que l'espèce rédox soit oxydée. La réaction d'échange d'électron qui se produit à l'électrode est alors :

$$R_{ed} \xleftrightarrow{E^0, k_s, \alpha} O_x + e^-$$

avec E_0, le potentiel standard du couple rédox, k_s, la constante de vitesse de transfert électronique hétérogène et α, le coefficient de transfert pris égal à 0,5.

Le balayage en potentiel de l'UME, pour des vitesses de balayage suffisamment faibles, permet la mesure d'un courant stationnaire, i, qui dépend du potentiel appliqué, E, comme décrit par l'équation suivante :[4]

$$i = \frac{AFDaC_P^0}{1 + \exp(-\xi) + \left(m_0/k_S\right)\exp\left(-\alpha\xi\right)}$$

$$\text{avec } \xi = \frac{F}{RT}\left(E - E^0\right)$$

Équation 1

où A est une constante dépendant de la géométrie de l'UME, F est la constante de Faraday, D le coefficient de diffusion des espèces rédox en solution, a le rayon de l'UME, m_0 le coefficient de transfert de masse, α le coefficient de transfert et T la température en Kelvin.

Les termes A et m_0 de l'Équation 1 dépendent de la géométrie de l'UME :

- Dans le cas d'une sphère, $m_0 = D/a$ et $A = 4\pi$,

- dans le cas d'un disque plan, on peut considérer en première approximation que $m_0 = \pi D/2a$ et $A = 4$.

En portant le courant traversant la microélectrode en fonction du potentiel appliqué, on obtient ainsi des courbes intensité-potentiel, où voltammogrammes. Deux voltammogrammes stationnaires calculés à partir de l'Équation 1 sont présentés en Figure 1.

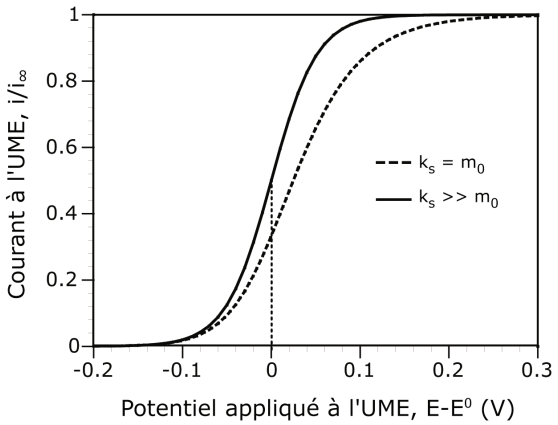


Figure 1 : Voltammogrammes stationnaires, calculés à partir de l'Équation 1. Le courant est divisé par le courant de plateau et le potentiel de l'UME est ajusté par rapport à E^0, le potentiel standard d'un couple rédox. Température : 298 K. En trait plein, le voltammogramme nernstien, c'est à dire pour lequel $k_S >> m_0$ soit k_S/m_0 infini. En trait pointillé, le voltammogramme non nernstien pour lequel $k_S = m_0$. Le trait en pointillé vertical indique le E^0 du couple rédox.

Comme on peut le voir sur la Figure 1, le voltammogramme est fonction du rapport m_0/k_s et deux cas sont présentés :

- Soit le transfert d'électron est nernstien, c'est à dire pour m_0/k_s infini, on obtient alors un potentiel de demi-vague $E_{1/2}=E°$. Ce cas correspond à une vitesse de diffusion plus lente que la vitesse de transfert électronique hétérogène à l'électrode. Le transfert d'électron est alors à l'équilibre.
- Soit m_0/k_s n'est pas infini, le voltammogramme s'étire vers des potentiels plus positifs et par conséquent $E_{1/2} > E°$. Le cas présenté en Figure 1 correspond à $m_0 = k_s$, c'est à dire que la vitesse de transfert d'électron hétérogène se produisant à l'électrode est du même ordre de grandeur que la vitesse de diffusion du médiateur en solution.

Que le transfert d'électron soit nernstien ou non, le courant de plateau stationnaire dépend de la géométrie de l'UME et vaut dans le cas d'une électrode disque plan :

$$i_\infty = 4FDaC^0_{R_{ed}}$$

Ce plateau de courant stationnaire s'accompagne de la formation d'une couche de diffusion stationnaire dont l'épaisseur est du même ordre de grandeur que la taille de l'UME. Cette caractéristique des UME est exploitée en SECM pour sonder la surface du substrat de la manière suivante :

Lorsque la distance d séparant l'UME du substrat est supérieure à l'épaisseur de la couche de diffusion, le courant de plateau stationnaire circulant à travers l'UME n'est pas affecté et vaut i_∞. En revanche, si la distance séparant l'UME de la surface est inférieure à l'épaisseur de la couche de diffusion, c'est à dire $d < a$, la couche de diffusion formée à proximité de l'UME est alors perturbée par la présence de la surface. L'influence de cette perturbation sur l'intensité du courant dépend de la nature du substrat. Ainsi, la mesure de la variation de courant à l'UME en fonction de d permet l'étude de la réactivité du substrat.

1.1.2 Le phénomène de feedback SECM

La variation du courant stationnaire mesuré à l'UME lorsque la distance $d < a$, peut correspondre à deux cas limites :

- soit le courant augmente ($i > i_\infty$) lorsque d décroît, c'est le cas pour une surface conductrice (Figure 2a),
- soit le courant diminue ($i < i_\infty$) avec la réduction de l'écart entre l'UME et la surface, c'est le cas pour une surface isolante (Figure 2b).

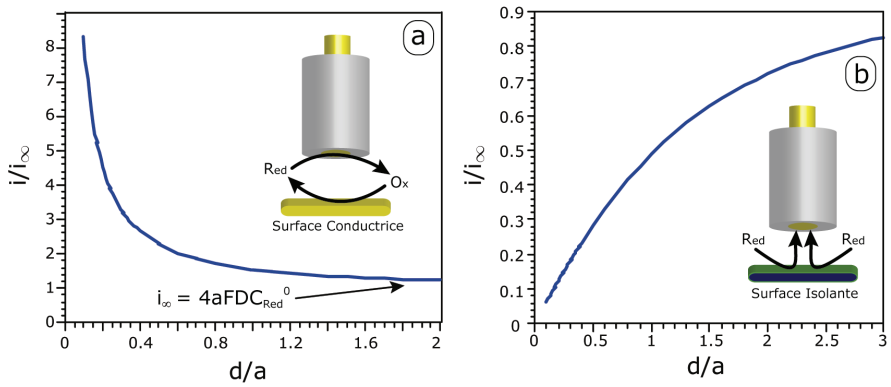


Figure 2 : Courbes d'approche représentant le courant mesuré à l'UME en fonction de la distance entre la sonde et le substrat pour différentes surfaces. a) Cas d'une surface conductrice à régénération rapide pour lequel un phénomène caractéristique de « positive feedback » est observé, b) Cas d'une surface isolante pour lequel un phénomène caractéristique de « negative feedback » est observé. La distance d séparant l'UME de la surface est normalisée par rapport à a, le rayon de l'UME. Le courant mesuré à l'UME est normalisé en fonction du courant de plateau stationnaire i_∞.

Dans le premier cas limite présenté en Figure 2a, la surface *conductrice* régénère l'espèce R_{ed}, à partir de l'espèce O_x produite à l'UME, et ce de manière infiniment rapide devant la vitesse de diffusion du médiateur en solution. La surface est alors dite à régénération rapide. Les espèces R_{ed} nouvellement régénérées à la surface retournent ensuite s'oxyder en O_x à l'UME. Le cycle effectué par les espèces rédox amplifie donc le courant qui circule dans l'UME. En outre, plus la distance UME-surface diminue, plus la boucle du cycle à parcourir par le médiateur rédox est courte, et plus le courant est intense. Ce phénomène d'amplification du courant collecté à l'UME est appelé le « *positive feedback* » SECM.

Dans le second cas limite présenté en Figure 2b, la surface est *isolante* et ne permet pas la régénération de l'espèce R_{ed} oxydée à l'UME. De plus, la diffusion des espèces rédox vers la microélectrode est d'autant plus gênée par la surface isolante que la distance d'approche se réduit, engendrant une diminution du courant collectée à l'UME. Ce phénomène est appelé le « *negative feedback* » SECM.

Le fonctionnement du SECM repose donc, schématiquement, soit sur un phénomène de régénération des espèces rédox transformées à l'UME, amplifiant le courant mesuré, soit sur un blocage des espèces diffusant à l'UME, diminuant alors le courant mesuré. Dans chacun des cas, le SECM fonctionne dans un mode désigné par le terme général de « *amperometric feedback* ».

Cependant, les substrats étudiés présentent en réalité une réactivité finie vis à vis du médiateur, dont ils régénèrent la forme initiale (R_{ed}) à une vitesse finie V_{sub} (en s^{-1}). Cette vitesse peut être reliée à une constante de vitesse de transfert d'électron hétérogène k_{sub} (en cm/s), par :

$$V_{sub} = k_{sub} / a$$

On identifiera dans cette étude le cas où le transfert électronique entre le médiateur rédox libre en solution et le substrat se produit soit avec des espèces immobilisées sur la surface ou, soit de manière hétérogène avec la surface elle-même. La Figure 3 illustre ce dernier cas.

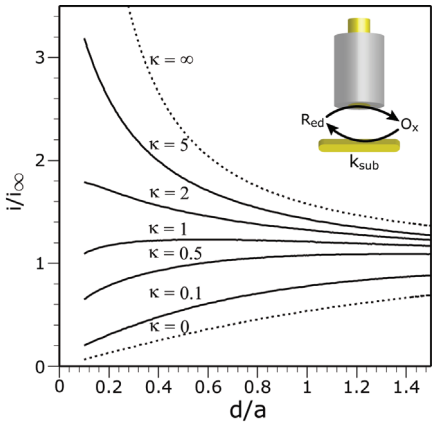


Figure 3 : Courbes d'approche théoriques d'une UME (disque plan) approchant une surface conductrice portée à un potentiel suffisant pour régénérer l'espèce rédox R_{ed} à partir de l'espèce O_x produite à l'UME. La distance d séparant l'UME de la surface est normalisée par rapport à a, le rayon de l'UME. Les courbes d'approche sont calculées pour des valeurs différentes de κ, un paramètre adimensionnel qui caractérise le rapport entre la vitesse de transfert hétérogène d'électron au substrat et la vitesse de la diffusion du médiateur. Les valeurs de κ sont indiquées au-dessus de chaque courbe. Les deux courbes en pointillés situées au-dessus et en dessous des courbes en trait plein sont les cas limites, où le substrat est respectivement à régénération rapide et isolant.

On constate que les courbes d'approche dépendent d'un paramètre adimensionnel κ qui reflètent la vitesse de régénération du médiateur par le substrat. Plus quantitativement κ est défini comme le rapport entre la vitesse de transfert électronique hétérogène à la surface du substrat (V_{sub}) et la vitesse de diffusion du médiateur (V_{diff}), défini par $V_{diff} = D/a^2$, on a donc :

$$\kappa = V_{sub} / V_{diff} = a \times k_{sub} / D$$

Comme on peut le voir sur la Figure 3 (courbe en pointillé), les deux cas limites décrits précédemment, surface isolante ou conductrice à régénération rapide, sont définis respectivement par $\kappa = 0$ et $\kappa = \infty$.

L'aspect des courbes d'approche dépendant de la valeur exacte de κ, on voit que selon cette valeur, et donc suivant les valeurs respectives de k_{sub}, a et d, on peut passer d'un phénomène de « positive feedback » au « negative feedback ». L'analyse fine de ce type de courbe permet la détermination de k_{sub} et donc la quantification de la réactivité du substrat.

Ceci nous amène a exprimer de manière plus quantitative, un phénomène évoqué en introduction générale de ce manuscrit, et qui est à l'origine de ce sujet de thèse : à savoir *l'impossibilité d'accéder au fonctionnement cinétique d'un objet aussi petit et au fonctionnement aussi « lent » qu'une molécule d'enzyme unique en utilisant le SECM avec un médiateur soluble*. En effet, afin de sonder la réactivité d'une molécule d'enzyme unique, et de la localiser sur le substrat, on conçoit aisément qu'il est nécessaire d'employer des sondes d'une taille voisine de celle de l'enzyme, ceci impose a ~10 nm. En considérant une valeur typique pour le coefficient de diffusion d'un médiateur rédox en solution

de $D \sim 5\ 10^{-6}$ cm^2/s, on voit que $V_{diff} = D/a^2 = 5\ 10^6$ s^{-1}. Sachant que typiquement la cinétique enzymatique est caractérisée par $V_{sub} \sim 10^3$ s^{-1} on obtient dans notre cas $\kappa = V_{sub} / V_{diff} = 2\ 10^{-4}$. L'inspection de la Figure 3, nous révèle que, pour une si faible valeur de κ, la courbe d'approche obtenue ne reflèterait aucunement la cinétique de l'enzyme, mais serait celle typique d'un négative feedback !

Pour être complet, précisons que nous décrivons ici le fonctionnement du SECM en mode ampérométrique, « tip generation / substrat collection », c'est à dire où l'électrode est utilisée pour produire une espèce qui est détectée par le substrat. Il existe d'autres modes de fonctionnement du SECM, mais que nous ne détaillons pas ici car ils ne sont pas pertinents pour notre projet.

1.1.3 Utilisation du SECM en mode imagerie

En microscopie électrochimique, la topographie d'un substrat peut être établi en parcourant la surface avec une UME positionnée à une distance *d fixe* au-dessus du substrat et, en enregistrant le courant mesuré à l'électrode. Par exemple, l'enregistrement du courant à l'UME lors du parcours d'une surface complètement isolante ou présentant des plots conducteurs est schématisé en Figure 4 a et b.

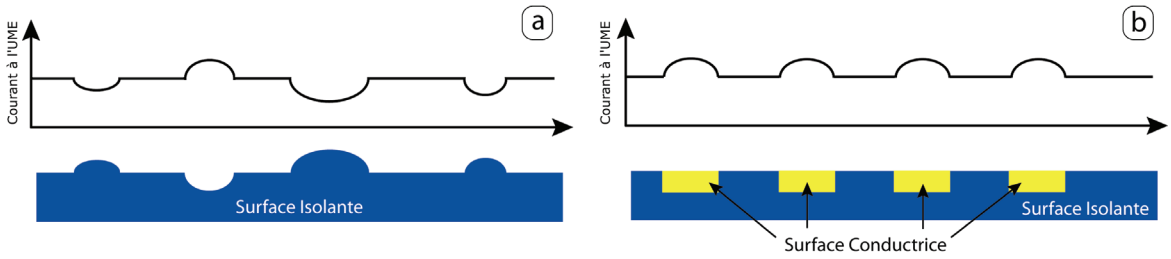


Figure 4 : Schéma représentant la topographie obtenue en SECM sur surface isolante ou présentant des plots conducteurs. La topographie du substrat est enregistrée en mesurant le courant à l'UME durant le parcours de la sonde au-dessus du substrat.

Sur la Figure 4a est représentée l'intensité du courant mesuré à l'UME lorsque celle-ci parcourt une surface isolante. On peut observer que la réduction de l'écart entre l'UME et la surface isolante lors du passage sur une bosse, entraîne une diminution du courant collecté à l'UME, par blocage de la diffusion de l'espèce rédox. A l'inverse, l'augmentation de l'écart entre l'UME et la surface isolante lors du passage au-dessus d'un creux, permet la diffusion des espèces rédox vers l'UME, entraînant ainsi une augmentation du courant mesuré à l'UME. Il s'agit ici d'un cas où la réactivité électrochimique du substrat est homogène : le substrat est uniformément isolant. En conséquence, les variations du courant reflètent *uniquement* la topographie de la surface.

Sur la Figure 4b, on peut observer qu'une augmentation du courant mesuré à l'UME a lieu lors du passage de la sonde au-dessus d'un plot conducteur placée à un potentiel permettant d'effectuer la réaction rédox inverse à celle se produisant à l'UME. Cette fois ci, la variation du courant parcourant l'UME ne reflète pas la topographie du substrat mais *uniquement* sa réactivité électrochimique locale.

Ainsi sur l'exemple du mode imagerie, nous venons d'illustrer le fait qu'en SECM le courant mesuré dépend *conjointement* de la topographie *et* de la réactivité locale du substrat. Afin de déconvoluer ces informations il est nécessaire de coupler le SECM à une autre technique à champ proche. L'équipe a choisi de faire pour cela appel à la microscopie à force atomique, l'AFM.

1.2 Pourquoi coupler SECM et AFM ?

A ce stade, nous avons vu que le SECM permettait de sonder la réactivité d'un substrat. Mais pour cela, nous avons admis que la distance *d* était connue sans pour autant indiquer comment sa valeur était évaluée. En effet, seul le mouvement du tube piézoélectrique portant la microélectrode est connu, sans pour autant maîtriser réellement la valeur de *d* entre la sonde et le substrat. Typiquement, la valeur de *d* est obtenue en ajustant les courbes d'approche expérimentales par rapport aux courbes théoriques. Mais, cet ajustement n'est univoque que pour l'un des cas limites où le substrat est à régénération rapide ou isolant. Or, pour les substrats enzymatiques qu'on se propose d'étudier, le médiateur est régénéré à une vitesse finie due à la réactivité de l'enzyme. Ainsi, le courant mesuré à l'UME dépend de la distance d'approche de la sonde vers le substrat, mais également de la cinétique du fonctionnement de l'enzyme. La multitude de paramètres à considérer empêche donc une détermination précise de la distance d'approche *d*.

Un accès indépendant à *d* est par conséquent nécessaire et c'est pour cela que le couplage avec l'AFM a été réalisé avant mon arrivée dans l'équipe.

Voyons à présent, par un rappel de la technique de fonctionnement de l'AFM, comment celui-ci permet l'obtention de *d*, et de bien plus encore…

2 La microscopie à force atomique - AFM

2.1 Principe et possibilités

Le microscope à force atomique ou AFM pour « atomic force microscopy » permet en autre d'obtenir l'image en topographie d'un substrat. Son

principe repose sur la détection des interactions localisées du type force de Van der Waals, électrostatique ou autres, entre une pointe effilée et la surface.[5]

Pour cela, la pointe est fixée au bout d'un bras flexible qui fléchit en fonction des forces plus ou moins intenses s'appliquant sur l'extrémité de la pointe lorsque celle-ci approche une surface (Figure 5).

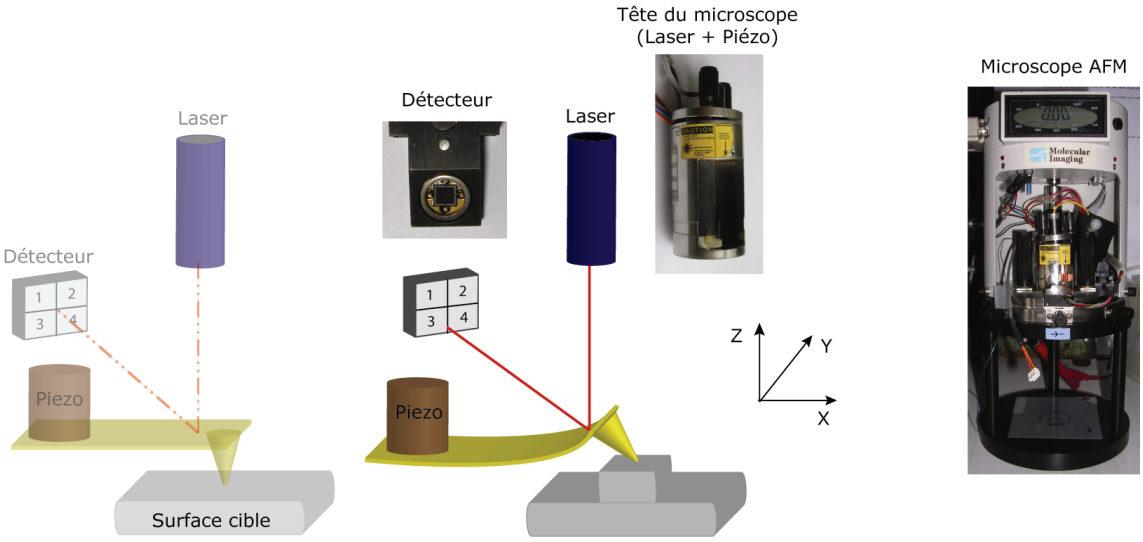


Figure 5 : Schéma du principe de fonctionnement de l'AFM

Comme on peut le voir sur la Figure 5, les variations de hauteur de la pointe sont détectées par un faisceau laser réfléchi par la surface plane du bras flexible vers un détecteur à quatre cadrans. Ce détecteur est constitué de photo-diodes permettant de transcrire fidèlement les mouvements verticaux et de tangage effectués par la pointe.

Avant l'approche de la pointe AFM vers la surface, une valeur de déflection limite, typiquement de 1 V, est indiquée à la boucle d'asservissement contrôlant le piézoélectrique, afin de permettre le maintien en contact de la pointe sur la surface.

Ce mode de fonctionnement est appelé le mode « *contact* » et a constitué le mode d'utilisation principale de l'AFM au cours de ce manuscrit. Seule la dernière partie (« Microscopie AFM-SECM en mode tapping avec une pointe Fc-PEGylée ») traite d'un autre mode d'utilisation de l'AFM, le mode « *tapping* » dont le principe repose sur le contact intermittent de la pointe AFM avec la surface. Ce mode sera détaillé en temps utile.

2.2 Etude par AFM de surfaces indéformables en mode contact

2.2.1 Les courbes d'approche en déflection

L'enregistrement de la variation de déflection (*Def*) du laser, en fonction de l'élongation Z_{piezo} du tube piézoélectrique portant la pointe AFM, permet d'établir une courbe d'approche caractéristique du substrat étudié.

Lors de l'approche d'une pointe AFM d'une surface indéformable, la courbe d'approche typiquement enregistrée est présentée en Figure 6.

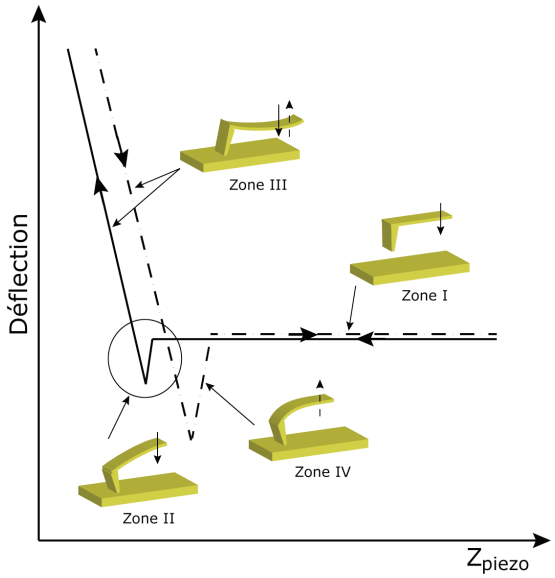


Figure 6 : Courbe d'approche/rétraction d'une pointe AFM vers une surface indéformable où la déflection du bras flexible, détectée par le mouvement du laser sur la photodiode, est portée en fonction de l'élongation du tube piézoélectrique Z_{piezo}. En trait plein, la pointe est approchée vers la surface et en tiret, elle est reculée.

Comme on peut le voir sur la Figure 6, les courbes enregistrées présentent un décalage entre l'approche (en trait plein) et la rétraction (en tiret) dû à l'hystérésis dans le mouvement du piézoélectrique.

La courbe en déflection enregistrée durant l'approche / la rétraction d'une pointe AFM vers une surface indéformable peut être décomposée en 4 zones distinctes caractéristiques. Détaillons les, selon le sens de parcours indiqué par les flèches, où la sonde est approchée de la surface puis retirée.

Zone I : la pointe est loin de la surface, il n'existe aucune force d'interaction pointe-surface.

Zone II : on observe un décrochement abrupt de la déflection traduisant l'attraction du bras flexible vers la surface, jusqu'au contact brutal entre l'extrémité de la pointe AFM et la surface. Ce phénomène appelé « jump to

contact » se produit lorsque des interactions (par exemple du type Van der Waals) s'exercent entre la pointe AFM et la surface. Ce phénomène se produit lorsque le gradient de force locale excède la valeur de la constante de raideur de la pointe, ce qui implique que le « jump to contact » n'est pas obligatoirement visible si la raideur du bras flexible est trop importante.

Zone III : La pointe est en contact dur avec la surface. Le bras flexible est alors défléchi vers le haut en réponse à l'élongation du tube piézoélectrique. La variation de l'angle du bras étant faible dans cette gamme de déplacement, la déflection varie linéairement avec l'élongation du piézoélectrique. Cette zone linéaire est présente lors de l'approche mais aussi lors de la rétraction de la sonde.

Zone IV : une augmentation brutale de la déflection est détectée, traduisant un phénomène d'adhésion de la pointe AFM sur la surface.

Les courbes d'approche peuvent permettre de déterminer précisément la position de la pointe AFM par rapport à la surface, c'est à dire la distance d. Mais, comme on peut le voir sur la Figure 6, les courbes d'approche sont enregistrées en fonction de Z_{piezo} et non de d. Il faut donc, convertir Z_{piezo} en d, la distance séparant la pointe AFM de la surface.

Dans un second temps, on peut également convertir *Def* en force F afin d'aboutir à des courbes d'approche $F = f(d)$.

2.2.2 Conversion des courbes d'approche

Pour pouvoir retracer les courbes d'approche brutes (Figure 6) en fonction de d, il faut tout d'abord déterminer Z_0, la valeur de l'élongation du tube piézoélectrique pour laquelle la sonde entrerait en contact dur avec la surface si aucune interaction n'existait avec la surface (Figure 7 a et b).

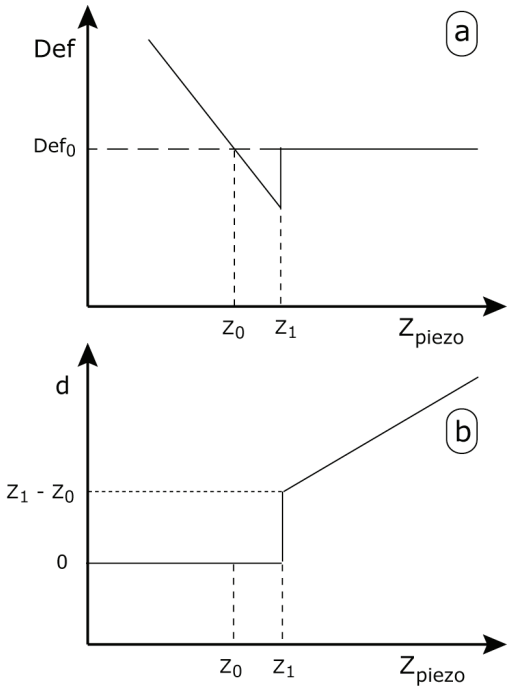


Figure 7 : Graphe illustrant la détermination de Z_0 et Z_1, respectivement à l'intersection du prolongement des droites de la courbe d'approche correspondant aux zones I et III et l'élongation du piezo où la pointe AFM entre en contact brutal avec la surface (jump to contact). (a) Courbe d'approche brute *Def* en fonction de Z_{piezo}. (b) Courbe $d = f(Z_{piezo})$ illustrant la variation brutale de d lors du « jump to contact » en Z_1.

Comme on peut le voir sur la Figure 7a, Z_0 est déterminé à l'intersection du prolongement des droites de la courbe d'approche correspondant aux zones I et III, afin de prendre en compte les variations de hauteur de la pointe quand celle ci est attirée vers la surface.

La conversion de Z_{piezo} en d est ensuite effectuée par la formule suivante :

$$d = Z_{piezo} - Z_0$$

Mais cette équation impose certaines restrictions, car elle ne sera valable que pour $Z_{piezo} \geq Z_1$. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 7b, dès que $Z_{piezo} = Z_1$, la pointe AFM entre en contact brutal avec la surface (« jump to contact ») et d devient nulle.

D'une façon plus générale, en présence de forces à distances, c'est à dire de forces ressenties par la pointe avant le contact avec le substrat, il faut également prendre en compte pour le calcul de d la valeur de Z_{tip}, la variation de hauteur de la pointe par rapport à sa position d'équilibre, on a alors :

$$d = Z_{piezo} - Z_0 - Z_{tip}$$

Les courbes d'approche brutes enregistrées ne fournissent pas Z_{tip} directement mais *Def*, la variation de la déflection de la pointe détectée par les photodiodes (en volt). Il faut donc convertir *Def* en Z_{tip}, grâce à la sensibilité

des photodiodes de l'AFM correspondant à la pente de la zone III. Cette pente *b* acquise en V/nm, permet le calcul de Z_{tip} grâce à l'équation suivante :

$$Z_{tip} = (Def - Def_0) / b$$

avec Def_0, la déflection en volt au point d'abscisse Z_0 et *b*, la pente de la droite correspondante à la zone III.

Par ailleurs, on peut également retracer les courbes d'approche brutes en convertissant *Def* (ou Z_{tip}) en *F*, la force appliquée à la surface par la pointe. Cette force est calculée simplement grâce à la loi de Hooks décrite par l'équation suivante :

$$F = k_{probe} \times Z_{tip}$$

avec k_{probe}, la constante de raideur de la pointe AFM, déterminée selon différents procédés décrit plus loin (voir paragraphe 3.2.2).

Au delà de la simple détermination de *d*, l'approche de surface en microscopie à force atomique apporte un certain nombre d'information concernant l'interaction sonde-surface, notamment par l'examen de la courbe d'approche en zone II. On note également que l'AFM n'est destructeur ni pour la surface ni pour la pointe car l'intensité des forces appliquées est maîtrisée par l'expérimentateur. La pointe AFM et la surface peuvent être réutilisées à l'infini tant que les propriétés mécaniques ne sont pas altérées par un phénomène extérieur (destruction de la pointe au démontage,…).

2.2.3 Imagerie d'une surface en mode contact

En microscopie à force atomique, il est possible d'acquérir la topographie tridimensionnelle de la surface. Pour ce faire, la pointe parcourt horizontalement l'ensemble de la surface selon les axes *X* et *Y* grâce à des micropositionneurs à piézoélectrique.

Dans la configuration la plus simple, dite à distance constante, les mouvements du bras flexible au passage sur des bosses ou des creux présents à la surface sont détectés par les photodiodes qui collectent le laser et sont convertis en données topographiques en trois dimensions (*X*, *Y*, *Z* décrite sur la Figure 5). Une image fidèle de la topographie de la surface est alors obtenue.

Dans la configuration dite à force constante, qui est la plus employée, la sonde est approchée de la surface jusqu'à ce que la déflection du bras de la sonde atteigne une valeur imposée par l'expérimentateur : la déflection de consigne. Durant le balayage, c'est la longueur d'élongation ou de rétraction du tube piézoélectrique nécessaire pour maintenir la déflection de la pointe à sa

valeur de consigne qui est utilisée pour construire l'image topographique de la surface.

Notons que la résolution d'un tel microscope est de l'ordre du nanomètre.

3 La microscopie couplée AFM-SECM

Le SECM permet l'étude de la réactivité locale d'un substrat et comme nous l'avons vu précédemment, l'AFM permet un contrôle précis de la distance entre la pointe AFM et le substrat.

Le couplage de l'AFM et du SECM nécessite l'utilisation de sondes compatibles avec ces deux types de microscopie. La disponibilité de telles sondes couplées a largement limité le développement de la microscopie AFM/SECM, qui n'existe aujourd'hui qu'au sein de quelques équipes de recherche au monde.[6,7,8,9,10,11,12] Parmi celles-ci, on distingue celles ayant opté pour des sondes combinées microfabriquées, très sophistiquées mais peu disponibles,[9,10,11,12] et celles ayant décrit la fabrication de sondes « artisanales »,[6,7,8] au premier rang desquelles l'équipe pionnière de Julie MacPherson et Patrick Unwin.

C'est en s'inspirant des travaux de ce groupe Anglais qu'a été précédemment développée au laboratoire une technique de fabrication de sondes combinées. La sonde AFM-SECM développée présente la caractéristique d'être électroactive uniquement à l'extrémité de la pointe tout en permettant d'imager un substrat à l'échelle du nanomètre.

Le mode de fabrication de ces pointes AFM-SECM est brièvement rappelé ci-dessous.

3.1 Fabrication des pointes AFM-SECM

La fabrication de pointe AFM-SECM répondant aux critères imposés par ce projet a nécessité plusieurs étapes de mise au point.

Le choix du matériau de départ s'est porté sur un fil d'or de 60 µm afin de répondre à plusieurs critères. Tout d'abord, il fallait un métal inerte électrochimiquement qui permette de réfléchir le faisceau laser et soit fonctionnalisable par des groupements thiols dont l'affinité particulière pour l'or est connue.

Les différentes étapes de fabrication de pointes AFM-SECM sont la formation du bras flexible, l'électrocorrosion de la pointe, le préformage de la bille à l'extrémité de la pointe AFM-SECM, l'isolation complète et enfin l'exposition sélective de l'extrémité de la pointe. L'électrode ainsi obtenue pré-

sente alors en son extrémité, une bille électroactive de taille submicrométrique connue.

3.1.1 Formation du bras flexible

Tout d'abord, le fil d'or de 60 µm est écrasé entre deux plaques d'inox préalablement polies, afin de réaliser le bras flexible permettant la réflexion du laser. Cette partie doit être parfaitement plane et sans défaut pour ne pas perturber les mesures et est donc contrôlée par microscopie optique.

Cette étape nécessite que les plaques d'inox servant à la compression du fil d'or soit parfaitement plane et de faible rugosité. Le fil d'or est placé entre les plaques polies en le laissant dépasser de 2 à 3 mm du bord des plaques afin de pouvoir réaliser ensuite la pointe proprement dite. L'écrasement est effectué grâce à un étau et forme un bras flexible d'une largeur d'environ 200 à 250 µm et d'une épaisseur *e* typique de l'ordre de 10 à 15 µm. Enfin, la partie non-écrasée du fil d'or, dépassant du bord des plaques d'inox, est alors coudée à 90° par rapport à la partie bloquée entre les plaques, afin de permettre la formation de la pointe par électrocorrosion. (Figure 8).

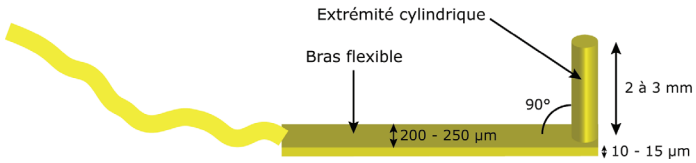


Figure 8 : Représentation schématique d'un fil d'or de 60 µm ayant été écrasé entre deux plaques d'inox polies pour former une partie plane et réfléchissante. L'une des extrémités du fil d'or est repliée à 90°.

3.1.2 Electrocorrosion de l'extrémité cylindrique du fil d'or

L'extrémité cylindrique du fil d'or coudé est alors électrocorrodé en appliquant un potentiel suffisamment élevé pour provoquer la dissolution anodique du fil d'or.

Lors de l'électrocorrosion, il se produit un dégagement gazeux au niveau du fil d'or qui, si l'opération dure trop longtemps (> 2 min), peut tacher la surface du bras flexible. Or, il faut garder à l'esprit que le bras doit pouvoir permettre la réflexion du laser et donc être le plus lisse possible. Pour cela, on ajoute de l'éthanol à la solution de $CaCl_2$, afin de modifier la tension de surface de la solution et ainsi forcer la dispersion des bulles. De plus, on applique un flux d'air continue tout au long de la manipulation qui va également contribuer à chasser les bulles.

La longueur de l'extrémité conique formée à la pointe est comprise entre 150 µm et 1 mm.[13] L'image d'une pointe électrocorrodée réalisée au microscope électronique à balayage (MEB) est présentée en Figure 9.

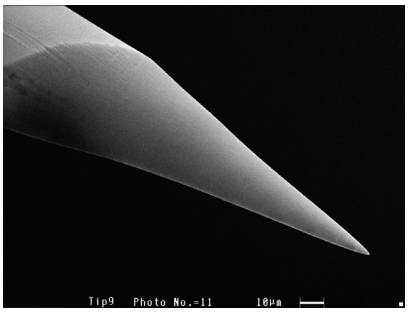


Figure 9 : Image MEB d'une pointe AFM-SECM après l'étape d'électrocorrosion.

L'utilisation d'une sonde AFM-SECM aussi fine pourrait être envisagée,[14,15] mais dans un premier temps, la microscopie à médiateur lié à la sonde qu'on se propose de développer nécessite de préformer à l'extrémité de nos pointes, une bille de taille submicrométrique afin d'amener un plus grand nombre de chaînes Fc-PEG vers le substrat à étudier.

3.1.3 Préformage de l'extrémité de la sonde

Le préformage de l'extrémité sphérique de la sonde au bout de la pointe est une étape importante de la fabrication des pointes AFM-SECM. A cette étape, la taille et la géométrie de la bille doivent être parfaitement contrôlées et calibrées.

La réalisation de la sphère à l'extrémité de la pointe est inspirée d'une technique couramment utilisée en industrie microélectronique, le « ball-bonding ».[16]

Un arc électrique à haute tension de plusieurs milliers de volts est généré entre la pointe électrocorrodée et un fil de tungstène, placés face à face à l'air. Cette décharge électrique entraîne la fusion locale de la pointe et forme une sphère d'or après le refroidissement du système. Pour permettre, le contrôle de l'énergie délivrée pour former l'arc électrique, notre électronicien, Michel DRUET, a mis au point un appareillage capable de générer des pulses haute tension de courte durée.

En outre, l'intensité du pulse est contrôlée en ajustant la distance d_s, séparant la pointe de tungstène de la pointe d'or. Ainsi, lorsque d_s est grand, la tension suffisante pour déclencher l'arc électrique est importante, ce qui engendre une quantité d'énergie supérieure dans la pointe d'or, la sphère formée est alors plus grosse. Une distance d_s typique entre les deux électrodes est de 0,8 mm pour l'obtention d'une bille submicrométrique d'environ 500 nm.

L'image MEB d'une pointe préformée est présentée en Figure 10.

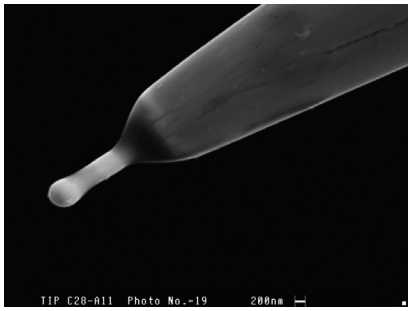


Figure 10 : Image MEB de l'extrémité d'une sonde AFM-SECM après l'étape de préformage. La pointe présente une bille « à queue », c'est à dire portée au bout d'un cylindre d'or. Cette géométrie est préférée car mieux définie que lorsque la bille est préformée à l'extrémité de la pointe effilée sans ce cylindre.

Comme on peut le voir sur la Figure 10, la pointe préformée présente typiquement une bille dite « à queue », c'est à dire au bout d'un cylindre d'or. Ce type de pointe est préféré car bien défini géométriquement.

N'ayant pas aisément accès au MEB, l'évaluation de la taille de la bille est donc généralement effectuée à l'aide d'un microscope optique.

3.1.4 Isolation intégrale du fil d'or par déposition cathodique de peinture électrophorétique

L'isolation de nos sondes AFM-SECM est primordiale car si la pointe n'était pas isolée, le courant de fuite de la pointe AFM-SECM serait très intense et masquerait le courant faradique dû aux chaînes.

L'isolation de nos sondes AFM-SECM est réalisée par électrodéposition cathodique de peinture électrophorétique. Cette technique très répandue dans la fabrication de microélectrode[17,18,19,20,21,22] repose sur la précipitation locale de chaînes de polymère neutre par variation du pH.

Le choix d'une peinture électrophorétique par l'équipe a été guidé par plusieurs raisons. Tout d'abord, cette technique ne nécessite pas la manipulation de la pointe. En effet, la déposition de la peinture se fait spontanément par application d'un potentiel après immersion dans la solution. De plus, ce type de peinture est reconnu pour avoir un pouvoir couvrant important et présente la particularité d'être transparente, permettant ainsi la réflexion du laser sur le bras flexible de notre pointe AFM-SECM.

Le mécanisme régissant la déposition du film de peinture repose sur la variation locale du pH à l'électrode. L'application d'un potentiel suffisamment négatif engendre la réduction de l'eau qui a pour conséquence d'augmenter le pH localement autour de la pointe d'or. Le groupement NH_3^+ porté par les chaînes de polymère se déprotone alors sous l'effet de la variation du pH et

conduit à une précipitation des chaînes sur l'électrode par baisse de leur solubilité. Le film devient ensuite isolant grâce à la réticulation qui s'opère par réaction entre les groupements NH_2 issue de la déprotonation et des groupements diisocyanates présents sur les chaînes de polymère, par exposition à une température élevée (183°C durant 1 heure).

Enfin, la vérification de la qualité de déposition du film de peinture isolant est effectuée par voltammétrie cyclique de –0,05 V à 0,50 V/ECS à une vitesse de balayage de 50 mV/s, dans une solution de ferrocènediméthanol à 1mM dans KH_2PO_4 à 0,1 M. La présence d'un tracé « plat » indique que le film est parfaitement isolant.

Malgré une isolation électrique parfaite de notre pointe d'AFM-SECM, on souhaite pourtant que la sphère présente à l'extrémité de la pointe soit électroactive. Pour cela, l'équipe a mis au point un procédé original d'exposition sélective de l'extrémité de la pointe.

3.1.5 Exposition sélective de l'extrémité de la sonde AFM-SECM

L'exposition sélective de nos pointes AFM-SECM est réalisée grâce à l'appareillage précédemment utilisé pour le préformage des sondes. Pour cette étape, l'appareil délivrant des pulses à haute tension est simplement branché différemment. En effet, la pointe AFM-SECM n'est plus exposée directement à l'arc électrique, qui cette fois-ci est généré entre 2 fils d'or sacrificiels. Cependant, la pointe AFM-SECM est reliée au pôle négatif de l'appareillage, où se produit l'augmentation brusque de tension précédant la génération de l'arc électrique.

L'effet de charge et décharge haute tension rapide accentuées par effet de pointe, crée un phénomène de répulsion électrostatique entre le film isolant et l'or de la pointe AFM-SECM. La peinture isolante est alors soufflée à l'extrémité de la pointe AFM-SECM, laissant à nu l'extrémité sphérique de la sonde.

L'exposition sélective est ensuite caractérisée par voltammétrie cyclique de –0,05 V à 0,50 V/ECS à une vitesse de balayage de 50 mV/s, dans la solution de ferrocènediméthanol à 1 mM dans KH_2PO_4 0,1 M employée précédemment pour tester l'isolation des pointes. On obtient alors un voltammogramme caractéristique d'une UME reflétant ainsi l'exposition sélective de notre pointe. L'évaluation de la surface électroactive de l'extrémité sphérique de la sonde est effectuée électrochimiquement en comparant l'intensité du plateau de courant mesuré à la pointe AFM-SECM, à celui obtenue pour une UME de surface électroactive connue.

A ce stade, on peut estimer que 90 à 100%, des pointes AFM-SECM formées sont utilisables.

3.1.6 Collage sur verre

Afin de pouvoir utiliser notre sonde en AFM-SECM, sur le prisme du microscope, il nous faut la coller sur un support ou « chip ». Le microscope AFM PICOSPM de chez Molecular Imaging s'utilise normalement avec des sondes commerciales pour lesquels la pointe est portée par un support rectangulaire. Les dimensions du support des ces sondes commerciales ont été utilisées pour faire fabriquer des morceaux de verre servant de support au bras flexible de notre sonde AFM-SECM.

La fixation est effectuée par collage avec une colle cyanoacrylate de pureté médicale spécialement sélectionnée par l'équipe pour sa compatibilité avec la peinture isolante.

Lors du collage, on laisse dépasser le bras flexible d'une longueur d'environ 1 à 2 mm, en fonction de la constante de raideur du bras flexible qu'on souhaite obtenir pour nos sondes AFM-SECM.

Durant le séchage, un flux d'air est envoyé sur la zone de collage afin d'évacuer les vapeurs de cyanoacrylate qui se déposeraient sur le bras et contamineraient l'extrémité sphérique de la sonde.

La Figure 11 présente une image MEB d'une pointe AFM-SECM aboutie collée sur chip de verre.

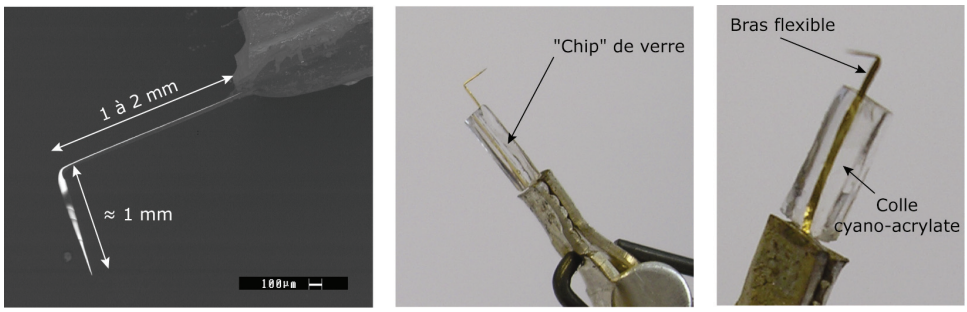


Figure 11 : Images illustrant une pointe AFM-SECM. A gauche, l'image MEB de la sonde AFM-SECM. Au centre et à droite, deux photographies d'une pointe AFM-SECM complète, maintenue par le fil d'or nécessaire à la connexion au bipotentiostat.

La sonde AFM-SECM peut ensuite être montée sur le prisme du microscope AFM et connectée au bipotentiostat par l'intermédiaire d'un fil gainé. La connexion est effectuée entre la partie arrière de la sonde d'AFM-SECM et le fil gainé par un vernis à l'argent, le tout étant isolé électriquement par une graisse au téflon.

3.2 Caractérisation des pointes AFM-SECM

La caractérisation des pointes AFM-SECM est réalisée, selon trois aspects : leur capacité électrochimique spécifique, la constante de raideur de leur bras flexible et enfin, les dimensions de l'extrémité sphérique de la sonde.

Avant mon arrivée, la constante de raideur des sondes AFM-SECM étaient obtenue par calcul à partir de la géométrie du bras flexible. La taille ainsi que la géométrie de l'extrémité sphérique de la sonde était déterminée grâce à l'enregistrement d'une image au MEB.

Afin de compléter la caractérisation des sondes AFM-SECM, nous avons utilisé une méthode expérimentale permettant la détermination de la constante de raideur des pointes et également utilisé les possibilités de l'AFM pour imager l'extrémité de l'extrémité sphérique de la sonde.

3.2.1 Capacité électrochimique des pointes AFM-SECM

Nous avons vu précédemment que la surface électroactive de la sonde pouvait être évaluée électrochimiquement en réalisant un voltammogramme à basse vitesse de balayage dans une solution de ferrocènediméthanol et, en comparant la valeur du courant de plateau de la sonde AFM-SECM, à celui obtenu avec une microélectrode référence de taille définie.

Pour des vitesses de balayages rapides, le voltammogramme présente un hystérésis attribuable à la capacité constituée par l'interface entre la solution et le film de peinture recouvrant la pointe AFM-SECM.

La capacité C de la sonde combinée AFM-SECM peut alors être évaluée grâce à la formule suivante :

$$\Delta i = 2Cv$$

où Δi est la différence de courant mesuré sur le voltammogramme entre le balayage aller et retour pour un potentiel défini et v la vitesse de balayage.

On obtient typiquement pour ce genre d'électrode, une capacité d'environ 100 à 200 pF.

3.2.2 Constante de raideur

La constante de raideur k_{probe} du bras flexible de la sonde AFM-SECM peut être déterminée de deux façons différentes :

Une *première technique* consiste à calculer la constante de raideur d'une pointe AFM-SECM à partir des dimensions du bras flexible en utilisant l'équation suivante :[23]

$$k_{probe}^{th} = Ele^3 / 4L^3$$

La largeur l, et la longueur du bras flexible L, sont déterminées par simple observation avec un microscope optique. Le module d'Young E de l'or pur est pris égal à 8.10^{10} Pa.

L'épaisseur e du bras flexible est évaluée géométriquement en prenant en compte la conservation de la matière au cours du passage de l'état de cylindre (fil) à celui de parallélépipède rectangle (bras flexible). L'épaisseur du bras flexible obtenue par compression d'un fil d'or peut être calculé par :

$$e = \pi r_f{}^2 / l$$

avec r_f, le rayon du fil d'or utilisé et l, la largeur du bras obtenue par mesure au microscope optique. Les épaisseurs théoriques typiquement obtenues sont de l'ordre de 10 à 15 µm. Pour plus de précision, e peut également être déterminé au MEB (Figure 12).

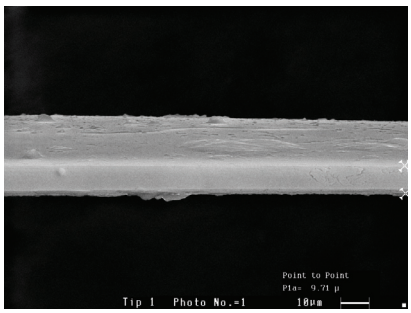


Figure 12 : Image MEB d'un bras flexible d'une pointe AFM-SECM.

Comme on peut le voir sur la Figure 12, l'image MEB d'un bras flexible permet la mesure de e qui est ici de 9,71 µm. Toutefois, cette valeur est parfois inexacte car nous avons pu remarquer que nos bras flexibles étaient souvent plus minces sur les bords, où est prise la mesure, qu'au centre.

On note que l'obtention de la constante de raideur par ce calcul présente de plus un facteur d'erreur important dû à l'incertitude sur la mesure des différents paramètres de l'équation reliant k_{probe} au dimension du bras.

Une *seconde technique* consiste à évaluer expérimentalement la constante de raideur de la pointe AFM-SECM (pointe cible) en appuyant sur celle-ci avec une autre pointe (pointe sonde) de constante de raideur connue k_{sonde} (Figure 13).[24]

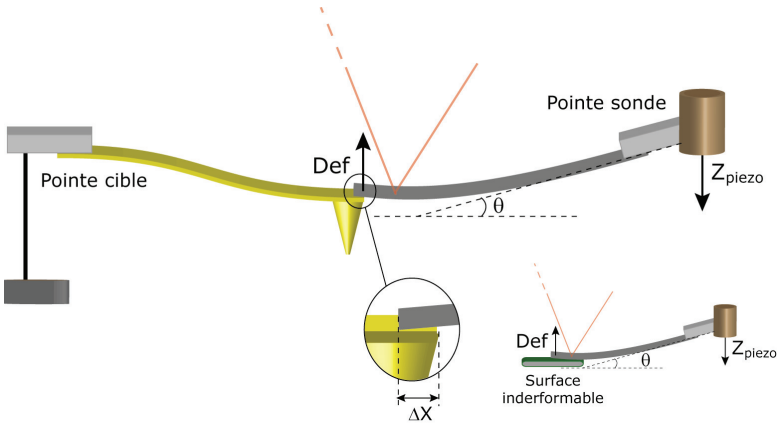


Figure 13 : Représentation schématique du montage permettant la détermination de la constante de raideur de la pointe cible.

Comme on peut le voir sur la Figure 13, la pointe cible et la pointe sonde entrent en contact l'une avec l'autre par l'extrémité du bras flexible de chacune d'elle. Lorsque les deux pointes sont en contact, le tube piézoélectrique continue à s'allonger, créant une flexion des sondes. La variation de déflection (*Def*) de la pointe sonde détectée permet d'établir une courbe d'approche *Def* en fonction de Z_{piezo} et on détermine b_r la pente de la courbe en zone III. Ensuite, la pointe sonde est approchée d'une surface indéformable afin d'évaluer la sensibilité du photodétecteur par détermination de b_d, la pente de la courbe d'approche également dans la zone III.

La constante de raideur de la pointe AFM-SECM k_{probe}, est alors donnée par l'équation suivante :

$$k_{probe} = k_{sonde} b_r \cos\theta / (b_d - b_r)$$

avec k_{sonde}, la constante de raideur connue de la pointe sonde et θ définie graphiquement sur la Figure 13.

Notons, qu'il est primordial que les deux pointes possèdent des constante de raideur de valeurs voisines pour que la sensibilité de la mesure soit correcte. En effet, si la pointe sonde est trop rigide, le bras flexible de la pointe cible fléchit, sans pour autant qu'une flexion du bras de la pointe sonde soit mesurable. A l'inverse, si la pointe sonde est trop flexible, la pointe cible se comporte comme une surface indéformable.

La réalisation d'une série de mesures sur différentes pointes AFM-SECM différentes les unes des autres par leurs dimensions utilisées lors des manipulations, permet d'établir une estimation de l'écart entre la constante de raideur calculée à partir de la géométrie de la sonde et celle obtenue expérimentalement. Les résultats de cette étude sont présentés en Figure 14.

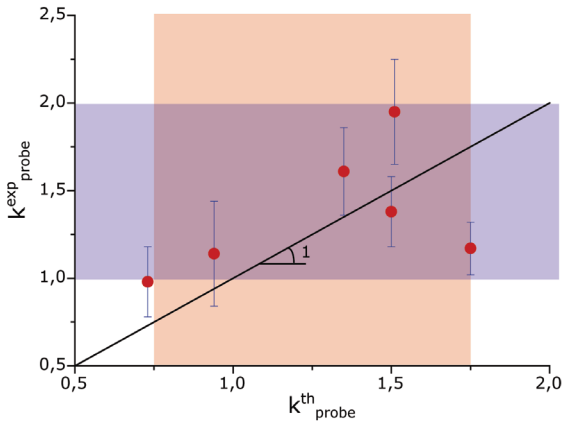


Figure 14 : Comparaison entre les constantes de raideur expérimentale k^{exp}_{probe} et théorique k^{th}_{probe} déterminée sur un panel de pointe AFM-SECM utilisé en manipulation. En bleu, la zone de constante de raideur de nos sondes AFM-SECM typiquement mesuré. En rouge, la zone de constante de raideur de nos sondes AFM-SECM classiquement calculée.

Comme on peut le voir sur la Figure 14, pour nos pointes AFM-SECM, on évalue par la méthode théorique une constante de raideur entre 0,7 et 1,7 N/m, alors qu'expérimentalement, on détermine k^{exp}_{probe} entre 1,2 et 1,9 N/m.

La source majeur de dispersion dans les mesures de la constante de raideur, schématisée par des barres d'erreur sur la Figure 14, s'étalant entre 0,2 et 1,3 N/m, provient de la difficulté à faire coïncider exactement l'extrémité de la pointe sonde et de la pointe cible lors de la mesure. En pratique, la pointe sonde n'appuie pas exactement à l'extrémité du bras de la pointe cible mais à une distance ΔX de celui-ci (voir Figure 13). Hors pour une mesure précise de k_{probe}, ΔX doit être nulle, dans le cas contraire l'erreur sur la constante de raideur croit en ΔX^3.

Toutefois, l'écart entre k^{th}_{probe} et k^{exp}_{probe} est relativement faible, ce qui nous permet d'affirmer que l'on réalise donc une bonne approximation en déterminant la constante de raideur par un simple calcul à partir des dimensions du bras flexible.

3.2.3 Imagerie précise de l'extrémité sphérique de la sonde AFM-SECM par microscopie AFM

L'acquisition d'une image de l'extrémité sphérique de la sonde en AFM apporte un certain nombre d'informations comme la taille réelle de la bille ou sa forme géométrique. Cette image peut être obtenue soit par l'utilisation d'un MEB, soit en AFM.

Cette dernière technique présente l'avantage d'être à disposition au laboratoire et permet la détermination fine de la forme géométrique mais aussi spécifiquement de la rugosité de l'extrémité sphérique de la sonde.

L'imagerie de la sphère en AFM est réalisée grâce à un réseau de nanopointes commerciales (TGT01) conçu spécialement pour ce genre d'application. L'acquisition d'une image en topographie d'une telle surface avec une pointe AFM-SECM plus grosse que les nanopointes présentent sur le support, revient en réalité à imager la pointe AFM-SECM elle-même. En effet, le réseau de nanopointes se comporte comme autant de sondes imageant la pointe AFM-SECM. Les caractéristiques et l'image MEB du substrat TGT01 sont présentées en Figure 15.

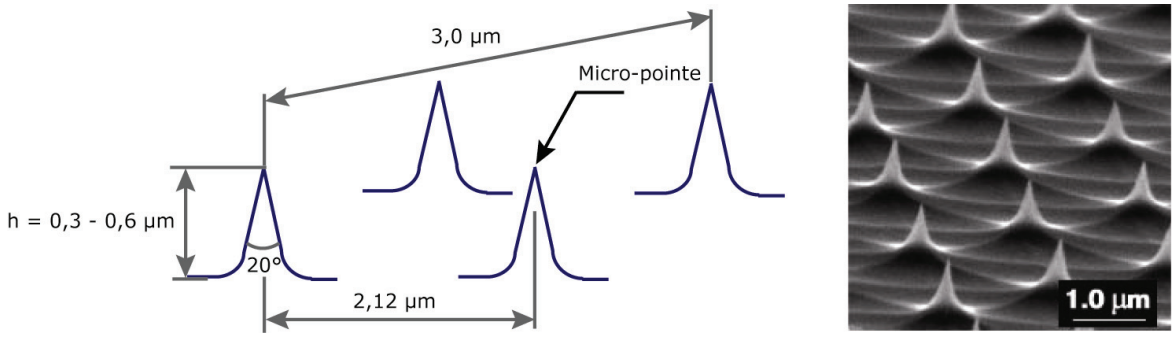


Figure 15 : Caractéristiques et image MEB du substrat TGT01. A gauche, les différents paramètres dimensionnels du réseau TGT01 et à droite, une image MEB de ce même réseau de nanopointes.

Comme on peut le voir sur la Figure 15, le réseau de nanopointe présente un écartement entre les pointes compris entre 2,12 µm et 3 µm, une hauteur *h* d'environ 500 nm et un angle de pointe de l'ordre de 20°.

Ce réseau de nanopointes permet d'imager la partie de la pointe AFM-SECM que verrait un nano-objet immobilisé sur une surface, comme par exemple des chaînes flexibles ou une enzyme.

L'imagerie en topographie de la pointe AFM-SECM est effectuée en parcourant la surface TGT01 en utilisant le mode tapping (décrit à la partie « Microscopie AFM-SECM en mode tapping avec une pointe Fc-PEGylée »), moins agressif vis à vis du réseau de nanopointes. Le mode contact pourrait être employé, uniquement si la constante de raideur du bras flexible approché était inférieure à 1 N/m, selon les spécifications du réseau TGT01. Ce n'est généralement pas le cas de nos pointes AFM-SECM, qui en mode contact, détériorent irréversiblement le réseau de nanopointes TGT01.

Le balayage du réseau, en zoomant sur une nanopointe unique permet typiquement la réalisation de l'image présentée en Figure 16.

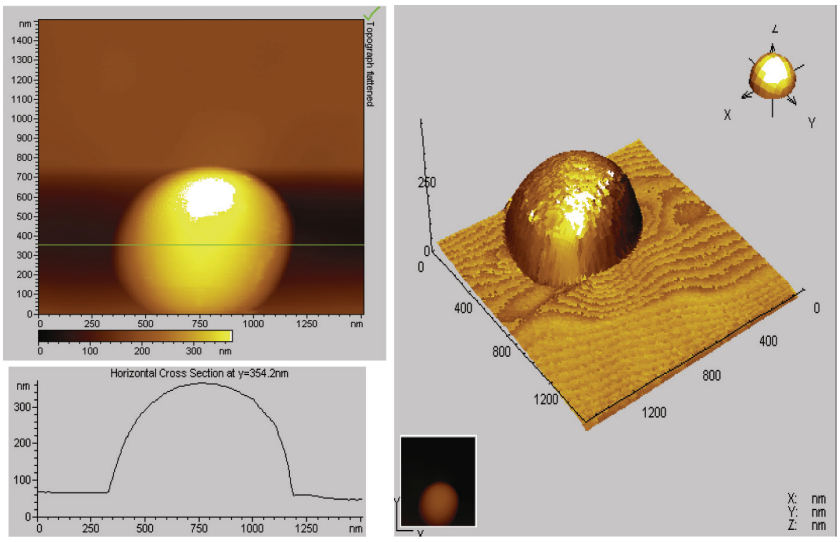


Figure 16 : Image en topographie en mode tapping de l'extrémité sphérique de la sonde d'une pointe AFM-SECM par le réseau TGT01. Sous l'image, la représentation graphique de la coupe de l'image selon la ligne verte au centre de l'image. Surface parcourue par la sonde AFM-SECM : 1511,3*1511,3 nm. Fréquence d'excitation de la pointe AFM-SECM : F_0 = 7,370 kHz.

On peut observer sur la Figure 16 que la pointe AFM-SECM présente une forme géométrique sphérique légèrement aplatie, d'un diamètre d'environ 800 nm, et une faible rugosité.

Afin de déterminer plus précisément la rugosité d'une telle pointe AFM-SECM, on peut réduire la zone de balayage pour qu'elle corresponde à l'extrémité de la sonde sphérique (sommet de la sphère présentée en Figure 16). L'image en topographie d'une zone de 150 nm de coté est présentée en Figure 17.

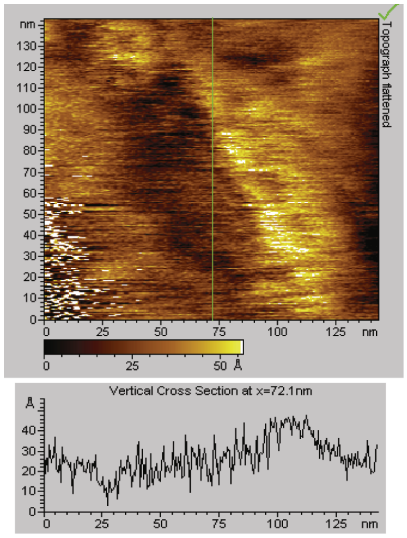


Figure 17 : Image en topographie en mode tapping de l'extrémité sphérique de la sonde d'une pointe AFM-SECM par le réseau TGT01. Sous l'image, la représentation graphique de la coupe de l'image selon la ligne verte au centre de l'image. Surface parcourue par la sonde AFM-SECM : 143,15*143,15 nm. Fréquence d'excitation de la pointe AFM-SECM : F_0 = 7,370 kHz.

Comme on peut le voir sur la Figure 17, la coupe de l'image selon la ligne verte au centre de l'image, et représentée graphiquement sous l'image, montre que la rugosité de l'extrémité sphérique de la sonde est d'environ 2 nm. Cette faible rugosité à l'échelle nanométrique est obtenue grâce à la technique de préformage employée qui, parce qu'elle repose sur la fusion locale de l'extrémité de la sonde, permet d'obtenir une bille sans aspérité.

4 Conclusions

Nous avons présenté la technique originale de fabrication originale de sondes combinées AFM-SECM, qui a été développée au sein de l'équipe lors du travail de thèse de Jeremy Abbou. Ma première tâche, à mon arrivée au laboratoire, a été de me réapproprier tout le savoir-faire que cette technique implique, tout en lui apportant quelques raffinements. Afin de poursuivre mon apprentissage de l'AFM-SECM j'ai alors été associé à un projet de l'équipe portant sur l'étude par AFM-SECM du comportement dynamique de brins courts d'ADN ancrés sur une surface. La partie II de ce manuscrit présentent les résultats de cette étude, qui, bien que s'écartant momentanément de l'objectif de mon travail de thèse, fut très formatrice.

Bibliographie

1 - Bard, A.J; Fan, F-R.F.; Mirkin, M. V. *In Electroanalytical Chemistry*; Bard A.J., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1994**; *Vol. 18*, p 243.

2 - *Scanning Electrochemical Microscopy*, Bard, A. J.; Mirkin, M. V., Eds.; Marcel Dekker: New York, **2001**.

3 - Amatore, C. ; *In Physical Electrochemistry* ; Rubinstein, I., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1995**; p131-208.

4 - Mirkin, V. ; Bard, A.J. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2293-2302

5 - (a) Binnig, G. ; Quate, C. ; Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *49*, 57. (b) *Surface Analysis with STM and AFM*, Maganov, S.N. ; Whangbo, M.-H., Ed.; Weinheim: New York, **1996**.

6 - (a) Macpherson, J. V.; Unwin, P. R.; Hillier, A. C.; Bard, A. *J. J. Am. Chem. Soc* **1996**, *118*, 6445-6452. (b) Macpherson, J. V.; Unwin, P.R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 276-285. (c) Macpherson, J. V.; Webb, M. A.; Unwin, P.R. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 550-557.

7 - (a) Abbou, J.; Demaille, C.; Druet, M.; Moiroux, *J. Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6355-6363.

8 - Davoodi, A.; Pan, J.; Leygraf, C.; Norgren, S. *Electrochimica Acta* **2007**, *52*, 7697–7705.

9 - (a) Kranz, C.; Friedbacher, G.; Mizaikoff, B.; Lugstein, A.; Smoliner, J.; Bertagnolli, E. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2491-2500. (b) Kueng, A.; Kranz, C.; Mizaikoff, B.; Lugstein, A.; Bertagnolli, E. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 1592-1594. (c) Kranz, C.; Kueng, A.; Lugstein, A.; Bertagnolli, E.; Mizaikoff, B. *Ultramicroscopy* **2004**, *100*, 127-134. (d) Kranz, C.; Kueng, A.; Mizaikoff, B.; Lugstein, A.; Bertagnolli, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3238-3240.

10 - (a) Frederix, P.L.T.M.; Gullo, M. R.; Akiyama, T.; Tonin, A.; de Rooij, N.F.; Staufer, U.; Engel, A. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 997-1005. (b) Gullo, M. R.; Frederix, P.L.T.M.; Akiyama, T.; Engel, A.; de Rooij, N.F.; Staufer, U. *Anal. Chem.* **2006**, *78*,5436-5442.

11 - Hirata, Y.; Yabuki, S.; Mizutani, F. *Bioelectrochem.* **2004**, *63*, 217.

12 - Fasching, R.J.; Tao; Y.; Prinz, F.B. *Sens. Act. B* **2005**, *108*, 964-972.

13 - (a) Sørensen, A.H.; Hvid, U.; Mortensen, M.W.; Mørch, K.A. *Rev. Sci. Instrum*. **1999**, *70*,3059-3067. (b) Nam, A.J. ; Teren, A. ; Lusby, T.A.; Melmed, A.J. *J. Vac. Sci. Technol. B*, **1995**, *13*, 1556-1559

14 - (a) Macpherson, J. V.; Unwin, P.R. *Anal. Chem*. **2000**, *72*, 276-285. (b) Macpherson, J. V.; Webb, M. A.; Unwin, P.R. *Anal. Chem*. **2001**, *73*, 550-557.

15 - Boxley, C.J.; White, H.S.; Gardner, C.E.; Macpherson, J.V. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9677-9680.

16 - Striny, K.M. *In VLSI Technology, Second Edition*; Sze, S.M, Editor.; McGraw-Hill, **1988**; *chap. 13*, p589-594

17 - (a) Macpherson, J. V.; Unwin, P.R. *Anal. Chem*. **2000**, *72*, 276-285. (b) Macpherson, J. V. ; Webb, M. A.; Unwin, P.R. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 550-557

18 - Slevin, C. J.; Gray, N. J.; Macpherson, J. V.; Webb, M. A. ; Unwin, P.R. *Electrochem. Commun.* **1999**, *1*, 282-288

19 - (a) Watkins, J. J.; Chen, J.; White, H. S.; Abruña, H. D.; Maisonhaute, E.; Amatore, C. *Anal. Chem*. **2003**, *75*, 3962-3971. (b) Conyers, J. L. ; White, H. S. *Anal. Chem*. **2000**, *72*, 4441-4446

20 - (a) Bach, C. E.; Nichols, R.J.; Beckmann, W.; Meyer, H.; Schulte, A.; Bensenhard, J.O.; Jannakoudakis, P.D. *J. Electrochem. Soc*. **1993**, *140*, 1281-1284. (b) Schulte, A.; Chow, R.H. *Anal. Chem*. **1996**, *68*, 3054. (c) Schulte, A.; Chow, R.H. *Anal. Chem*. **1998**, *70*, 985-990

21 - Szunerits, S.; Tam, J. M.; Thouin, L.; Amatore, C.; Walt, D. R. *Anal. Chem*. **2003**, *75*, 4382-4388.

22 - Chovin, A.; Garrigue, P.; Vinatier, P.; Sojic, N. *Anal. Chem*. **2004**, *76*, 357-364.

23 - Sader, J. E.; Chon, J. W. M.; Mulvaney, P. *Rev. Sci. Instrum*. **1999**, *70*, No. 10

24 - Richard, S.; Reitsma, M. G. Rev. *Scient. Instruments* **2007**, *78*, 086101

Caractérisation de couches moléculaires de brins d'ADN rédox nanométriques ancrés sur surface d'or plane

Exploration du mouvement de brins d'ADN par microscopie AFM-SECM

1 Introduction

2 Etude du système à ADN rédox simple brin, Fc-sbADN

2.1 Assemblage et caractérisation par voltammétrie cyclique

2.2 Caractérisation du système simple brin par microscopie AFM-SECM

3 Etude du système à ADN rédox double brin, Fc-dbADN

3.1 Hybridation de la couche de Fc-sbADN

3.2 Caractérisation du système double brin par microscopie AFM-SECM : Changements structuraux et dynamiques de la couche d'ADN consécutifs à l'hybridation

4 Conclusions

1 Introduction

Ce projet d'étude d'une monocouche de brins d'ADN portant des têtes ferrocènes, greffée sur une surface d'or a été pour moi l'occasion, d'apprendre et de faire « revivre », les nombreux savoir-faire indispensables à la mise en œuvre de cette technique unique, qui, faute d'expérimentateurs, a « dormie» pendant près d'un an. J'ai alors pu réinvestir ensuite ces nouveaux acquis indispensables dans la poursuite du projet qui constitue l'axe central de ma thèse : le développement d'une microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde.

Cette étude a été menée en tandem avec le post-doctorant travaillant spécifiquement sur ce projet pendant 1 an, le Dr Kang WANG.

Cette partie est également l'occasion, de présenter les notions indispensables à la mise en œuvre et à la compréhension de la microscopie électrochimique à force atomique (AFM-SECM).

La compréhension du comportement physico-chimique des oligonucléotides greffés par une extrémité sur une surface est d'une importance capitale dans le développement de biotechnologies fondées sur l'ADN, comme par exemple les biocapteurs à ADN capables de détecter l'hybridation.[1]

Parmi ceux-ci, citons les biocapteurs électrochimiques conformationnels dont le principe de transduction repose sur la détection du changement de conformation de brins d'ADN-rédox greffés, dits brins « sondes », résultant de leur hybridation par des brins « cibles » complémentaires, présents en solution.

Les brins sondes se composent typiquement d'oligonucléotides de quelques dizaines de bases, portant un marqueur rédox à une de leur extrémité, et ancrés sur une surface d'électrode par leur autre extrémité. Dans la vision habituelle du mode de fonctionnent de ces systèmes à ADN, les changements conformationnels des brins d'ADN sonde, consécutifs à leur hybridation, « éloignent » la tête rédox de la surface, ce qui se traduit par une diminution du courant électrochimique. Notre équipe a montré antérieurement,[2] par voltammétrie cyclique rapide, qu'au-delà des simples aspects *conformationnels* de la couche d'ADN, la réponse électrochimique de ce type de capteurs est aussi intimement liée à la capacité de mouvement des brins d'ADN ancrés, c'est à dire, à leur dynamique.

Dans ce cadre, le but du travail présenté dans cette partie a été de démontrer la capacité de la microscopie combinée AFM-SECM à accéder « in situ », en configuration de sonde locale, et donc à l'échelle d'un petit nombre de molécules, à la conformation et à la dynamique de brins d'ADN nanométriques ancrés sur une surface d'électrode.

La démarche expérimentale suivie a été similaire à celle mise en œuvre pour la caractérisation de couches de chaînes linéaires de polyéthylène glycol à tête rédox, qui a constitué le premier exemple d'application de l'AFM-SECM à l'étude de la dynamique de chaînes de polymères nanométriques greffées.

2 Etude du système à ADN rédox simple brin, Fc-sbADN

2.1 Assemblage et caractérisation par voltammétrie cyclique

Le système à ADN redox simple brin Fc-$(dT)_{20}$ (ou Fc-sbADN) étudié se compose d'une monocouche de faible densité d'oligonucléotides homopolymères de séquence $(dT)_{20}$. Ces brins sont marqués à une extrémité, en position 3', par un groupement à bas potentiel rédox alkyl ferrocène (Fc). A l'autre extrémité, en position 5', un groupement thiol assure le greffage covalent sur la surface d'or grâce à l'affinité thiol-or (Figure 18).

Le choix de la séquence s'est porté sur la thymine car cette base est connue pour sa faible adsorption sur les surfaces d'or contrairement aux autres bases formant l'ADN (A,C,G).

L'équipe a précédemment prouvé que ce système « modèle » d'ADN rédox immobilisé est extrêmement stable en milieu aqueux.[3]

Pour le présent travail, la fonction thiol est liée à l'ADN par une chaîne alkyl en C6, connecteur classiquement utilisé pour l'élaboration de biocapteurs conformationnels à ADN.

2.1.1 Assemblage

L'assemblage de la couche de Fc-$(dT)_{20}$ est réalisée par la mise en contact durant 16 heures, de la surface d'or plane pelée, avec les brins d'oligonucléotides redox à bout thiol fraîchement purifiés par HPLC. On obtient ainsi une monocouche moléculaire de brin d'ADN simple ancrée, comme schématisée en Figure 18.

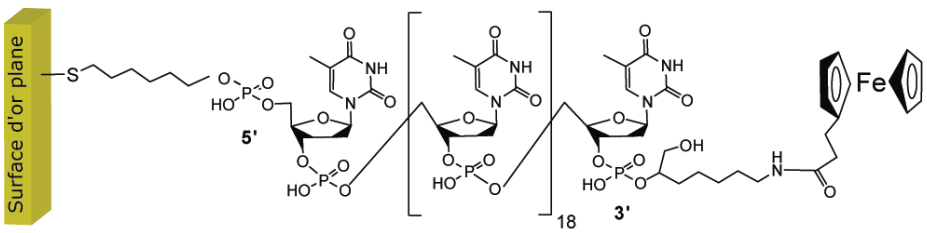


Figure 18 : Schéma d'une surface d'or dérivatisée par un brin d'ADN redox à bout thiol, 3'alkyl ferrocène-$(dT)_{20}$-5'C_6-SH. L'affinité thiol-or permet la liaison covalente entre la surface et le brin d'ADN.

Après avoir rincé la surface modifiée avec une solution de perchlorate de sodium à 1 M, on réalise en premier lieu sa caractérisation électrochimique par voltammétrie cyclique.

2.1.2 Caractérisation électrochimique

2.1.2.1 Détermination du nombre de chaînes immobilisées à la surface

Le nombre de brins Fc-$(dT)_{20}$ immobilisés à la surface est déterminé électrochimiquement par le biais de la détection des têtes ferrocènes portés par les chaînes d'oligonucléotides. Chaque brin d'ADN portant une tête ferrocène unique, le nombre de marqueurs détectés est égal au nombre de brins immobilisés à la surface.

Cette évaluation du nombre de chaînes immobilisées à la surface se fait par voltammétrie cyclique au substrat fonctionnalisé dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M.

Pour cela, on réalise un balayage dans une gamme de potentiel autour du potentiel rédox E^0 supposé du groupement Fc, suivant le schéma représenté en Figure 19.

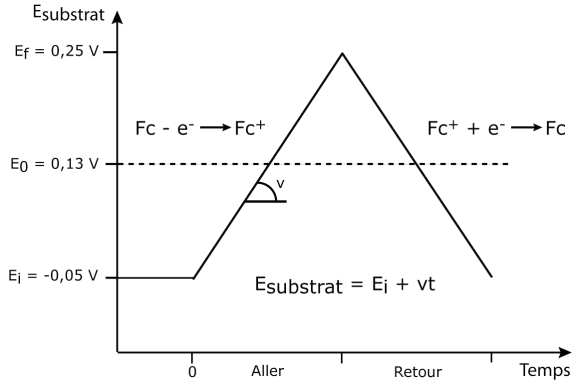


Figure 19 : Graphe représentant la rampe linéaire en potentiel appliquée au substrat pour effectuer un balayage en potentiel à une vitesse *v*. En abscisse figure le temps découpé en deux zones, aller et retour. En ordonnée est représenté la variation du potentiel de substrat $E_{substrat}$ de E_i, potentiel initial à E_f, potentiel final, en passant par E^0, le potentiel standard des têtes ferrocènes.

Durant le balayage aller (anodique), on applique une rampe linéaire en potentiel allant du potentiel initial, E_i (ici de –0,05 V/ECS) au potentiel final, E_f (ici de 0,25 V/ECS) à une vitesse de balayage *v* de 2 V/s. Les têtes Fc portées par les brins d'ADN, sont alors oxydées sous forme Fc^+ à la surface d'or.

Lors du balayage retour (cathodique), de E_f à E_i à la vitesse de balayage *v,* les têtes Fc^+ sont réduites pour redonner la forme Fc.

On a donc le mécanisme de transfert mono-électronique réversible suivant, avec la surface :

$$Fc \underset{}{\overset{E^0}{\rightleftharpoons}} Fc^+ + e^-$$

un voltammogramme typiquement enregistré lorsque la vitesse de balayage est suffisamment lente est présenté en Figure 20.

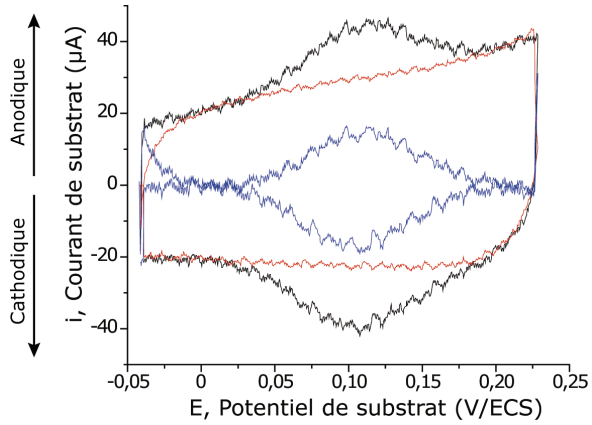


Figure 20 : Voltammogramme réalisé au substrat portant une monocouche de Fc-$(dT)_{20}$. En noir, le voltammogramme des têtes ferrocènes portées par les brins d'ADN greffées sur le substrat. En rouge, le background obtenu sur surface d'or nue. En bleu, le voltammogramme des têtes ferrocènes corrigé du background. Vitesse de balayage v = 2 V/s. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M tamponné à pH 7 par 25 mM de phosphate de sodium.

Le potentiel standard des têtes Fc est déterminé en effectuant la moyenne entre le potentiel de pic anodique et le potentiel de pic cathodique. Ce potentiel standard est de E^0 = 130 mV à ± 10 mV/ECS. Ce résultat est en accord avec le potentiel standard des têtes Fc portées par des brins $(dT)_{20}$ libre en solution.

L'écart de potentiel entre le pic anodique et le pic cathodique est inférieur à 10 mV, les courants de pics sont proportionnels à la vitesse de balayage et le courant retombe au niveau du courant de base (en rouge) lorsque le potentiel est très supérieur ou très inférieur au potentiel de pic. Le signal obtenu est donc typique d'une espèce rédox immobilisée sur surface et au comportement Nernstien.[4]

Les caractéristiques du voltammogramme nous assurent en particulier que toutes les têtes ferrocènes ont eu largement le temps de s'oxyder réversiblement à la surface d'or pendant la durée du voltammogramme.

Ainsi, le nombre de têtes ferrocènes, et donc celui des brins Fc-$(dT)_{20}$ immobilisés, peut être déterminé en intégrant le pic aller (ou retour) car la charge qui résulte de l'intégration du pic anodique (ou cathodique) est due à la mono-oxydation de chacune de ces têtes. Si l'on divise cette charge Q par la charge élémentaire, on obtient le nombre de têtes oxydées et donc le nombre total de chaînes $n_{chaînes}$ immobilisées sur la surface.

Ici, on obtient $Q = 7.10^{-7}$ C et $n_{chaînes} = 4{,}4.10^{12}$ chaînes.

2.1.2.2 Détermination de la concentration surfacique Γ en brins Fc-$(dT)_{20}$ immobilisés sur la surface d'or plane

Afin de déduire la concentration surfacique Γ (nombre de moles de brins ancrés par unité de surface), de la charge Q mesurée sur le voltammogramme, il faut déterminer l'aire effective A_{eff}, de la surface sur laquelle les chaînes sont immobilisées, puisque :

$$\Gamma = (Q/F) \times 1/A_{eff}$$

Le joint torique qui permet de délimiter la surface avec laquelle la solution contenant les brins d'ADN est en contact, est circulaire de diamètre égal à 1,1 cm. Ainsi, la surface géométrique délimitée par le joint a une aire $A_{géom}$ égale à 1 cm^2.

Cependant, l'analyse des surfaces d'or par AFM montre qu'elles comportent de nombreux plateaux nanométriques séparés par des failles de quelques dizaines de nanomètres de largeur. Les brins Fc-$(dT)_{20}$ étant des objets nanométriques, ils peuvent se loger dans les fissures ainsi que le long des flancs de ces failles. Aussi, la surface qu'il nous faut prendre en compte pour évaluer Γ est celle qui tient compte de ces discontinuités nanométriques.

Une technique pour déterminer cette aire effective a été reportée dans la littérature,[5] et consiste dans un premier temps à former une monocouche d'oxyde sur la surface d'or puis dans un second temps à réduire cette monocouche. L'intégration du pic de réduction permet d'accéder à la valeur de A_{eff} qui est d'environ 2,5 cm^2.

Ayant précédemment déterminé le nombre de chaînes immobilisées ainsi que la surface électrochimique que nous supposons être la surface réelle, nous pouvons calculer Γ.

Dans l'exemple que nous avons présenté ici et qui correspond à une surface fonctionnalisée par des brins Fc-$(dT)_{20}$, nous obtenons une valeur de concentration surfacique typique d'environ 2.10^{-12} mol/cm^2.

2.1.2.3 Distance moyenne entre les points d'ancrage de l'ADN

Connaissant la concentration surfacique en brins Fc-$(dT)_{20}$ immobilisés, l'on peut alors calculer la distance moyenne d_m entre les points d'ancrage de l'ADN sur la surface par l'équation suivante :

$$d_m \simeq 1/\sqrt{N_A \Gamma} \approx 8\ nm$$

avec N_A le nombre d'Avogadro.

La longueur totale du brin d'ADN $(dT)_{20}$ immobilisé sur la surface étant d'environ 10 nm,[6] on peut en conclure qu'il y a peu d'interactions latéra-

les entre les chaînes greffées dans le système étudié.[7a] La distance séparant deux brins voisins étant trop grande pour que les chaînes voisines puissent se gêner significativement les unes les autres.

2.2 Caractérisation du système simple brin par microscopie AFM-SECM

2.2.1 Courbes d'approche en force et en courant

Lorsqu'on approche une pointe AFM-SECM, portée à un potentiel suffisamment positif (E_{pointe} = 0,25 V/ECS) par rapport au potentiel standard des têtes Fc (E^0 = 0,13 V/ECS), de la surface greffée, elle-même portée à un potentiel suffisamment négatif ($E_{surface}$ = -0,10 V/ECS), on peut alors obtenir des courbes d'approche en force et en courant caractéristiques du système présentées en Figure 21 respectivement en a et en b (courbes rouges).

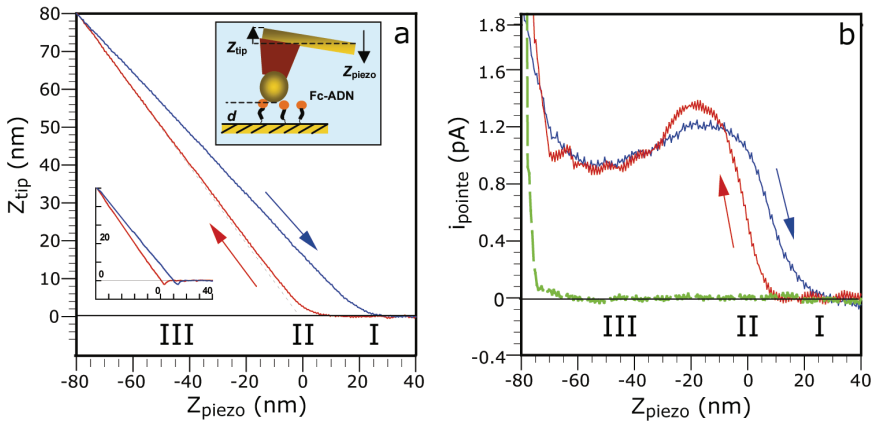


Figure 21 : Courbes d'approche AFM-SECM en force et en courant enregistrées simultanément, en mode contact, sur une surface d'or portant des brins de Fc-$(dT)_{20}$ ancrés. (a) Courbes d'approche (en rouge) et de rétraction (en bleu) enregistrées en déflection avec une pointe d'AFM-SECM. La déflection de la pointe Z_{tip}, soit la variation de hauteur du bras flexible détecté par un système laser, est décrite en fonction de Z_{piezo}, l'élongation du tube piézoélectrique supportant la pointe. L'insert en bas à gauche illustre une courbe d'approche en force typique sur surface d'or nue. L'insert en haut à droite, schématise la compression de la couche Fc-ADN par la pointe combinée AFM-SECM et montre graphiquement la définition de Z_{tip}, Z_{piezo} et la distance pointe-substrat d (b) Courbe d'approche (en rouge) et de rétraction (en bleu) en courant corrigé du courant de fuite. La courbe verte illustre le courant mesuré lors de l'approche d'une surface d'or nue. Ces courbes peuvent être délimitées en trois zones. En zone I, la pointe est trop loin de la surface pour interagir avec la couche de Fc-$(dT)_{20}$. En zone II, la pointe compresse la monocouche. En zone III, la pointe est en contact dur avec la surface. La pointe et la surface sont respectivement à des potentiels de +0,25 V et –0,1 V/ECS. L'électrolyte support est constitué de $NaClO_4$ 1 M tamponné à pH 7 par 25 mM de phosphate de sodium.

La déflection et le courant sont enregistrés simultanément et les courbes d'approche ainsi obtenues peuvent être délimitées en 3 zones distinctes.

En *zone I*, la pointe est suffisamment loin de la surface pour qu'aucune interaction ne puisse avoir lieu. Aucun courant de pointe significatif, ni aucune force d'interaction n'est détectée.

En *zone II*, la pointe commence à interagir avec la couche moléculaire présente sur la surface et la comprime, le bras flexible de la sonde AFM-SECM est alors défléchi vers le haut. Dans cette zone, la courbe d'approche en force présente un arrondi très distinct d'un « jump to contact » observé sur surface d'or nue (insert en bas à gauche de la Figure 21a). Sur les courbes d'approche en courant, on peut voir une augmentation du courant, jusqu'à un pic suivi d'un large plateau, au fur et à mesure de l'approche de la pointe sur la surface.

En *zone III*, en comprimant d'avantage la couche de chaîne d'ADN, on observe alors une brusque augmentation du courant qu'il est possible d'attribuer à un effet tunnel qui s'établit entre la surface et la pointe. Parallèlement, la déflection et le mouvement du piezo finissent par croître linéairement, indiquant que la pointe a atteint un contact dur avec la surface d'or.

Les courbes enregistrées lors de la rétraction (courbes bleues), sont similaires à celles enregistrées lors de l'approche (courbes rouges), mais présentent un décalage dû à l'hystérésis du piezo.

L'enregistrement des courbes d'approche est réalisé en fonction de Z_{piezo}, la valeur de l'élongation du tube piézoélectrique. On peut rendre les données plus explicites en effectuant la conversion de Z_{piezo} en d, la distance séparant la pointe de la surface (insert Figure 21a).

Pour cela, il faut tout d'abord déterminer la valeur de Z_0 qui correspond à l'élongation du piezo pour laquelle la sonde entrerait en contact dur avec la surface si aucune interaction n'existait avec la surface. La distance d est ensuite calculée en effectuant la différence entre Z_{piezo}, Z_0 et Z_{tip}, la variation de hauteur de la pointe en nanomètre, suivant la formule suivante :

$$d = Z_{piezo} - Z_o - Z_{tip}$$

On peut également retracer les courbes d'approche en déflection sous la forme de courbe d'approche en force en exprimant F, la force mesurée par la pointe qui est reliée à la variation de déflection Z_{tip} par l'équation suivante :

$$F = k_{probe} \times Z_{tip}$$

avec k_{probe}, la constante de raideur de la pointe, dont une valeur typique est de 1,5 N/m.

On retrace finalement les courbes d'approche en force et en courant en fonction de la distance d (Figure 22).

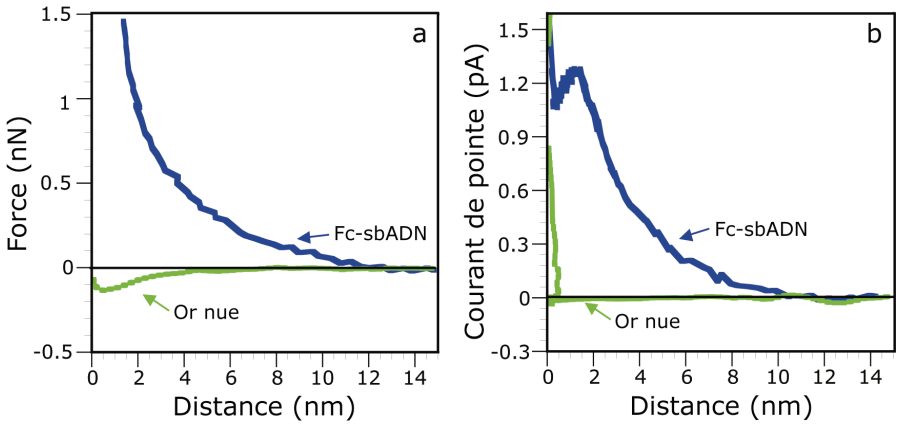


Figure 22 : Courbes d'approche en force et en courant d'AFM-SECM. La déflection de la pointe (a) et le courant de pointe (b) sont enregistrés simultanément et exprimés en fonction de la distance *d* séparant la pointe d'une surface d'or nue (en vert) ou portant des brins Fc-$(dT)_{20}$ (en bleu). Concentration surfacique en Fc-$(dT)_{20}$: $2{,}5.10^{-12}$ mol/cm². Electrolyte support : $NaClO_4$ à 1 M + 25 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7. Potentiel appliqué à la pointe, 0,25 V/ECS et à la surface, -0,1 V/ECS. Vitesse d'approche : 10 nm/s. Marge d'erreur sur *d* : ≈ ± 1 nm.

On peut observer sur ces courbes, par comparaison avec une surface d'or nue, que nous avons une nette augmentation en force et en courant bien avant le contact dur avec la surface (c'est à dire pour $d >> 0$).

Dès une distance d'environ 12 nm, une force est mesurée, la pointe interagit déjà avec le substrat. On note également que le courant augmente à partir d'une distance d'environ 10 nm.

On remarque sur la courbe d'approche en force, qu'aucun « jump to contact » n'est présent, contrairement à une surface d'or nue dont la courbe d'approche en force (Figure 22, courbe verte) met en évidence la détection d'une force ($F < 0$) attirant la pointe vers la surface. En effet, dans ce système, le tapis de chaînes Fc-ADN joue le rôle d'amortisseur, repoussant la pointe de manière élastique et masquant toute interaction or-or entre la pointe et la surface. Pour les mêmes raisons aucun pic d'adhésion n'est visible sur la courbe de rétraction en force non présentée ici.

2.2.2 Evaluation du nombre de chaînes sondées par la pointe AFM-SECM

La détermination de la concentration surfacique (2.10^{-12} mol/cm²) vue plus haut, permet l'évaluation de la quantité maximale de chaînes sondées par la pointe, n_c. Ce nombre de chaînes maximum est atteint lorsque *d* est nulle, c'est à dire, lorsque la sonde et la surface sont en contact (Figure 23).

Pour calculer n_c, il suffit d'utiliser une formule qui prend en considération la géométrie de la bille à l'extrémité de la pointe, la concentration surfacique mais également la longueur des chaînes *L*, dans un périmètre *p* pour lequel il existe encore un contact entre les deux.

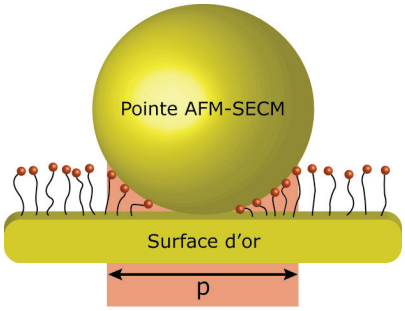


Figure 23 : Schéma représentant le périmètre *p* pour lequel il existe un contact entre les chaînes et la pointe, quand la pointe touche la surface.

Ainsi, en prenant pour nos expériences, un rayon de pointe R_{pointe} = 500 nm, une concentration surfacique $\Gamma = 2.10^{-12}$ mol/cm² et une longueur maximum L = 10 nm, on obtient avec la formule suivante :

$$n_c \approx \pi \Gamma N R_{pointe} L$$

qu'environ 200 chaînes d'ADN marquées peuvent être sondées lors de l'approche de la sonde sur le substrat.

On note que les courbes en force et en courant enregistrées à des positions aléatoires sur le substrat présentent une faible dispersion en magnitude d'environ 20 %.

Cette dernière conclusion permet d'affirmer que nos chaînes d'ADN greffées sont réparties de façon homogène sur la surface.

2.2.3 Conformation des chaînes d'ADN immobilisées sur surface

La conformation des chaînes d'ADN immobilisées sur la surface d'or peut être révélée par l'analyse des courbes d'approche enregistrées en AFM-SECM. Aussi est-il nécessaire de rappeler que, comme toute chaîne de polymère linéaire flexible, un brin d'ADN peut être modélisé par une suite de petits segments rigides de longueur l_p, la longueur de persistance, qui caractérise la flexibilité intrinsèque des chaînes. Plus l_p est petit et plus la chaîne sera flexible (Figure 24).

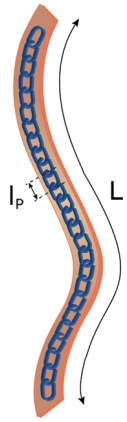


Figure 24 : Schéma représentant la longueur de persistance l_p et la longueur de contour L d'une chaîne linéaire flexible. La longueur de contour L correspond à la longueur de la chaîne lorsque celle-ci est complètement étirée, et peut-être modélisée en une suite de petits segments rigides de longueur l_p, comparable par exemple aux maillons formant une chaîne.

Ainsi la conformation du $(dT)_{20}$ ancré est régie par le rapport entre sa longueur complètement étirée L (ou longueur de contour), et l_p, sa longueur de persistance.[8]

Pour $L << l_p$, la chaîne se comporte plutôt comme un cylindre rigide, et l'épaisseur de la monocouche d'ADN tend alors vers L (Figure 25a). A l'opposé, pour $L >> l_p$, la chaîne suit un mouvement aléatoire et adopte une conformation « champignon » (Figure 25b). La conséquence de cette conformation est une épaisseur de couche qui est alors beaucoup plus petite que L.

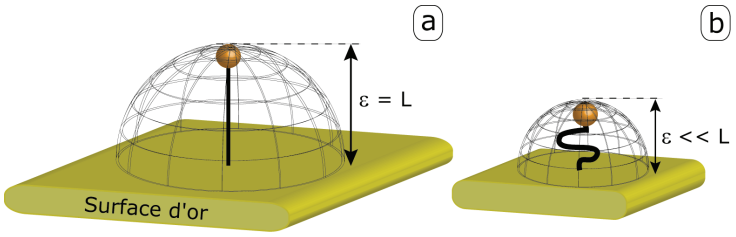


Figure 25 : Schéma des différentes conformations possibles d'une chaîne ancrée sur surface de longueur ε, l'écart séparant les extrémités de la chaîne. (a) Cas d'une chaîne dont la longueur de persistance est très supérieure à la longueur de contour, se comportant alors comme un cylindre rigide. (b) Cas d'une chaîne dont la longueur de persistance est très inférieure à la longueur de contour, suivant alors un mouvement aléatoire et adoptant une conformation « champignon ».

L'examen des courbes d'approche en force et en courant reporté sur la Figure 22, révèle que la pointe commence à compresser les couches d'oligonucléotides pour une distance seuil, d^F_{seuil}, d'environ 12 nm et, un courant est mesuré à une distance seuil d^i_{seuil} d'environ 10 nm. Ces valeurs sont proches de la longueur de contour correspondant du brin $(dT)_{20}$, qui est d'environ 10 nm, auquel on peut ajouter 1 nm pour la longueur du lien C6.

De ces résultats, deux conclusions peuvent en être tirées.

- Tout d'abord, le brin $(dT)_{20}$ ancré ne se trouve pas adsorbé à plat sur la surface, comme cela est souvent le cas pour les simples brins d'ADN de séquence différentes, ancrés, sur surface d'or nue.[9]
- Ensuite, d^{F}_{seuil} et d^{i}_{seuil} sont voisins de L, on peut donc dire que la conformation privilégiée adoptée par les chaînes d'ADN est plus proche d'un *cylindre rigide* que d'une conformation « champignon ». Ceci indique que la longueur de persistance (l_p) du $(dT)_{20}$ n'est pas ridiculement petite par rapport à la longueur du brin, d'environ 10 nm. Cette dernière observation est en accord avec une valeur d'environ 3 nm estimée pour une longueur de persistance d'un homopolymère dT.

2.2.4 Les différentes forces d'interactions mises en jeu lors de la compression des chaînes de Fc-ADN

Différentes forces d'interactions peuvent contribuer à générer la force répulsive globale que nous mesurons lors de la compression par la sonde combinée AFM-SECM, de la monocouche de brin d'ADN ancrée. Ces forces sont de différentes natures, voyons celles que l'on peut à priori envisager ou éventuellement exclure.

2.2.4.1 Force électrostatique

L'utilisation d'un électrolyte support à forte concentration, ici le perchlorate de sodium à 1 M, nous permet d'écranter les forces électrostatiques. Pour une concentration aussi élevée, la longueur de debye est de l'ordre de 0,3 nm.[10] Au-delà de cette distance les interactions électrostatiques sont négligeables.

Or, la détection en force de nos chaînes est observée pour des distances bien supérieures à 0,3 nm, il est donc légitime d'ignorer ici ces interactions.

De même, le phénomène électrostatique d'orientation des chaînes ADN ancrées sur surface induit par le potentiel appliqué à l'électrode, décrit dans la littérature pour des faibles forces ioniques,[11] est nécessairement négligeable ici.

2.2.4.2 Force stérique

Il s'agit de la force typiquement mesurée[12,13] quand on approche une pointe d'un substrat recouvert de chaînes polymères libres de fluctuer. L'approche de la pointe réduit l'amplitude du mouvement thermique des chaînes ancrées, ainsi confinées dans l'espace pointe-substrat. Cette diminution de

l'entropie des chaînes donne naissance à une force stérique répulsive qui s'oppose alors à l'avancée de la pointe. Dans le cas d'un cylindre en libre rotation autour de son point d'ancrage, l'ordre de grandeur de cette force stérique est donnée par la formule suivante :

$$F = 2\pi R_{\text{pointe}} \Gamma RT$$

Or si on prend un rayon de pointe (R_{pointe}) de 500 nm et une concentration surfacique de 2.10^{-12}mol/cm², on obtient alors une force (F) d'environ 0,15 nN, ce qui est comparable à la magnitude de la force mesurée sur nos courbes d'approche. Il est donc quantitativement plausible que la force entropique contribue à la force que nous mesurons ici (Figure 21).

2.2.4.3 Force d'hydration

La comparaison des courbes d'approche en force et en courant enregistrées simultanément (Figure 22), démontre un autre aspect intéressant des interactions entre la monocouche d'ADN et la pointe AFM-SECM. En effet, on peut observer que la distance pointe-substrat à laquelle on détecte une force répulsive est supérieure de 1 à 2 nm à la distance de contact physique entre la sonde AFM-SECM et les chaînes d'ADN, définie par la longueur de contour du brin qui est d'environ 10 nm. C'est l'absence d'un courant électrochimique de pointe pour $d > 10$ nm qui confirme qu'avant cette distance, le cylindre d'ADN n'est pas réellement en contact avec la pointe. Une force à distance semble donc contribuer aux forces totales que nous mesurons. On peut supposer que cette force est la force d'hydration.

Cette force est typiquement observée lorsque deux surfaces portant des macromolécules chargées,[14] par exemple, des protéines,[15] des membranes[16] et des brins d'ADN,[17] sont approchées l'une de l'autre, à une distance inférieure à 2 nm.

Cette capacité de distinguer les forces en contact, des forces à distances, sur la base de mesure de courant, est spécifique des mesures en AFM-SECM.

2.2.4.4 Force hydrodynamique

Une dernière force qui pourrait être observée dans ce genre de modèle de surface greffée par de l'ADN est une force de nature hydrodynamique. Cette force résulte de la vitesse finie à laquelle la solution confinée entre la pointe et le substrat peut s'écouler à l'approche de la pointe.

Cette force fait intervenir la notion de viscosité locale au voisinage de la surface et est proportionnelle au rayon de la pointe élevé au carré.[18] La force

hydrodynamique est donc d'autant plus intense que la taille de la pointe utilisée est grande. Compte tenu de la taille des pointes AFM-SECM employée (d'un diamètre d'environ 500 nm), il est par conséquent justifié d'en suspecter la présence.

Cette force hydrodynamique dépend également de la vitesse à laquelle la pointe approche du substrat. Or nous avons observé que dans les gammes de vitesse d'approche que nous employons, de l'ordre de 5 à 10 nm/s, nos courbes de force ne dépendent pas de cette vitesse. On peut donc exclure une participation significative des forces hydrodynamiques.

Nous venons de discuter de l'origine des forces mesurées, mais se pose maintenant l'origine du courant enregistrée durant l'approche de la couche de Fc-ADN.

2.2.5 L'origine du courant de pointe mesuré

Dès lors qu'on approche notre pointe AFM-SECM d'une monocouche de chaînes portant des têtes ferrocènes, si l'on fixe le potentiel de la pointe et du substrat de part et d'autre du potentiel standard de l'espèce rédox considérée un transfert d'électron a lieu entre les deux électrodes et un courant est alors mesuré, c'est ce qu'on observe sur la Figure 22b.

Afin de comprendre le mécanisme générant le courant mesuré à la pointe, on utilise les capacités de l'AFM-SECM, pour positionner l'extrémité de la pointe combinée AFM-SECM à une distance fixe nanométrique du substrat dans la couche d'ADN.

On peut alors caractériser la dépendance en potentiel du courant mesuré à la pointe en balayant le potentiel de la pointe.

Toutefois, balayer le potentiel de la pointe génère un courant de pointe de nature capacitif, correspondant à la charge de la double couche de la microélectrode sonde. Ce courant peut masquer le courant de sonde spécifique de la couche d'ADN que l'on souhaite mesurer.

C'est pourquoi, on préfère la configuration équivalente qui consiste à garder constant le potentiel de pointe et à balayer le potentiel du substrat.

Pour ce faire, la pointe est placée à un potentiel fixe de –0,10 V/ECS et le balayage du potentiel du substrat est réalisé de 0 à 0,25 V/ECS. Le courant mesuré à la pointe est ensuite porté en fonction du potentiel appliqué au substrat comme l'on peut le voir en Figure 26.

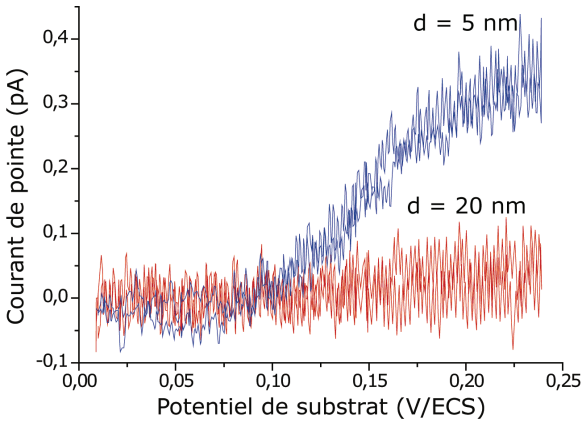


Figure 26 : Voltammétrie cyclique dans une couche de Fc-$(dT)_{20}$ ancrée sur surface d'or. Pour l'enregistrement de ces voltammogrammes, la pointe AFM-SECM est positionnée à différentes distances *d* du substrat portant une monocouche de Fc-$(dT)_{20}$. Le potentiel de la surface est balayé à 20 mV/s. Le potentiel de pointe est maintenu à -0,10 V/ECS. Electrolyte support : $NaClO_4$ à 1 M + 25 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7.

On constate que si on se place à une distance supérieure à la longueur des chaînes (c'est à dire supérieure à 10 nm), on n'observe aucun courant, comme on peut le voir sur la Figure 26 pour une distance de 20 nm.

Mais, si on positionne l'extrémité de la pointe à une distance inférieure ou égale à la longueur des chaînes, c'est à dire 5 nm ici, on observe la génération d'un courant. On peut donc en conclure que la génération du courant mesuré nécessite le contact physique entre la sonde et les brins d'ADN.

De plus, la variation i_{pointe} versus $E_{substrat}$ obtenu est de forme sigmoïde, caractéristique d'une réaction électrochimique sur UME, indiquant que le courant mesuré est *faradique*.

Enfin, ce voltammogramme est centré à un potentiel d'environ 150mV/ECS, caractéristique des têtes Fc, ce qui permet d'attribuer ce processus faradique à l'électrochimie des têtes Fc portée par les brins d'ADN.

En d'autres termes, la sonde contacte électrochimiquement les têtes Fc qui réalisent alors un mouvement de va et vient entre la pointe et la surface où elles sont respectivement réduites et oxydées. Il s'agit donc d'un processus de « positive feedback », habituellement observé pour des espèces en solution.[19] La Figure 27 illustre le processus de « positive feedback » des têtes Fc portées par les chaînes d'ADN ancrées.

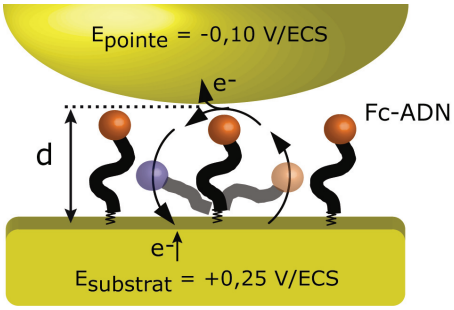


Figure 27 : Représentation du mouvement de va et vient d'une tête ferrocène portée par le brin d'ADN ancré et du transfert électronique entre la pointe et la surface en résultant. Ce mouvement représente le processus de « positive feedback » habituellement observé pour des espèces en solution. On précise que par souci de clarté, la pointe n'est pas mise à l'échelle par rapport au brin Fc-ADN.

Les potentiels du substrat et de la pointe sont choisis suffisamment éloignés du potentiel standard des têtes Fc pour que les étapes de transfert électronique au substrat et à la pointe soit infiniment rapide.

Dans ces conditions, le courant mesuré en AFM-SECM reflète donc uniquement la vitesse de mouvement des brins d'ADN, c'est à dire leur dynamique.

Incidemment l'observation expérimentale d'un pic sur la courbe d'approche en courant présentée en Figure 22b pour $d \sim 1{,}5$ nm, peut donc être interprétée comme traduisant un ralentissement de la dynamique du mouvement des brins dues à leur confinement extrême dans l'espace sonde-substrat.

Schématiquement, deux principaux mouvements des brins d'ADN ancrés permettant d'amener les têtes Fc du substrat à la pointe, peuvent être envisagés ici, comme on peut le voir sur la Figure 28.

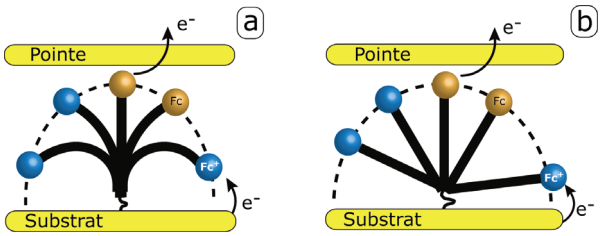


Figure 28 : Schéma représentatif du type de mouvement possible du cylindre d'ADN ancré à la surface, permettant le transport des têtes ferrocènes entre la pointe et la surface. (a) Mouvement de flexion du cylindre. (b) Mouvement de rotation du cylindre autour de son point d'ancrage flexible (connecteur C6).

Soit le brin d'ADN a une élasticité suffisante pour se tordre et effectuer le mouvement de flexion nécessaire au « positive feedback » (Figure 28a),

soit le brin d'ADN est rigide et ce mouvement est uniquement possible par la rotation du brin autour du connecteur en C6 (Figure 28b).

L'hybridation d'une surface de brins Fc-$(dT)_{20}$ greffée rend plus rigide les brins d'ADN qui passe d'une longueur de persistance de 3 nm pour le simple brin d'ADN, $(dT)_{20}$ à une longueur de persistance typique de 50 nm[20] pour la forme hybridée $(dA\text{-}dT)_{20}$. La comparaison des résultats obtenus en AFM-SECM pour une surface greffée avec des simples brins et pour une surface greffée avec des doubles brins, est donc un excellent moyen de différencier les deux types de mouvement dynamique de chaînes ADN ancrées illustrés en Figure 28.

3 Etude du système à ADN rédox double brin, Fc-dbADN

Dans la suite, les brins d'ADN rédox obtenus après hybridation de la couche de Fc-sbADN seront désignés par la notation Fc-dbADN (ou Fc-$(dT\text{-}dA)_{20}$).

3.1 Hybridation de la couche de Fc-sbADN

L'hybridation de la surface portant le Fc-$(dT)_{20}$ est réalisée en mettant en contact la surface avec une solution de brin complémentaire de séquence $(dA)_{20}$ en solution à 10 µM durant 1,5 heures.

La surface de Fc-dbADN est tout d'abord caractérisée électrochimiquement par voltammétrie cyclique, en réalisant un balayage du potentiel au substrat de –0,05 V à 0,30 V/ECS à une vitesse de 2 V/s dans une solution électrolytique de $NaClO_4$ à 1 M (Figure 29).

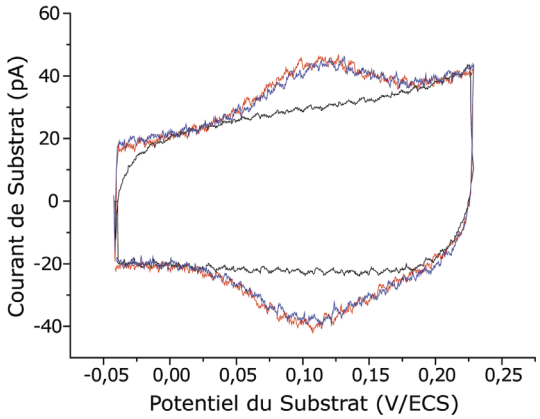


Figure 29 : Voltammétrie cyclique à une surface d'or portant une monocouche de brins d'ADN redox, Fc-$(dT)_{20}$ avant (en bleu) et après (en rouge) hybridation par le brin complémentaire de séquence $(dA)_{20}$. Le « background » (en noire) est enregistré après décapage électrochimique de la couche de Fc-ADN. Concentration surfacique en Fc-ADN : $2{,}5.10^{-12}$ mol/cm². Vitesse de balayage : ν = 2 V/s. Electrolyte support : $NaClO_4$ à 1 M + 25 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7.

L'examen de la Figure 29 permet de constater que les voltammogrammes enregistrés avant et après hybridation se superposent parfaitement.

Un potentiel standard de 130 mV/ECS correspondant au potentiel standard des têtes Fc, est déterminé en moyennant le potentiel de pic anodique et cathodique du voltammogramme correspondant aux chaînes Fc-dbADN.

Après intégration du signal électrochimique des brins d'ADN hybridés (courbe rouge) suivant la méthode décrite au paragraphe 2.1.2.2, on obtient un taux de couverture Γ de l'ordre de 2.10^{-12} mol/cm².

De ces résultats, deux conclusions peuvent alors en être tirées.

Premièrement, la concentration surfacique étant identique à celle obtenu avant hybridation, l'on peut en déduire que le nombre de têtes Fc et par conséquent de chaînes Fc-ADN ancrées à la surface est quasiment identique. L'hybridation ne « décroche » donc pas les brins d'ADN de la surface.

Deuxièmement, un courant faradique étant toujours mesurable, l'on peut en conclure que l'hybridation n'empêche pas le transfert électronique entre les têtes Fc et la surface d'or.

L'efficacité de l'hybridation de nos chaînes d'ADN, pourrait être estimée en balayant en potentiel la surface recouverte d'une couche de Fc-ADN à une vitesse de balayage élevée, supérieure à 1000 V/s par seconde. A haute vitesse de balayage, la contribution du simple brin et du double brin de Fc-ADN à la réponse voltammétrique n'est en effet pas identique. C'est par ce biais qu'il est possible d'établir une estimation respective de la couverture de surface en chaînes Fc-sbADN et Fc-dbADN, c'est à dire qu'il est ainsi possible d'évaluer le rendement d'hybridation d'une couche $(dT)_{20}$.

Toutefois, le courant de pic en voltammétrie cyclique étant proportionnel à la surface de l'électrode et à la vitesse de balayage, ce type de mesure ne peut être entrepris sur nos surfaces d'or macroscopique car les signaux seraient fortement déformés par la chute ohmique et une constante de temps de la cellule trop élevée. L'évaluation de l'efficacité de l'hybridation de nos chaînes ADN est par conséquent réalisée sur microélectrode d'or. Cette étude montre que la quasi-totalité des chaînes ADN ancrées sur la surface sont hybridées.

3.2 Caractérisation du système double brin par microscopie AFM-SECM : Changements structuraux et dynamiques de la couche d'ADN consécutifs à l'hybridation

3.2.1 Etude des courbes d'approche en force

Afin d'obtenir des données reproductibles entre le Fc-sbADN et le Fc-dbADN, la caractérisation en AFM-SECM des chaînes à ADN est réalisée avec la même sonde combinée AFM-SECM.

L'enregistrement des courbes d'approche en force sur surface hybridée et non hybridée est converti en fonction de la force F et de la distance d, suivant une méthode décrite précédemment et présentée en Figure 30.

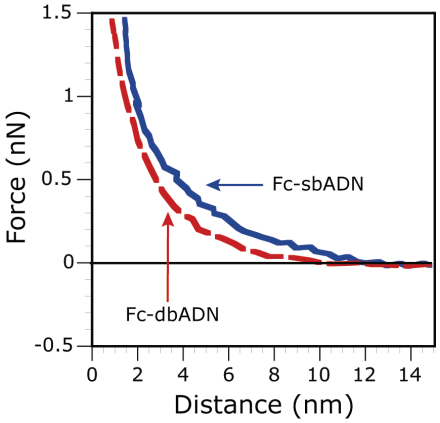


Figure 30 : Courbes d'approche en force enregistrées en AFM-SECM. La déflection de la pointe est enregistrée en fonction de la distance d séparant la pointe d'une surface portant des brins Fc-$(dT)_{20}$ avant hybridation (en bleu) ou après hybridation par le brin complémentaire $(dA)_{20}$ (en rouge). Concentration surfacique en Fc-$(dT)_{20}$: $2{,}5.10^{-12}$ mol/cm². Dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M + 25 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7. Marge d'erreur sur d : ± 1 nm.

Comme on peut le voir sur la Figure 30, les courbes d'approche en forces enregistrées avant et après hybridation sont très similaires. La seule différence notable entre les deux courbes d'approche est une détection en force qui débute à 10 nm pour la couche de Fc-dbADN, alors que la couche de Fc-sbADN est détectée dès d = 12 nm. On constate donc une diminution d'épaisseur de la monocouche de Fc-dbADN d'environ 2 nm par rapport à la forme non hybridée Fc-sbADN. Cette diminution du point de contact dans le cas des chaînes dbADN est compatible avec la réduction connue de longueur de chaîne à simple brin lors de l'hybridation en double brin : pour une chaîne $(dT)_{20}$, la longueur de contour du simple brin (L_{sb}) est de 10 nm contre une longueur de 7 nm pour le double brin (L_{db}).

Cependant le fait remarquable est la grande similarité des courbes obtenues avant et après hybridation. Cette observation indique que la nature de la force exigée pour comprimer les couches de sbADN et de dbADN est non seu-

lement identique, mais surtout indépendante de l'élasticité intrinsèque du brin d'ADN.

Si, comme évoqué plus haut, on considère que la force dominante est de nature stérique, l'interprétation à donner à ce résultat est que le sbADN et le dbADN sont animés d'un mouvement similaire. Compte tenu du fait que la distance à partir de laquelle les chaînes sont détectées est proche de la longueur de contour respective de ces brins, nous sommes conduits à conclure que ce mouvement est constitué par la rotation libre des brins autour de leur point d'ancrage en C6. On est ici dans le cas d'un cylindre relativement rigide qui subit un faible recourbement élastique (voir la Figure 25a). Ce résultat était attendu pour l'ADN hybridé pour lequel la longueur de persistance l_p vaut environ *50 nm* et donc ici $l_p >> L$, mais semble donc également valable pour le simple brin $(dT)_{20}$.

Si l'analyse des courbes d'approche en courant nous indique une similarité apparente du mouvement des brins avant et après hybridation, elle ne nous dit rien quant à la dynamique respective du mouvement des chaînes d'ADN simple et double brin. Cette information peut cependant être obtenue par l'analyse des courbes d'approche en courant.

3.2.2 Etude des courbes d'approche en courant

Contrairement aux courbes d'approche en force, l'intensité des courbes d'approche en courant change de manière drastique après l'hybridation de la couche d'ADN (Figure 31).

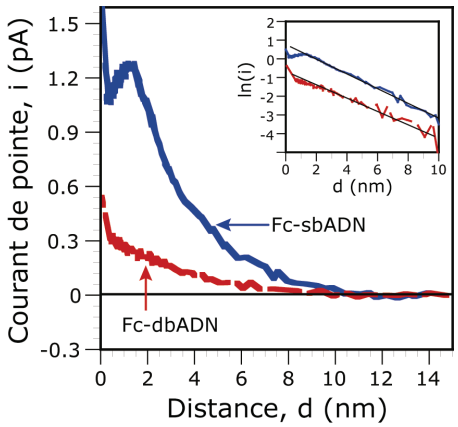


Figure 31 : Courbes d'approche en courant enregistrées en AFM-SECM. Le courant de pointe est enregistré en fonction de la distance *d* séparant la pointe d'une surface d'or portant des brins Fc-$(dT)_{20}$ avant hybridation (en bleu) ou après hybridation par le brin complémentaire $(dA)_{20}$ (en rouge). Insert en haut à droite : Courbe retracée en logarithme du courant de pointe mesuré en fonction de *d* pour le Fc-$(dT)_{20}$ (courbe supérieure en bleu) et le Fc-$(dA\text{-}dT)_{20}$ (courbe inférieure en rouge). Concentration surfacique en Fc-$(dT)_{20}$: $2{,}5.10^{-12}$ mol/cm². Electrolyte support : $NaClO_4$ à 1 M + 25 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7. Potentiel appliqué à la pointe, 0,25 V/ECS et à la surface, -0,1 V/ECS. Marge d'erreur sur *d* : ≈ ± 1 nm.

L'intensité du courant mesuré à l'approche de la monocouche de Fc-ADN a diminué considérablement avec l'hybridation. Pour une sonde AFM-SECM identique dans les deux expériences, l'on note une diminution des intensités sur la courbe d'approche en courant qui à d = 2 nm passe d'environ 1 pA à un peu moins de 0,25 pA entre les formes respectivement non hybridées et hybridées. On note également que la courbe d'approche enregistrée après hybridation ne présente pas le pic visible avant hybridation pour une distance d d'environ 1,5 nm. Vu la faible intensité du courant faradique mesuré pour la couche hybridée on peut supposer que l'occurrence de ce pic est en partie masquée par l'accroissement abrupt du courant tunnel observé dès $d \sim 1$ nm. Il est également possible que cette absence de pic traduise une différence de comportement dynamique entre le simple et le double brin d'ADN.

Cependant, comme on peut le voir sur la courbe en courant exprimée en « log » présentée en insert en Figure 31, la courbure de la courbe d'approche en courant du Fc-dbADN est, jusqu'à $d \sim 2$ nm, identique à celle du Fc-sbADN. Ce résultat tend à démontrer que les têtes ferrocènes portées par les chaînes d'ADN simple et double-brins sont animées d'un mouvement diffusif similaire.[21]

Plus quantitativement, nous avons observé de façon reproductible que, suite à l'hybridation, l'intensité des courbes d'approche en courant pour Fc-$(dT)_{20}$ était divisée d'un facteur d'atténuation f d'environ 4 ± 1, c'est à dire que $i_{dbADN} = i_{sbADN} / 4$ pour toute distance séparant la sonde du substrat.

Ce résultat indique que le mouvement des têtes Fc entre la sonde et le substrat est environ 4 fois plus lent dans le cas de la forme hybridé Fc-$(dT\text{-}dA)_{20}$ que dans celui du simple brin Fc-$(dT)_{20}$.

Ce facteur d'atténuation est étonnamment faible si on considère la grande différence de flexibilité entre le simple brin et le double brin d'ADN. La chaîne double brin est, en effet, plusieurs dizaines de fois plus rigide que la chaîne simple brin et, si la flexibilité du brin contrôlait la dynamique de la tête Fc,[22] on s'attendrait à un facteur $f >> 1$. Il semble donc peu probable que le mouvement de va et vient de la tête Fc entre la sonde et le substrat, soit contrôlé *exclusivement* par l'élasticité des chaînes d'ADN (Figure 28a).

D'un autre coté, si le mouvement sonde-substrat de la tête Fc impliquait exclusivement la diffusion rotationnelle de la chaîne d'ADN autour de son ancrage en C6 (Figure 28b) , le facteur d'atténuation devrait correspondre au rapport des coefficients de diffusion rotationnelle de $(dT)_{20}$ et de $(dA\text{-}dT)_{20}$. On peut calculer ce rapport à partir des données de la littérature,[23] il vaut $f \sim 1$, et est donc plus faible que la valeur que nous mesurons. Il semble donc que la rotation du brin autour du point d'ancrage ne soit pas non plus *seule* à l'œuvre.

La valeur de $f \sim 4$ mesurée pour le facteur d'atténuation, qui n'est ni voisine de l'unité ni très grande par rapport à celle ci, semble donc indiquer que la dynamique du mouvement des têtes Fc est contrôlée *conjointement* par la diffusion rotationnelle du brin *et* par sa déformation élastique. Toutefois la relativement faible valeur obtenue pour le facteur d'atténuation indique que le mouvement de charnière de la chaîne d'ADN autour de son connecteur en C6, constitue la *composante majeure* de la dynamique du mouvement des têtes Fc, c'est à dire du mouvement thermique du $(dT)_{20}$ et du $(dA\text{-}dT)_{20}$ ancré. La contribution élastique de la chaîne d'ADN à la dynamique du mouvement des têtes Fc est donc *mineure* mais néanmoins suffisante pour se traduire par une dynamique plus lente pour l'ADN hybridé.

On note également que l'intensité des courbes d'approche en courant enregistrées avant hybridation de la monocouche de Fc-$(dT)_{20}$ est totalement retrouvée après déshybridation des chaînes Fc-$(dA\text{-}dT)_{20}$ par immersion de la surface dans une solution de force ionique plus faible (pour une concentration de $NaClO_4$ à 10 mM). Ce résultat prouve que l'intensité des courbes d'approche en courant est *spécifiquement et réversiblement modulée* par l'hybridation / déshybridation des chaînes Fc-ADN ancrées à la surface.

La diminution de l'intensité des courbes en courant consécutive à l'hybridation que nous avons observé, démontre que l'AFM-SECM permet la détection sensible de l'hybridation de chaînes d'oligonucléotides nanométriques ancrées à l'échelle d'un nombre très restreint de molécules, qui est estimé au paragraphe suivant.

4 Conclusions

Nous avons démontré que l'usage de la microscopie combinée AFM-SECM permettait d'obtenir *simultanément* des informations concernant la conformation et la dynamique des brins d'ADN nanométriques ancrés en monocouche moléculaire sur des surfaces d'électrodes.

Les résultats présentés mènent à la conclusion que le mouvement de charnière autour du point d'ancrage, domine la dynamique du mouvement des chaînes nanométriques d'ADN greffées sur la surface via un lien C6. Ce résultat aurait pu être prévu pour le double brin $(dT\text{-}dA)_{20}$ qui est une chaîne relativement rigide, mais nous avons vu également que cela pouvait aussi s'appliquer au simple brin non hybridé $(dT)_{20}$. En conséquence, pour des systèmes à ADN ancrés via des liens C6, on ne peut pas accéder à la dynamique réelle de recourbement élastique des chaînes d'ADN, puisqu'elle est masquée par la flexibilité du lien. Un tel résultat souligne le rôle décisif de la flexibilité (et de la

longueur) du lien permettant l'ancrage à la surface, dans le comportement dynamique des oligonucléotides à extrémité greffée ADN. Cette observation peut être d'un grand intérêt dans la conception de capteurs électrochimiques d'ADN qui exploitent justement les différences de comportement physique de la forme sbADN et de la forme dbADN attachées sur des surfaces d'électrode pour détecter l'hybridation.

Nous avons aussi démontré que l'hybridation de chaînes d'ADN de taille nanométrique greffées sur une surface pouvait être détectée en AFM-SECM pour environ 200 molécules. A l'opposé, la mesure de la force d'interaction entre l'ADN et la pointe, est quant à elle, peu sensible à l'hybridation.

Cette étude se poursuit au laboratoire notamment dans le but de modéliser et de quantifier précisément la dynamique des chaînes d'ADN simple et double brins ancrés. Ces travaux devraient notamment permettre de mieux comprendre l'effet du greffage et du confinement sur la dynamique de brins d'ADN nanométriques. Cette thématique constitue à ce titre une approche originale de la nano-hydrodynamique.

Après la phase d'apprentissage qu'a constitué pour moi l'étude présentée dans cette partie, j'ai été en mesure de me réinvestir pleinement dans mon projet de thèse, en cherchant tout d'abord à mettre au point une technique pour fonctionnaliser les sondes AFM-SECM par des chaînes Fc-PEG. Toutefois il m'a fallu avant cela assimiler les résultats précédemment obtenus par l'équipe concernant la dynamique de chaînes Fc-PEG ancrées non pas sur la sonde mais sur la surface du substrat. Il me faut donc à ce stade du manuscrit rappeler ces résultats au lecteur.

Bibliographie

1 - (a) Tarlov, M. J.; Steel, A. B. *In Biomolecular Films* Rustling, J. F. **2003** Ed.; Marcel Dekker Inc. : New-York; *Vol. 111*. (b) Heller, M. J. *Annu. Rev. Biomed. Eng*. **2002**, *4*, 129-153. (c) Thorp, H. *H. Trends Biotechnol*. **2003**, *21*, 522-524. (d) Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1192-1199. (e) Gooding, J. J.; King, G. C. *J.* Mater. Chem. **2005**, *15*, 4876-4880.

2 - Abbou, J.; Anne, A.; Demaille, C. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 22664-22675.

3 - (a) Anne; A.; Bouchardon, A.; Moiroux, *J. J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 1112-1113. (b) Anne, A.; Demaille, C. *J. Am. Chem. Soc***. 2006**, *128*, 542-557.

4 - Laviron, E. *In Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., Ed. ; Marcel Dekker: New-York, **1982**; *Vol. 12*, pp 53-157.

5 - (a) Michri, A. A.; Pshenichnikov, A. G.; Burshtein, R. Kh. *Elecktrokhimya* **1972**, *8*, 364-366. (b) Rand, D. A. J. ; Woods, R. *J. Electroanal. Chem*. **1972**, *35*, 209-218.

6 - Mills, J. B.; Vacano, E.; Hagerman, P. J. *J. Mol. Biol*., **1999**, *285*, 245-257.

7 - (a) Rant, U.; Arinaga, K.; Fujita, S.; Yokoyama, N.; Abstreiter, G.; Tornow, M. *Nano Lett*., **2004**, *4*, 2441-2445. (b) Rant, U.; Arinaga, K.; Fujita, S.; Yokoyama, N.; Abstreiter, G.; Tornow, M. *Org. Biomol. Chem*., **2006**, *4*, 3448-3455.

8 - (a) Grosberg, A. Y.; Khokhlov, A.R. *Statistical Physics of Macromolecules*; American Institute of Physics, New-York, **1994**. (b) Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. *Nucleic acids : Structures, Properties and Functions.* ; University Science Books, Sausalito, **2000**.

9 - (a) Storhoff, J.J.; Elghanian, R.; Mirkin, C.A.; Letsinger, R.L. *Langmuir*, **2002**, *18*, 6666-6670. (b) Kimura-Suda, H.; Petrovykh, D.Y., Tarlov, M.J.; Whitman, L.J. *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 9014-9015. (c) Wolf, L.K.; Gao, Y.; Georgiadis, R.M. *Langmuir*, **2004**, *20*, 3357-3360.

10 - (a) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces, 2nd edition* Academic Press, San Diego: **1992**; pp 238. (b) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces, 2nd edition* Academic Press, San Diego: **1992**; pp 275.

11 - (a) Rant, U.; Arinaga, K.; Fujita, S.; Yokoyama, N.; Abstreiter, G.; Tornow, M. *Langmuir*, **2004**, *20*, 10086-10092. (b) Rant, U.; Arinaga, K.; Fujita, S.; Yokoyama, N.; Abstreiter, G.; Tornow, M. *Nano Lett*., **2004**, *4*, 2441-2445.

12 - Miller, I.C.B.; Williams, D.R.M. *Phys. Rev. E*, **2000**, *61*, R4706-R4709.

13 - Cho, Y.-K.; Kim, S.; Lim, G.; Granick, S. *Langmuir*, **2001**, *17*, 7732-7734.

14 - Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces, 2nd edition* Academic Press, San Diego: **1992**; pp 275.

15 - Valle-Delgado, J.J.; Molina-Bolívar. J.A.; Galisteao-González, F.; Gálvez-Ruiz, M.J.; Feiler, A.; Rutland, M.W. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 5365-5371.

16 - LeNeveu, D.M.; Rand, R.P.; Pargesian, V.A. *Nature* (London) **1976**, *259*, 601-603.

17 - Rau, D.C.; Lee, B.; Parsegian, V.A. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, **1984**, *81*, 2621-2625.

18 - Butt, H-J. ; Capella, B.; Kappl, M. *Surface Science Reports* **2005**, *59*, 1-152

19 - *Scanning Electrochemical Microscopy*, Bard, A. J.; Mirkin, M. V., Eds.; Marcel Dekker: New York, **2001**.

20 - Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. *Nucleic acids : Structures, Properties and Functions*.; University Science Books, Sausalito, **2000**.

21 - À titre d'exemple, pour une espèce rédox libre de diffuser en solution, la courbure des courbes approche SECM dépend fortement de la géométrie de la pointe, c'est-à-dire à la géométrie du champ de diffusion autour de la micro-électrode. Voir les références : (a) Davis, J.; Fan, F-R. F.; Bard, A.J. *J. Electroanal. Chem*., **1987**, *238*,9-31. (b) Mirkin, M.V.; Fan, F-R. F.; Bard, A.J. *J. Electroanal. Chem.,* **1992**, *328*, 47-62.

22 - Wang, K.; Anne, A.; Demaille C. en préparation.

23 - Ortega, A.; Garcıa de la Torre, J. *J. Chem. Phys*. **2003**, *119*, 9914-9919.

Caractérisation par AFM-SECM de couches moléculaires de chaînes Fc-PEG ancrées sur substrat d'or plan

Rappel des résultats antérieurs

1 Introduction

2 Greffage de chaînes Fc-PEG par ancrage thiol sur surface d'or. Caractérisation électrochimique de la surface Fc-PEGylée

2.1 Présentation de la molécule de Fc-PEG-NHS et greffage sur surface d'or plane

2.2 Caractérisation de la surface Fc-PEGylée par voltammétrie cyclique

3 Conformation des chaînes de Fc-PEG : en solution et immobilisées sur surface d'or

3.1 Conformation des chaînes Fc-PEG en solution

3.2 Conformation des chaînes Fc-PEG ancrées sur surface

4 Détermination de la conformation et de la dynamique du mouvement des chaînes Fc-PEG en AFM-SECM

4.1 Courbes d'approche en force et en courant sur surface Fc-PEGylée

4.2 Détermination de la conformation des chaînes Fc-PEG sur surface par l'analyse des courbes d'approche enregistrées en force

4.3 Détermination du coefficient de diffusion de chaînes Fc-PEG ancrées sur surface par l'analyse de courbe d'approche en courant

5 Conclusions

1 Introduction

Les étapes préliminaires qui ont été menées avant même mon arrivée au laboratoire et qui visaient à développer une microscopie AFM-SECM à médiateur liée à la sonde, ont été la fabrication de sondes combinées AFM-SECM[1,2] et l'étude d'une surface greffée par des chaînes Fc-PEG avec une sonde nue.[2,3,4]

La présentation de ces résultats antérieurs est l'occasion d'effectuer un rappel de ce qui a déjà été mis en évidence concernant la relation entre la force appliquée à la couche de PEG durant l'approche et la dynamique du mouvement des têtes ferrocènes.

Ce chapitre présente également certains concepts fondamentaux relatifs à la conformation des chaînes Fc-PEG ancrées sur une surface, ainsi qu'à l'étude de la dynamique de mouvement des chaînes par l'analyse des courbes d'approche AFM-SECM en force et en courant.

Dans la suite du manuscrit, les surfaces d'or planes fonctionnalisées par des chaînes Fc-PEG seront décrites sous l'appellation de surfaces Fc-PEGylées.

2 Greffage de chaînes Fc-PEG par ancrage thiol sur surface d'or. Caractérisation électrochimique de la surface Fc-PEGylée

2.1 Présentation de la molécule de Fc-PEG-NHS et greffage sur surface d'or plane

La molécule de Fc-PEG-NHS utilisée pour la fonctionnalisation de la surface d'or plane, est issue d'une synthèse réalisée au sein de l'équipe,[5] et comporte une longue chaîne linéaire et flexible de poly(éthylène glycol) (PEG) composée en moyenne de 80 unités monomères, CH_2CH_2O. Cette chaîne porte à une extrémité, un groupement ester activé de N-hydrosuccinimide (NHS) et à l'autre extrémité est fixé un groupement rédox, ferrocène (Figure 32).

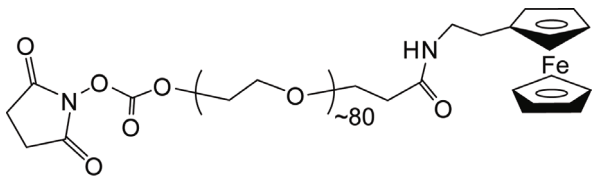


Figure 32 : Formule semi-développée de la molécule Fc-PEG à bout ester activé NHS.

Cette molécule de Fc-PEG a été choisie car l'équipe a antérieurement démontré que la chaîne PEG possède la longueur et la flexibilité nécessaire pour permettre a la tête Fc de servir de cofacteur rédox à la glucose oxydase, une enzyme rédox « modèle ».[6,7]

La fonctionnalisation d'une surface d'or fraîchement pelée par des chaînes Fc-PEG est obtenue selon deux étapes successives :

- La première étape consiste à recouvrir la surface d'une monocouche auto-assemblée de cystéamine, de formule $HSCH_2CH_2NH_2$, qui porte à une extrémité un groupement thiol, capable de se lier à l'or, et à l'autre extrémité un groupement amine servant de fonction d'ancrage au Fc-PEG-NHS.
- La seconde étape consiste à réaliser le couplage du groupement NHS des chaînes Fc-PEG-NHS avec les fonctions NH_2 de la cystéamine greffée à la surface, permettant ainsi un ancrage covalent des chaînes sur la surface d'or.

Le procédé de dérivatisation des surfaces d'or planes par la cystéamine puis le Fc-PEG-NHS, ainsi que la cellule de greffage sont schématisés en Figure 33.

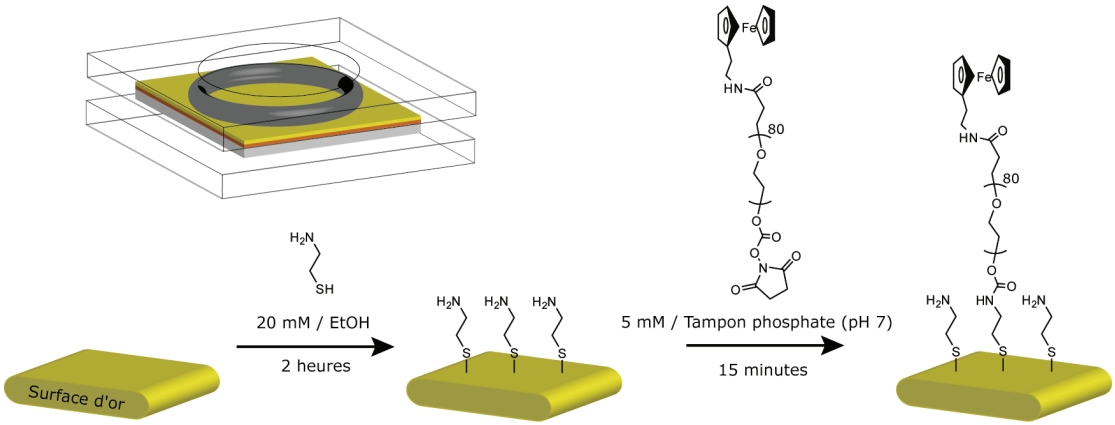


Figure 33 : Schéma du procédé de dérivatisation des surfaces d'or en deux étapes. La première étape consiste à assembler une monocouche de cystéamine par thiol-adsorption. Pour cela, on place une solution de cystéamine à 20 mM dans l'éthanol, en contact avec la surface d'or pelée durant 2 heures sous flux constant d'argon. La seconde étape est un couplage covalent entre la fonction amine de la monocouche ancrée et la fonction NHS portée par le Fc-PEG-NHS. Pour cela, une solution désoxygénée de Fc-PEG-NHS solubilisée à 5 mM dans un tampon phosphate pH 7 est mise en contact avec la surface d'or cystéaminée durant 15 minutes sous flux constant d'argon. En haut à gauche, une représentation de la cellule de greffage constituée d'un joint torique en viton (en gris foncé), d'une surface d'or pelée (en jaune) sous laquelle se trouve la couche de colle (en orange) déposée sur une plaque de verre (en gris clair), le tout étant maintenue par deux plaques d'altuglas (en structure filaire).

En pratique, *la première étape* de thio-adsorption de la cystéamine est réalisée en plaçant environ 800 µL d'une solution désaérée de cystéamine à 20 mM dans l'éthanol, en contact avec la surface d'or pelée durant 2 heures sous flux constant d'argon (Ar) ou éventuellement d'azote (N_2). La surface est ensuite rincée à l'éthanol absolu puis à l'eau milliQ préalablement désaérée et filtrée au travers d'une unité de filtration en nylon dont les pores ont un diamètre de 0,22 µm.

Afin d'éviter tout contact avec la colle présente sous la surface d'or, la solution de cystéamine est placée au sein d'un joint torique en viton qui est appuyé contre la surface, délimitant ainsi le contact de la solution de greffage avec la surface d'or. Ainsi, seul l'or est en contact avec la solution alcoolique sans que celle-ci ne risque, par un contact trop prolongé avec la colle, de le dissoudre légèrement et de contaminer la surface.

La monocouche de cystéamine obtenue est dense avec une concentration surfacique en molécules de cystéamine de 5.10^{-10} mol/cm², mesurée par « stripping cathodique ». Cette valeur représente 10 à 100 fois la concentration surfacique des chaînes de Fc-PEG une fois ancrées à la surface, comme nous le verrons plus loin. On peut donc en conclure que l'immobilisation de chaînes Fc-PEG par couplage covalent avec la cystéamine ancrée à la surface, *n'est pas limitée par la première étape* de fonctionnalisation de la surface.

De plus, il a été démontré que la présence des molécules de cystéamine ancrée sur la surface d'or ne gênait pas le transfert électronique hétérogène entre le ferrocènediméthanol en solution et la surface d'or.[8] Ainsi, les échanges électroniques entre les têtes ferrocènes portées par les chaînes PEG immobilisées, et la surface d'or cystéaminée, se feront comme sur une surface d'or nue.

La seconde étape de couplage covalent du Fc-PEG est effectuée en employant une solution désoxygénée de Fc-PEG-NHS solubilisée à 5 mM dans un tampon phosphate pH 7, mise en contact avec la surface d'or cystéaminée durant 15 minutes sous flux constant d'argon (Ar) ou éventuellement d'azote (N_2). On réalise ensuite le rinçage de la surface Fc-PEGylée par de l'eau milliQ préalablement filtrée au travers d'une unité de filtration en nylon de porosité 0,22 µm. Enfin, les molécules de Fc-PEG-NHS n'ayant pas réagi avec les groupements amines immobilisés sur la surface, sont désorbées par mise en contact durant 10 minutes de la surface Fc-PEGylée avec de l'eau milliQ filtrée.

La surface d'or Fc-PEGylée est ensuite stockée sous atmosphère inerte d'argon, à l'abri de la lumière, et laissée en contact avec une solution de $NaClO_4$ à 1 M.

2.2 Caractérisation de la surface Fc-PEGylée par voltammétrie cyclique

Le nombre de chaînes Fc-PEG greffées peut être déterminé sans ambiguïté par le biais de la détection des têtes ferrocènes. Chaque chaîne portant un et un seul marqueur ferrocène, le nombre de têtes ferrocènes détecté est par conséquent égal au nombre de chaînes immobilisées sur la surface d'or.

Cette détermination du nombre de chaînes greffées est effectuée à partir de l'enregistrement d'un voltammogramme dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M en parcourant le potentiel de substrat de –0,05 à 0,30 V/ECS avec une vitesse de balayage de 5 V/s (Figure 34).

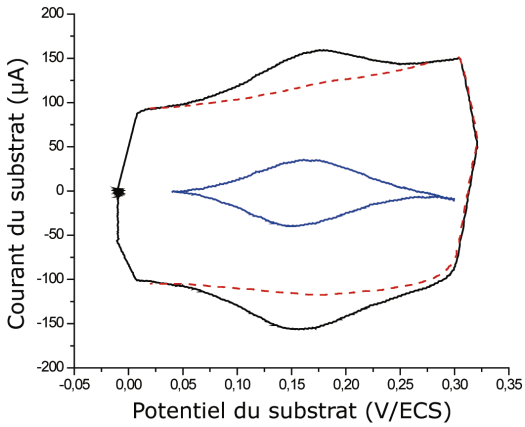


Figure 34 : En noir, le voltammogramme du Fc-PEG ancré à la surface d'or. En pointillé rouge, le voltammogramme de la surface d'or nue enregistré après que la couche de Fc-PEG ait été décrochée électrochimiquement par « stripping cathodique », il s'agit du courant pseudo-capacitif. En bleu, le signal du Fc-PEG corrigé du courant pseudo-capacitif de la surface. Concentration surfacique en Fc-PEG : $0{,}5.10^{-11}$ mol/cm². Vitesse de balayage : 5 V/s. Electrolyte support : $NaClO_4$ à 1 M. Aire de la surface effective : 2,5 cm².

Sur les différents voltammogrammes enregistrés, on note que les courants de pic sont proportionnels à la vitesse de balayage et que leurs valeurs retombent au niveau du courant de base lorsque le potentiel est très supérieur ou très inférieur au potentiel de pic, ce qui permet de conclure qu'on est bien en présence d'un *système immobilisé sur une surface*.

Comme on peut le voir sur la Figure 34, la séparation entre les potentiels de pics anodique et cathodique est faible, de l'ordre de 20 mV à une vitesse de balayage de 5 V/s, ce qui laisse à penser que la surface présente les caractéristiques d'un *système nernstien*.[9]

En outre, ces caractéristiques du voltammogramme nous confirment également que toutes les têtes ferrocènes ont eu amplement le temps d'échanger réversiblement un électron à la surface d'or pendant la durée du voltammogramme.

Une valeur du potentiel standard du couple Fc / Fc^+ des chaînes Fc-PEG immobilisée sur la surface d'or est déterminé en moyennant les potentiels relevés aux pics anodique et cathodique, et vaut 0,15 V ± 10 mV/ECS. On remarque que cette valeur est en accord avec le potentiel standard du couple Fc / Fc^+ obtenu précédemment dans d'autres études.[10,11]

L'intégration du pic anodique (ou cathodique) nous donne la charge Q échangée avec la surface lors de l'oxydation mono-électronique (ou la réduction) des têtes Fc. En divisant Q par l'aire de la surface effective de la surface d'or plane, on obtient alors la concentration surfacique Γ en chaînes Fc-PEG ancrées à la surface d'or, qui est typiquement d'environ $0{,}5.10^{-11}$ à $1{,}0.10^{-11}$ mol/cm².

Cette concentration surfacique est diminuée d'environ 15 % après 16 heures de stockage dans les conditions décrites précédemment, ce qui permet de conclure à une bonne stabilité dans le temps des surfaces Fc-PEGylées.

La détermination de la concentration surfacique en chaîne Fc-PEG immobilisées à la surface d'or plane est particulièrement importante car elle nous renseigne sur la *conformation* adoptée par les chaînes.

3 Conformation des chaînes de Fc-PEG : en solution et immobilisées sur surface d'or

3.1 Conformation des chaînes Fc-PEG en solution

Une chaîne linéaire flexible possède une longueur de contour de $L = aN$ avec N, le nombre de monomères et a, la longueur effective statistique d'un monomère constituant la chaîne de polymère.

Pour les chaînes Fc-PEG, a vaut 0,35 nm et N est d'environ 80 monomères, ce qui permet de déterminer une longueur de contour d'environ 30 nm. En solution dans un bon solvant, comme l'eau pour la chaîne PEG, la longueur de persistance l_p des chaînes PEG est donnée par $l_p = a/2 = 0{,}17\ nm$.

Nous sommes donc dans le cas $L >> l_p$ où la conformation des chaînes Fc-PEG libre en solution est donnée par la disposition au hasard des maillons de la chaîne dans l'espace. La chaîne adopte une conformation de pelote sphérique dite de « pelote de Flory » (illustré en Figure 35) caractérisée par une

taille donnée, R_F, le « rayon de Flory », qu'il est possible de calculer par l'équation suivante :

$$R_F = aN^{3/5}$$

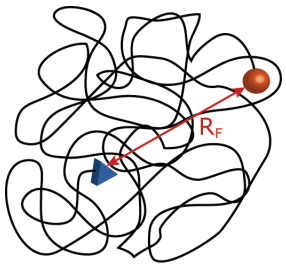


Figure 35 : Représentation schématique d'une chaîne Fc-PEG en solution dans la conformation de « pelote de Flory » caractérisée par une taille donnée par le « rayon de Flory », R_F, correspondant à la distance moyenne quadratique (ou « *Root Mean Square* ») entre les extrémités de la chaîne.

Comme on peut le voir sur la Figure 35, le « rayon de Flory » correspond à la distance moyenne quadratique entre les extrémités de la chaîne. Pour la chaîne Fc-PEG que nous utilisons, avec $N = 80$ monomères et $a = 0{,}35$ nm, le rayon de Flory est d'environ 5 nm.

3.2 Conformation des chaînes Fc-PEG ancrées sur surface

Lorsqu'une chaîne linéaire flexible est immobilisée par une de ces extrémités sur une surface, la conformations qu'elle adopte devient alors dépendante de sa concentration surfacique. Deux cas sont alors à envisager :

Pour les *concentrations surfaciques faibles*, telles que celles considérées ici, de l'ordre de $0{,}5.10^{-11}$ mol/cm², les chaînes sont suffisamment dispersées sur la surface pour ne pas interagir entre elle. Les chaînes Fc-PEG ancrées sont alors dans une configuration de pelote individuelle isolée qu'on appelle « champignon » (voir Figure 36a).

De façon identique à une chaîne Fc-PEG libre en solution, une chaîne Fc-PEG ancrée sur surface en conformation « champignon » occupe un volume correspondant à une demi-sphère de rayon de Flory, R_F.

Pour les *concentrations surfaciques élevées*, l'apparition d'interactions latérales entre les chaînes, les forcent à s'étirer perpendiculairement à la surface. Dans ce cas, les chaînes adoptent une structure dite en « brosse », d'une épaisseur h tel que $L > h > R_F$ (voir Figure 36b).

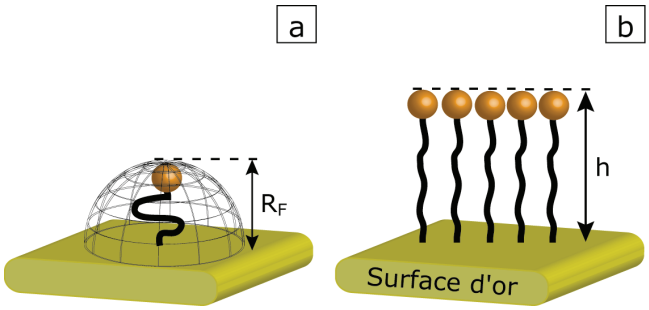


Figure 36 : Représentation schématique des différentes conformations d'une chaîne linéaire flexible ancrée sur une surface. (a) La conformation « champignon ». (b) La conformation « brosse ». Avec R_F, le rayon de Flory et h, l'épaisseur de la couche de polymère.

Les considérations rapportées ici, dites de « Scaling », permettent d'obtenir des équations simples décrivant les propriétés de polymères ancrées sur surface. Toutefois, la conformation exacte des chaînes Fc-PEG ne peut être déterminée que par des techniques sophistiquées de dynamique moléculaire[12] ou de simulation de Monte-Carlo[13] (Figure 37).

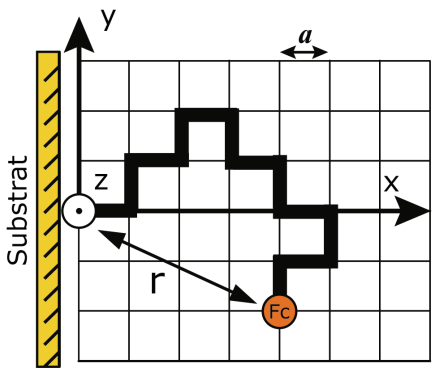


Figure 37 : Représentation de la conformation d'une chaîne de Fc-PEG ancrée telle qu'obtenue par une simulation en trois dimensions de Monte-Carlo (marche au hasard auto-évitante). Cette simulation consiste à ancrer une chaîne de N monomères sur le substrat et à décrire la « marche au hasard » sur une grille rectangulaire de maille a, la longueur statistique du monomère. Ici, la chaîne représentée est constituée de 12 monomères mais les chaînes Fc-PEG utilisées par la simulation sont constituées de 80 monomères.

Comme on peut le voir sur la Figure 37, dans le cas de la simulation de Monte-Carlo, il s'agit de reproduire en trois dimensions, la « marche au hasard » auto-évitante d'une chaîne dont chaque monomère successif la constituant, d'une longueur statistique a, peut être orientée selon les trois dimensions. On note que l'écart entre les extrémités de la chaîne *r peut avoir des valeurs différentes selon le cheminement de la chaîne*. Cette simulation donne donc accès à la distribution de ces différentes valeurs de r pour une chaîne Fc-PEG ancrée à la surface, ou plus simplement à la distribution de l'altitude x de la tête ferrocène au-dessus de la surface d'ancrage (Figure 38).

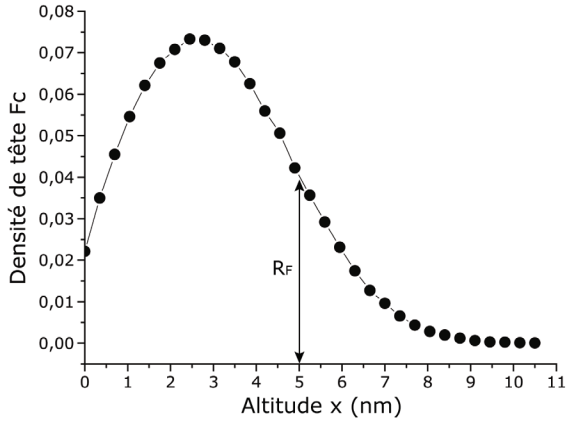


Figure 38 : Distribution de l'altitude *x* de la tête Fc d'une chaîne de Fc-PEG de 80 monomères au-dessus du point d'ancrage.

La Figure 38 démontre ici qu'il existe une probabilité non négligeable de trouver une tête ferrocène à une altitude *x* supérieure au rayon de Flory.

Ainsi, lors de l'approche de la pointe AFM-SECM d'une surface Fc-PEGylée, il est théoriquement possible de détecter des têtes Fc à une distance supérieure à R_F, c'est à dire à $d > 5$ nm, et jusqu'à une altitude $d \sim 10$ nm.

Enfin rappelons que l'élasticité de la chaîne Fc-PEG est de nature entropique, car elle est liée au nombre de conformations accessibles à la chaîne. En outre, et à titre indicatif, la comparaison de leur longueur de persistance respective montre que la chaîne Fc-PEG ($l_p \sim 0{,}17$ nm) est bien plus flexible que la chaîne d'ADN double brin ($l_p \sim 50$ nm), et même que la chaîne d'ADN simple brin ($l_p \sim 1$ nm).

4 Détermination de la conformation et de la dynamique du mouvement des chaînes Fc-PEG en AFM-SECM

4.1 Courbes d'approche en force et en courant sur surface Fc-PEGylée

Durant l'approche d'une pointe AFM-SECM sur une surface d'or Fc-PEGylée, on applique un potentiel au substrat $E_{substrat}$ de –0,1 V/ECS et à la pointe E_{pointe} de +0,4 V/ECS dans une solution électrolytique de $NaClO_4$ à 1 M.

Les courbes d'approche en force et en courant enregistrées simultanément en AFM-SECM sont exprimées en fonction de la distance séparant la pointe du substrat et présentées en Figure 39 a et b.

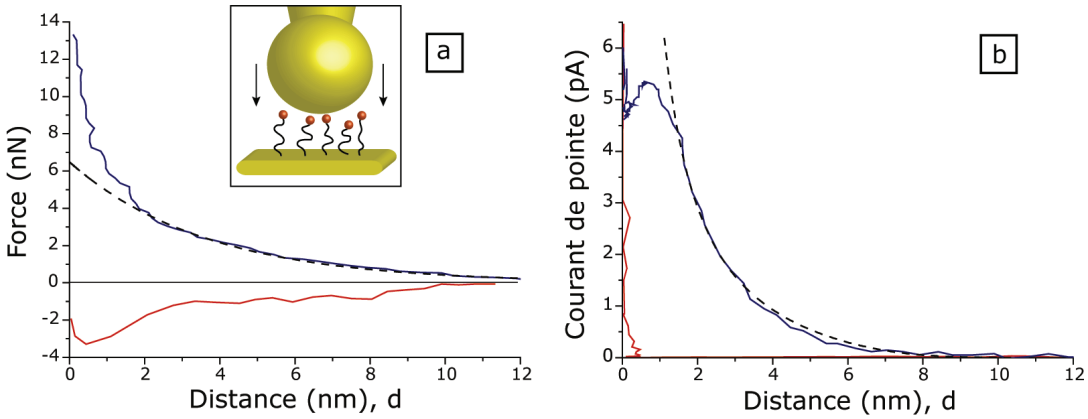


Figure 39 : Courbes d'approche (a) en force et (b) en courant d'une pointe AFM-SECM sur une surface Fc-PEGylée. En bleu, la courbe d'approche expérimentale. En tiret noir, la courbe d'approche théorique. En rouge, la courbe d'approche d'une pointe AFM-SECM nue sur une surface d'or nue. En insert en a, une représentation schématique de l'approche d'une sonde AFM-SECM sur une surface Fc-PEGylée.

On remarque que ces courbes d'approche sur surface Fc-PEGylée sont qualitativement similaires à celles déjà obtenues pour une couche de Fc-ADN ancrée sur surface d'or plane.

4.2 Détermination de la conformation des chaînes Fc-PEG sur surface par l'analyse des courbes d'approche enregistrées en force

Afin de rendre plus explicites les données enregistrées en déflection Z_{tip} durant l'approche d'une sonde AFM-SECM sur une surface Fc-PEGylée, on les convertit en force, comme on peut le voir en Figure 39a.

On constate qu'une force répulsive commence à être détectée dès $d \sim$ 10 nm et croit rapidement avec la diminution de la distance pointe-substrat. Les caractéristiques de cette courbe de force sont nettement différentes de celles obtenues dans le cas d'une pointe d'or nue approchant d'une surface d'or nue et pour lequel une force attractive or-or est détectée (Figure 39a, courbe rouge).

Ici, la force détectée est purement répulsive, ce qui permet de suspecter la présence d'une couche moléculaire intercalée entre la sonde AFM-SECM et le substrat, qui contrebalance la force attractive or-or. Afin de pouvoir confirmer l'origine de cette force répulsive obtenue lors de la compression d'une surface Fc-PEGylée par une pointe AFM-SECM, on peut par exemple chercher à obtenir le rayon de Flory R_F de la chaîne immobilisée à la surface. Pour cela, on compare la courbe de force expérimentale à la courbe de force théorique exprimée par une loi exponentielle traduisant la compression par une pointe sphérique, de chaînes polymères greffées sur une surface plane. Cette courbe de force théorique représentée sur la Figure 39a par une courbe en tirets est donnée par la formule suivante : [14,15]

$$F \approx 72\pi R_{\text{pointe}} \Gamma RT e^{(-d/R_g)}$$

avec R_{pointe} le rayon de la pointe AFM-SECM et R_g, le rayon de giration d'une chaîne ancrée sur surface plane que l'on va déterminer et qui est relié au rayon de Flory par $R_g = R_F / \sqrt{6}$.

L'ajustement du paramètre R_g permet une superposition parfaite de la courbe de force théorique avec celle obtenue expérimentalement pour $d > 2$ nm. La valeur de R_g employée ici est d'environ 3 nm, on trouve donc expérimentalement un $R_F \sim 7$ nm, ce qui correspond à peu près au rayon de Flory calculé précédemment pour une chaîne Fc-PEG et dont la valeur est d'environ 5 nm. Cette constatation tend à prouver qu'il s'agit bien de chaînes Fc-PEG immobilisées sur surface en conformation « champignon ».

4.3 Détermination du coefficient de diffusion de chaînes Fc-PEG ancrées sur surface par l'analyse de courbe d'approche en courant

Comme on peut le voir sur la Figure 39b, la détection d'un courant électrochimique a lieu dès ~ 8 nm et augmente avec l'approche de la sonde AFM-SECM sur le substrat. Toutefois, à d = 0,8 nm, on observe un pic de courant d'une valeur d'environ 5,3 pA, puis l'intensité du courant diminue jusqu'à 4,6 pA à 0,3 nm.

Pour une distance inférieure à 0,3 nm, le courant augmente ensuite brutalement dû à l'apparition d'un courant tunnel puis au contact physique entre la sonde AFM-SECM et la surface d'or.

Durant l'étude du Fc-ADN immobilisé sur surface d'or, nous avons démontré que le courant enregistré provenait d'un mouvement de « va et vient » des têtes Fc entre la sonde AFM-SECM où elles sont oxydées et la surface d'or où elles sont réduites. Dans le cas du Fc-PEG ancré sur surface d'or, il s'opère le même transfert électronique de la surface à la pointe par l'intermédiaire des têtes Fc dans un processus de « positive feedback ».

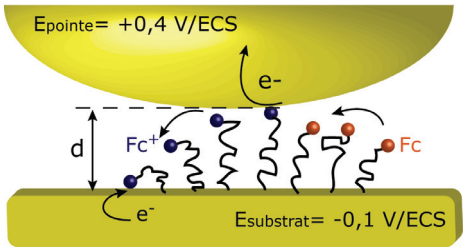


Figure 40 : Représentation schématique du mouvement de « positive feedback » des têtes ferrocènes qui sont oxydées à la pointe et réduites au substrat.

L'analyse du courant issue du « positive feedback » permet l'étude de la dynamique de mouvement des chaînes Fc-PEG. Pour cela, on a recours à une courbe d'approche théorique établie selon le « modèle de diffusion élastique » qui a été développé par l'équipe et qui prend en compte l'influence de l'élasticité de la chaîne PEG sur le mouvement des têtes ferrocènes. La courbe d'approche théorique peut être ajustée aux données expérimentales grâce à un paramètre unique i_0, le courant caractéristique reflétant la dynamique du mouvement des chaînes Fc-PEG. Ce courant caractéristique est défini selon la formule suivante :

$$i_0 = 2\pi FDR_{\text{pointe}}\Gamma / a$$

où D est le coefficient de diffusion effectif des têtes Fc et a, la taille statistique d'un monomère constituant la chaîne de polymère.

Connaissant, $\Gamma = 0{,}50.10^{-11}$ mol/cm², a = 0,35 nm, $R_{pointe} \sim 225$ nm, et en ajustant la courbe théorique et la courbe expérimentale, on obtient i_0 = 20 pA, ce qui nous permet la détermination du coefficient de diffusion des têtes Fc, $D \sim 10^{-8}$ cm²/s.

Si on réalise le même ajustement de la courbe d'approche en courant théorique avec celles obtenues pour plusieurs séries d'expériences, on en déduit alors une valeur moyenne du coefficient de diffusion effectif de $(2 \pm 1).10^{-8}$cm²/s. Cette faible valeur de D traduit l'effet hydrodynamique des chaînes PEG qui ralentit le mouvement des têtes ferrocènes.

5 Conclusions

Au cours de ce rappel des résultats précédemment obtenus par l'équipe, nous avons notamment présenté le procédé de greffage des chaînes Fc-PEG sur surface d'or qui a lieu selon deux étapes successives : l'auto-assemblage d'une couche de cystéamine puis le couplage covalent de la chaîne Fc-PEG-NHS.

Nous avons également pu mettre en avant certains concepts fondamentaux nécessaires à l'interprétation des résultats que nous obtiendrons quand les chaînes Fc-PEG seront portées par la pointe AFM-SECM.

Maintenant que nous avons effectué le rappel de la technique de greffage et la caractérisation des chaînes Fc-PEG sur surface d'or plane, nous pouvons alors nous tourner vers le greffage de ces mêmes chaînes Fc-PEG sur pointe AFM-SECM.

Bibliographie

1 - Abbou, J.; Demaille, C.; Druet, M.; Moiroux, *J. Anal. Chem*. **2002**, *74*, 6355-6363.

2 - *Développement d'une microscopie électrochimique (SECM) à l'échelle du nanomètre par couplage avec la microscopie à Force Atomique (AFM). Application à l'étude de la compression et de la dynamique de chaînes linéaires de polyethylène glycol immobilisées par une de leur extrémité à la surface d'un substrat d'or. Vers une microscopie à médiateur lié à la sonde* Jeremy Abbou, thèse de doctorat, soutenue en **2004**, Université Paris Diderot - Paris 7.

3 - Abbou, A.; Anne, A.; Demaille, C. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 10095-10108.

4 - Abbou, J.; Anne, A.; Demaille, C. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 22664-22675.

5 - Anne, A.; Moiroux, J. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5829-5835.

6 - Elastic Bounded Diffusion and Electron Propagation. Dynamics of the Wiring of a Self-Assembly of Immunoglobulins Bearing Terminally Attached Ferrocene Poly(ethylene glycol) Chains According to a Spatially Controlled Organization. Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, *123*, 4817-4825.

7 - Electrochemical Approach to the Dynamics of Molecular Recognition of Redox Enzyme Sites by Artificial Cosubstrates in Solution and in Integrated Systems. Anicet, N.; Anne, A.; Bourdillon, C.; Demaille, C.; Moiroux, J.; Savéant, J-M. *Faraday Discussions* **2000**, *116* (Bioelectrochemistry), 269-279.

8 - Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. *Macromolecules* **2002**, *35*, 5578-5586.

9 - Laviron, E. *In Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., Ed. ; Marcel Dekker: New-York, **1982**; *Vol. 12*, pp. 53-157.

10 - (a) Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121*, 10379-10388. (b) Demaille, C.; Moiroux, J. *J. Phys. Chem. B*. **1999**, *103*, 9903-9909. (c) Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, *123*, 4817-4825.

11 - Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. *Macromolecules* **2002**, *35*, 5578-5586

12 - Murat, M; Grest, G.S. *Macromolecules* **1989**, *22*, 4054-40597.

13 - Lai, P-Y.; Zhulina, E. B. *J. Phys. II*. France **1992**, *2*, 547-560.

14 - Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces, 2nd edition* Academic Press, San Diego: **1992**; pp 288-311

15 - Dolan, A.K.; Edwards, S.F. *Proc. R. Soc. Lond. A*. **1974**, *337*, 509-516.

Sondes combinées AFM-SECM portant des chaînes Fc-PEG

Fabrication et caractérisation

1 Introduction

2 Fonctionnalisation d'une sonde AFM-SECM en deux étapes : utilisation du Fc-PEG-NHS

3 Caractérisation de la pointe Fc-PEGylée par AFM-SECM : courbes d'approche en force et en courant

3.1 Détermination du taux de couverture et de la configuration des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM par l'analyse des courbes d'approche en force

3.2 Courbe d'approche en courant d'une sonde Fc-PEGylée sur une surface d'or plane

4 Détection spécifique de la présence des chaînes Fc-PEG portées par la pointe. Etude de la dépendance du courant de pointe en fonction du potentiel de pointe et du potentiel de substrat

4.1 Dépendance de ipointe en fonction de Epointe

4.2 Dépendance de ipointe en fonction de Esurface

4.3 Superposition des courbes de dépendance de ipointe en fonction de Epointe et de Esurface

5 Mise en évidence du « positive feedback » et détermination du coefficient de diffusion d'une sonde Fc-PEGylée en AFM-SECM

6 Conclusions

1 Introduction

Notre première approche de la fonctionnalisation des pointes AFM-SECM par des chaînes Fc-PEG a consisté à utiliser le protocole déjà établi pour obtenir les surfaces Fc-PEGylées, mais en l'adaptant afin de tenir compte des contraintes techniques inhérentes aux sondes AFM-SECM.

Compte tenu de la taille submicrométrique des pointes AFM-SECM utilisées, il est impossible d'effectuer une détection directe des chaînes Fc-PEG greffées par voltammétrie cyclique. En effet, le courant faradique des chaînes Fc-PEG serait masqué par le courant capacitif de la sonde combinée AFM-SECM.

De la même façon que pour les surfaces Fc-PEGylées, on emploiera le terme de « pointe Fc-PEGylée » pour désigner les pointes AFM-SECM dont l'extrémité est fonctionnalisée par des chaînes Fc-PEG.

2 Fonctionnalisation d'une sonde AFM-SECM en deux étapes : utilisation du Fc-PEG-NHS

Le protocole utilisé pour le greffage des chaînes Fc-PEG sur une pointe AFM-SECM est similaire à celui employé pour le greffage sur surface d'or plane mais n'est pas transposable directement car il faut prendre certaines précautions concernant le choix du solvant. On rappelle que le greffage est réalisé en deux étapes composées de la formation d'une monocouche de cystéamine ancrée à la surface d'or et du couplage covalent avec le Fc-PEG-NHS par réaction du groupement NHS avec le groupement amine de la cystéamine.

Précédemment, la cystéamine était mise en solution dans l'éthanol, mais ici, la peinture électrophorétique ayant servi pour isoler la pointe est incompatible avec ce solvant. Dans l'éthanol, le film isolant la pointe AFM-SECM se dilate, devient rugueux, et opaque. Cette modification des propriétés du film empêche la réflection du laser sur le bras flexible, le rendant complètement inutilisable.

Pour résoudre ce problème, on prépare 20 mM de cystéamine dans l'eau milliQ au lieu de l'éthanol.

Afin d'ôter toutes traces d'impuretés sur la pointe AFM-SECM, celle-ci est tout d'abord nettoyée électrochimiquement.[1] Pour cela, l'extrémité de la pointe est plongée dans une solution de H_2SO_4 à 0,5 M et cyclée 10 fois successivement en balayant le potentiel entre 0,3 et 1,8 V/ECS, à une vitesse de balayage de 2 V/s. Une fois la pointe AFM-SECM nettoyée électrochimiquement, les étapes de greffage peuvent alors être entreprises.

La première étape de greffage est effectuée en immergeant l'extrémité de la pointe AFM-SECM durant 2 heures dans la solution aqueuse de cystéamine à 20 mM, sous atmosphère inerte d'azote. La pointe AFM-SECM cystéaminée est ensuite rincée à l'eau milliQ et immergée durant 15 minutes dans un récipient contenant de l'eau milliQ préalablement désaérée. Ce rinçage permet la désorption des molécules de cystéamine n'ayant pas réagi à l'extrémité de la pointe AFM-SECM.

La seconde étape de greffage consiste à mettre en solution l'extrémité de la pointe cystéaminée dans une solution tamponnée à pH 7 de Fc-PEG-NHS à 5 mM. Cette immersion est réalisée durant 15 minutes dans une goutte de 15 à 30 µL déposée sur un support en téflon. L'extrémité de la pointe Fc-PEGylée est ensuite plongée dans l'eau milliQ durant 15 minutes pour rinçage.

Un schéma récapitulatif des étapes de greffage utilisant le Fc-PEG-NHS pour fonctionnaliser les pointes AFM-SECM est présenté en Figure 41.

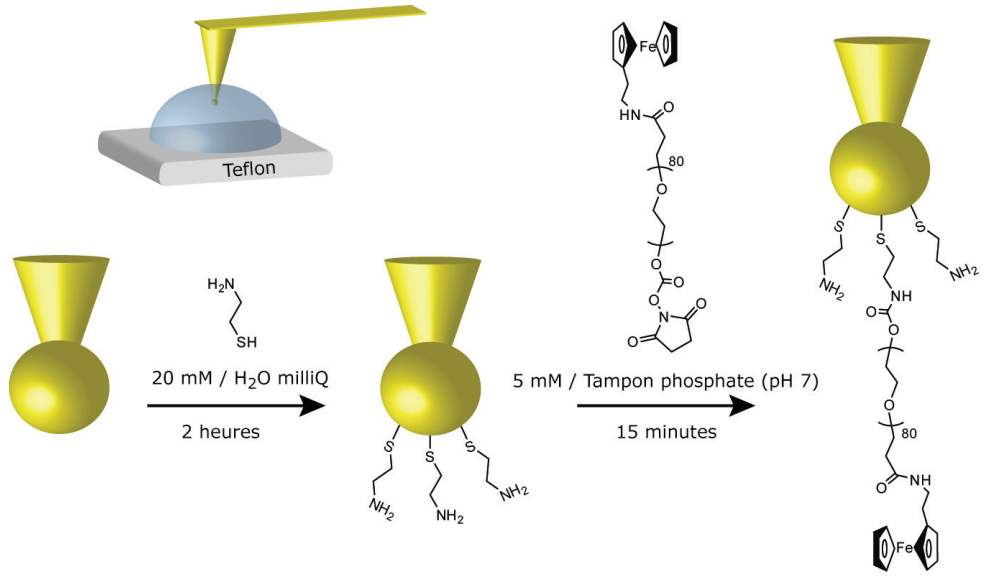


Figure 41 : Représentation schématique du greffage en 2 étapes des chaînes Fc-PEG à la surface d'une pointe d'or combinée AFM-SECM. Première étape, la pointe est recouverte d'une monocouche de cystéamine par immersion de la pointe d'or nue dans une solution de cystéamine à 20 mM durant 2 heures. Deuxième étape, le couplage covalent est réalisé avec le groupement NHS du Fc-PEG-NHS à 5 mM durant 15 minutes. En haut à gauche, un schéma représentant le greffage de la pointe AFM-SECM par immersion dans une goutte de solution de greffage de 15 à 30 µL déposée sur une surface en téflon. Pour une meilleure compréhension, la pointe AFM-SECM n'est pas mise à l'échelle.

Le greffage covalent terminé, la pointe Fc-PEGylée est alors prête pour être approchée en AFM-SECM d'une surface d'or plane fraîchement pelée afin de mettre en évidence la présence de chaîne Fc-PEG greffée à l'extrémité de la pointe. L'étude des courbes d'approche en force et en courant enregistrée, per-

mettra également la caractérisation de la conformation et de la dynamique de mouvement des chaînes Fc-PEG immobilisées sur la pointe AFM-SECM.

3 Caractérisation de la pointe Fc-PEGylée par AFM-SECM : courbes d'approche en force et en courant

La pointe Fc-PEGylée est montée rapidement sur le microscope AFM-SECM et approchée en mode contact d'une surface d'or plane dans une solution électrolytique de $NaClO_4$ à 1 M. La pointe Fc-PEGylée et la surface d'or sont respectivement portées à des potentiels largement positifs (E_{pointe} = +0,40 V/ECS) et largement négatif ($E_{surface}$ = -0,10 V/ECS) comparé au potentiel standard des têtes ferrocènes, E^0 = +0,15 V/ECS,[2] observé précédemment sur surface d'or Fc-PEGylée (Figure 42).

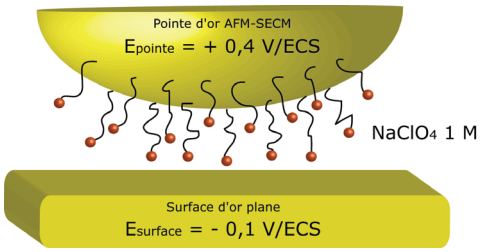


Figure 42 : Configuration en AFM-SECM d'une pointe Fc-PEGylée. Pour une meilleure compréhension, les éléments du schéma ne sont pas mis à l'échelle.

L'enregistrement de la déflection et du courant de pointe sont effectués simultanément durant l'approche de la sonde Fc-PEGylée sur la surface d'or plane. Les données brutes obtenues sont ensuite retracées en fonction de la distance *d* (Figure 43 et Figure 44) suivant la méthode de conversion déjà décrite précédemment.[2,3]

3.1 Détermination du taux de couverture et de la configuration des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM par l'analyse des courbes d'approche en force

La première partie des données enregistrées lors de l'approche d'une pointe Fc-PEGylée d'une surface d'or plane, la courbe d'approche en force, est présentée en Figure 43 (courbe bleue).

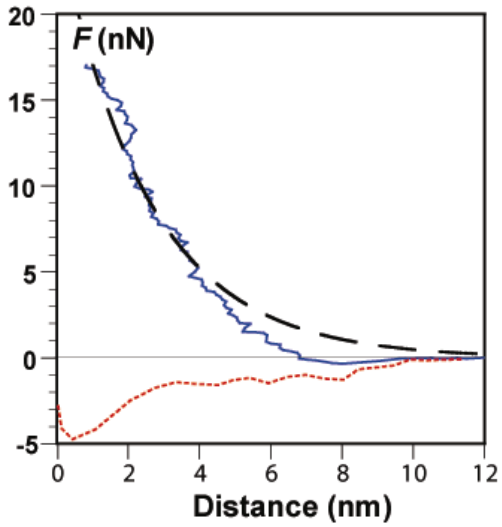


Figure 43 : En bleu, la courbe d'approche en force enregistrée lorsqu'une pointe Fc-PEGylée est approchée d'une surface d'or plane nue. En rouge, la courbe d'approche en force enregistrée avec une pointe AFM-SECM nue et une surface d'or nue. En noir, la courbe d'approche en force théorique correspondant à la compression par une large sonde sphérique d'une couche de polymère ancrée sur une surface. Vitesse d'approche de la pointe Fc-PEGylée : 10 nm/s. Milieu : aqueux contenant $NaClO_4$ 1 M. Concentration surfacique en chaînes Fc-PEG ancrées à la pointe AFM-SECM : $0{,}9.10^{-11}$ mol/cm².

Sur la Figure 43 (courbe bleue), on voit que pour une distance séparant la pointe de la surface comprise entre 10 et 7 nm, il existe une faible force qui attire la pointe Fc-PEGylée sur la surface, c'est à dire que la pointe est défléchie légèrement vers la surface d'or. Pour $d < 7$ nm, la pointe subit une force répulsive, qui augmente rapidement avec la réduction de l'écart entre la pointe Fc-PEGylée et la surface d'or plane.

La courbe d'approche en force d'une pointe Fc-PEGylée sur une surface d'or nue (courbe bleue) est très différente de celle obtenue lors de l'approche d'une pointe AFM-SECM nue sur une surface d'or nue (courbe rouge en pointillée). Dans ce dernier cas, la force due aux interactions or-or est purement attractive et atteint un maximum à $d \sim 0{,}3$ nm, ce qui engendre alors un contact brutal entre la pointe d'or nue et la surface d'or nue (« jump to contact »).

Si on compare cette courbe d'approche en force obtenue avec une pointe Fc-PEGylée sur surface d'or nue avec celle enregistrée durant l'approche d'une pointe nue sur surface Fc-PEGylée, on constate qu'elles sont similaires, ce qui fournit une première indication de la présence des chaînes Fc-PEG sur la pointe AFM-SECM. En effet, la forme arrondie observée sur la courbe d'approche en force de la sonde Fc-PEGylée est semblable à celle décrite précédemment dans le cas d'une pointe d'or nue approchant d'une surface Fc-PEGylée. Cette observation nous incite à effectuer une comparaison du

comportement en compression que nous observons ici à celui théoriquement prévu pour la compression par une pointe sphérique d'une couche de chaînes de polymères linéaires greffées en configuration « champignon » sur une surface d'or *plane*. Dans ce cas, la courbe d'approche en force théorique est alors donnée par une loi exponentielle précédemment utilisée pour les surfaces Fc-PEGylée et rappelée ici : [4,5]

$$F \approx 72\pi R_{\text{pointe}}\Gamma_{\text{pointe}}RTe^{\left[-d/R_g\right]} = F_0 e^{\left[-d/R_g\right]}$$

Équation 2

où R_{pointe} est le rayon de la pointe, Γ_{pointe} la concentration surfacique en chaînes Fc-PEG ancrées sur la sonde AFM-SECM et R_g, le rayon de giration.

En dépit des différences de géométrie entre l'approche d'une pointe Fc-PEGylée sur une surface d'or nue et l'approche d'une pointe AFM-SECM nue sur une surface Fc-PEGylée, on peut voir que la courbe d'approche théorique (Figure 43, courbe en tiret noir) reproduit correctement la forme de la courbe expérimentale, tout au moins pour $d \leq 5$ nm (Figure 43, courbe bleue).

Contrairement à l'étude sur surface Fc-PEGylée, la concentration surfacique en chaînes Fc-PEG portées par la sonde AFM-SECM est inconnue puisqu'il est impossible d'employer la voltammétrie cyclique pour la déterminer. C'est par conséquent, l'ajustement de la courbe d'approche en force théorique issue de l'Équation 2 sur la courbe expérimentale qui va permettre la détermination de Γ_{pointe}.

Plus quantitativement, nous obtenons un ajustement correct de la loi décrite par l'Équation 2 avec la courbe expérimentale pour une valeur de R_g d'environ 2,5 nm. Cette valeur du rayon de giration est proche de la valeur attendue pour les chaînes Fc-PEG qui est de 2 nm et est donnée par $R_g = R_F / \sqrt{6}$. Le même ajustement produit une valeur du facteur pré-exponentiel, $F_0 \sim 25$ nN, ce qui permet d'en déduire la concentration surfacique en chaînes Fc-PEG ancrées à la pointe AFM-SECM par $F_0 = 72\pi R_{\text{pointe}}\Gamma_{\text{pointe}}RT$.

Pour la valeur du rayon de pointe mesurée R_{pointe} d'environ 500 nm, on obtient donc $\Gamma_{pointe} = (0{,}88 \pm 0{,}15).10^{-11}$ mol/cm².

Cette dernière valeur peut être traduite en une distance entre les chaînes Fc-PEG sur la pointe, qui est d'environ 4 à 5 nm. Cette distance interchaîne étant équivalente à R_F (d'environ 5 nm), on peut considérer que les chaînes greffées interagissent faiblement entre elle, et se trouve donc immobilisée sur la sonde AFM-SECM dans une configuration « champignon ».

Cependant, à la différence de ce que nous avons précédemment décrit pour le cas d'une surface Fc-PEGylée, on note la présence d'un écart entre la loi de force théorique et les courbes d'approche obtenues expérimentalement

pour une distance sonde Fc-PEGylée-surface d'or plane d'environ 5 à 10 nm. Dans cette dernière région, la courbe de force expérimentale passe systématiquement en dessous de la courbe de force théorique (Figure 43).

Sur les courbes d'approche en force enregistrées lors de l'approche d'une pointe AFM-SECM nue sur une surface Fc-PEGylée (Figure 39a), dans cette gamme de distance, la courbe expérimentale se superposait parfaitement à la courbe théorique, alors que la concentration surfacique en chaînes Fc-PEG ancrées était du même ordre de grandeur.

On peut alors penser que les interactions or-or observables entre une pointe d'or nue et une surface plane d'or nue (Courbe rouge en pointillé) ne sont pas masquées aussi efficacement lorsque les chaînes Fc-PEG sont portées par la pointe AFM-SECM de géométrie sphérique, que lorsqu'elles sont ancrées sur une surface d'or plane. En conséquence quand la distance séparant la pointe Fc-PEGylée de la surface est d'environ 6 à 10 nm, la pointe fonctionnalisée est légèrement attirée vers la surface par les forces d'interactions or-or. Toutefois, la pointe Fc-PEGylée n'entre pas en contact brutal avec la surface d'or (contrairement à une pointe AFM-SECM nue) car les interactions or-or sont ensuite contrebalancées par la compression des chaînes Fc-PEG pour $d < 5$ nm.

Ces résultats indiquent donc la présence d'une couche de chaînes Fc-PEG ancrées à l'extrémité de la pointe d'or sphérique.

3.2 Courbe d'approche en courant d'une sonde Fc-PEGylée sur une surface d'or plane

On présente maintenant la seconde partie des données enregistrées lors de l'approche d'une pointe Fc-PEGylée d'une surface d'or plane, c'est à dire la courbe d'approche en courant présentée en Figure 44 (courbe bleue).

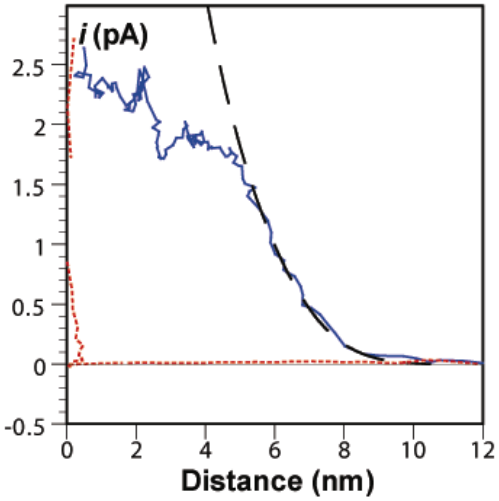


Figure 44 : En bleu, la courbe d'approche en courant enregistrée lorsqu'une pointe Fc-PEGylée est approchée d'une surface d'or plane. En rouge, la courbe d'approche en courant enregistrée avec une pointe AFM-SECM nue et une surface d'or nue. En noir, la courbe d'approche en courant théorique correspondant à la compression par une sonde sphérique d'une couche de polymère Fc-PEG ancrée sur une surface. Vitesse d'approche de la pointe Fc-PEGylée : 10 nm/s. Potentiel appliqué : E_{pointe} = 0,4 V/ECS, $E_{surface}$ = -0,1 V/ECS. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M. Concentration surfacique en chaînes Fc-PEG ancrées à la pointe AFM-SECM : $0{,}9.10^{-11}$ mol/cm².

Comme on peut le voir sur la Figure 44, le courant augmente dès une distance d'environ 10 nm, jusqu'à un plateau de courant d'une valeur de 1,9 pA à une distance d'environ 4 nm et qui s'étend sur approximativement 2 nm. Pour d < 2 nm, le courant augmente plus rapidement avec la réduction de l'écart entre la pointe Fc-PEGylée et la surface d'or plane. La variation abrupte de courant, observable pour d < 1 nm, est attribuable à l'établissement d'un courant tunnel puis au contact physique entre la pointe Fc-PEGylée et la surface d'or plane.

En outre, on note que lors de l'approche d'une pointe d'or nue, d'une surface d'or nue, seul le courant tunnel et le courant issu du contact physique entre les deux électrodes est détecté à d < 1 nm (Figure 44, courbe rouge).

On remarque que les courbes d'approche en courant enregistrées avec une pointe Fc-PEGylée approchant d'une surface plane d'or nue, sont très similaires aux courbes obtenues avec une pointe AFM-SECM nue approchant d'une surface Fc-PEGylée.[2,3]

On note également que les courbes en courant enregistrées lors de la rétractation (non présentées ici) de la sonde Fc-PEGylée, sont semblables à celles obtenues en approche. Cette observation semble prouver que les chaînes Fc-PEG ancrées à la pointe AFM-SECM ne sont pas relarguées lorsqu'elles sont comprimées contre le substrat. La couche de chaînes Fc-PEG présente donc une certaine robustesse à la compression contre une surface rigide.

Avant de poursuivre l'étude de cette courbe d'approche en courant, il est tout d'abord nécessaire de lever toute ambiguïté sur l'origine du courant observé ici.

4 Détection spécifique de la présence des chaînes Fc-PEG portées par la pointe. Etude de la dépendance du courant de pointe en fonction du potentiel de pointe et du potentiel de substrat

N'ayant pas la possibilité de caractériser directement la couche moléculaire ancrée à la pointe AFM-SECM par voltammétrie cyclique, comme pour une surface Fc-PEGylée, on utilise par conséquent d'autres moyens d'étude. Pour cela, on étudie la dépendance du courant de pointe, i_{pointe}, en fonction du potentiel de la pointe Fc-PEGylée, E_{pointe} d'une part, et du potentiel de la surface d'or plane, $E_{surface}$ d'autre part.

4.1 Dépendance de i_{pointe} en fonction de E_{pointe}

On fait varier le potentiel de la pointe AFM-SECM de –0,05 à 0,35 V/ECS par palier successif entre chaque courbe d'approche. Le potentiel de la surface d'or plane est quant à lui laissé fixe à –0,05 V/ECS. L'intensité du plateau de courant observé pour une distance *d* entre 3 et 5 nm est mesurée pour chaque courbe d'approche obtenue puis portée en fonction du potentiel de pointe correspondant. On construit ainsi point par point la courbe présentée en Figure 45.

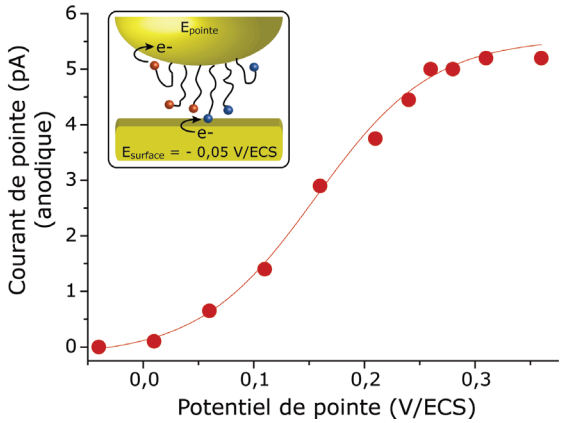


Figure 45 : Dépendance du courant de pointe en fonction du potentiel de pointe. Le courant de pointe est obtenu en mesurant le plateau de courant à *d* compris entre 3 et 5 nm des courbes d'approche en courant de la pointe Fc-PEGylée sur surface d'or nue. Le potentiel de la pointe varie de –0,05 à 0,35 V/ECS par palier successif entre chaque approche d'une surface d'or nue laissée à un potentiel fixe de –0,05 V/ECS. En insert, la représentation schématique du processus de positive feedback ayant lieu. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M. Concentration surfacique en chaîne Fc-PEG sur la pointe AFM-SECM : $0{,}9.10^{-11}$ mol/cm².

Lorsque le potentiel de la pointe est égal au potentiel de la surface, c'est à dire ici –0,05 V/ECS, les têtes ferrocènes ne sont pas oxydées et restent sous forme réduite, on constate qu'aucun courant n'est alors mesuré, lors de l'approche de la pointe Fc-PEGylée sur la surface d'or plane.

A l'inverse, si l'on accroît le potentiel de la pointe Fc-PEGylée, le courant de pointe augmente continûment jusqu'à atteindre un plateau pour $E_{pointe} >$ 0,20 V/ECS. La courbe i_{pointe} versus E_{pointe} obtenu est de forme sigmoïdale et centrée à 0,15 V/ECS. Ce potentiel de demi-vague correspond au potentiel standard des têtes Fc portées par des chaînes PEG, mesuré lorsque les chaînes étaient immobilisées sur surface d'or plane.

Notons que nous avons pu également observé que, pour $E_{surface} <$ -0,05 V/ECS, la dépendance de i_{pointe} en fonction de E_{pointe} est similaire à celle présentée en Figure 45.

4.2 Dépendance de i_{pointe} en fonction de $E_{surface}$

Afin d'établir la dépendance de i_{pointe} en fonction du $E_{surface}$, on pourrait procéder comme ci-dessus, c'est à dire enregistrer plusieurs courbes d'approche mais cette fois-ci à E_{pointe} constant et pour différentes valeurs de $E_{surface}$. Toutefois, une seconde technique plus rapide existe, mais elle est aussi plus délicate et contraignante à réaliser en pratique que la première.

On peut en effet positionner la sonde à une distance sonde-surface fixe correspondant, par exemple, au plateau de courant observé sur la courbe d'approche en courant (Figure 44, courbe bleue) et réaliser le balayage du potentiel de surface tout en collectant i_{pointe}. L'avantage est que si l'on commet une légère erreur de positionnement, étant donné qu'on se place sur un plateau de la courbe $i_{pointe} = f(d)$, cela n'engendre pas de conséquence si l'on reste dans un domaine de distance acceptable de l'ordre de ± 1 nm.

En pratique, on place la pointe Fc-PEGylée à une distance déterminée sur la Figure 44 au environ de $d \sim 4$ nm, et on réalise ensuite le balayage du potentiel de surface de –0,05 V à 0,30 V/ECS à une vitesse de balayage de 10 mV/s. La pointe Fc-PEGylée est quant à elle laissée à un potentiel fixe de –0,05 V/ECS et on mesure i_{pointe}.

On obtient alors le voltammogramme représentant la variation du courant de pointe mesuré en fonction du potentiel de la surface d'or plane présenté en Figure 46.

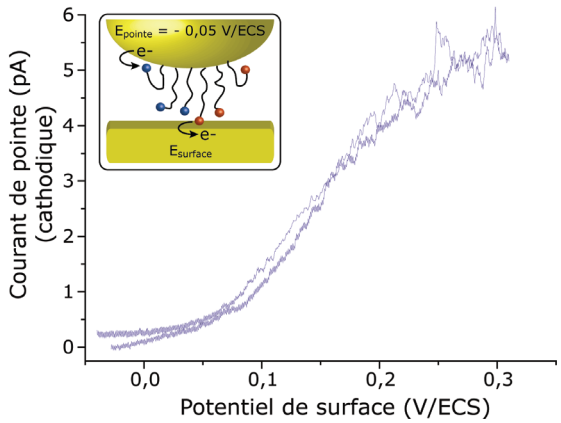


Figure 46 : Dépendance du courant de pointe en fonction du potentiel de la surface d'or plane. On place la pointe Fc-PEGylée à une distance constante d'environ 4 nm de la surface d'or plane. Le potentiel de la surface est balayé de –0,05 V à 0,30 V/ECS à une vitesse de balayage de 10 mV/s. le potentiel de la pointe Fc-PEGylée où est mesuré le courant, est laissé fixe à –0,05 V/ECS. En insert, la représentation schématique du processus de positive feedback ayant lieu. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M. Concentration surfacique en chaîne Fc-PEG sur la pointe AFM-SECM : $0{,}9.10^{-11}$ mol/cm².

On peut voir sur la Figure 46 que la courbe en courant présente une forme sigmoïdale centrée à 0,15 V/ECS, confirmant que le courant mesuré provient bien des têtes ferrocènes portées par les chaînes PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM.

Notons que pour E_{pointe} < -0,05 V/ECS, on enregistre un voltammogramme i_{pointe} en fonction de $E_{surface}$, similaire à celui présenté en Figure 46.

Le principal inconvénient de cette dernière technique de caractérisation électrochimique de la présence des chaînes réside dans le fait qu'elle est délicate à mettre en oeuvre. En effet, en mode contact, le contrôle exact de la distance stationnaire sonde-surface nécessite un système très stable en déflection ; or souvent l'on observe une dérive de celle-ci. Ces variations de la déflection proviennent principalement de l'effet bilame du bras flexible en or et de la couche de peinture isolante le recouvrant, qui possèdent des propriétés thermiques différentes.

4.3 Superposition des courbes de dépendance de i_{pointe} en fonction de E_{pointe} et de $E_{surface}$

On peut superposer les courbes de dépendance de $|i_{pointe}|$ enregistrées précédemment en faisant varier E_{pointe} (Figure 45) ou $E_{surface}$ (Figure 46), comme présenté en Figure 47.

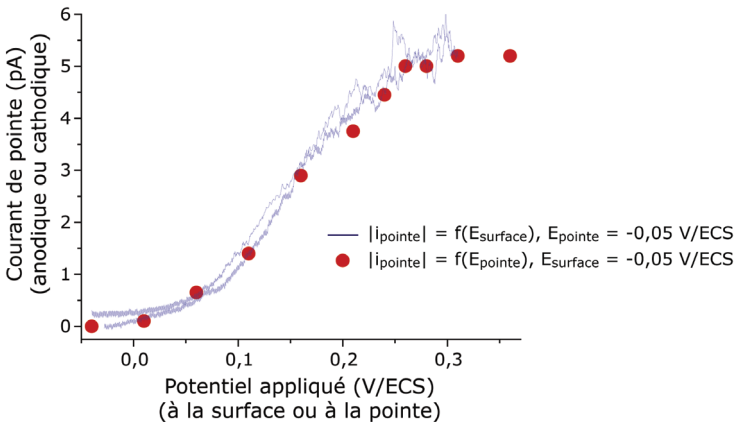


Figure 47 : Superposition de la dépendance de i_{pointe} en fonction de E_{pointe} (point rouge) ou de $E_{surface}$ (courbe bleue). Pour la courbe constituée de point rouge, i_{pointe} est obtenu en mesurant le plateau de courant à d compris entre 3 et 5 nm, des courbes d'approche en courant de la pointe Fc-PEGylée sur surface d'or nue. Entre chaque approche d'une surface d'or nue E_{pointe} varie de –0,05 à 0,35 V/ECS par palier successif alors que $E_{surface}$ = –0,05 V/ECS. Pour la courbe bleue, la pointe Fc-PEGylée est positionnée à une distance constante d'environ 4 nm de la surface d'or plane et $E_{surface}$ est balayé de –0,05 V à 0,30 V/ECS à 10 mV/s. Le potentiel de la pointe Fc-PEGylée où est mesuré le courant, est laissé fixe à –0,05 V/ECS.

Comme on peut le voir sur la Figure 47, les courbes de dépendances du courant de pointe enregistrées en faisant varier E_{pointe} (point rouge) ou $E_{surface}$ (courbe bleue), se superposent parfaitement. Ces résultats prouvent d'autant plus l'origine électrochimique du courant mesuré puisque le signal reste de forme sigmoïde centré à 0,15 V/ECS, quelle que soit l'électrode balayée en potentiel.

On peut donc affirmer que le courant de pointe mesuré est bien d'*origine faradique*. La spécificité de cette détection électrochimiques des têtes Fc constitue donc la démonstration sans équivoque de *la présence de chaînes Fc-PEG à l'extrémité de la pointe AFM-SECM*.

On peut également conclure que les deux procédés de détection spécifique de la présence des chaînes Fc-PEG portées par la pointe AFM-SECM sont *équivalents*. Ces résultats démontrent en effet, la stricte équivalence des configurations entre l'application de $E_{pointe} > E^0$ (le potentiel standard des têtes Fc) avec $E_{surface} \leq$ -0,05 V/ECS, et la configuration inverse où $E_{surface} > E^0$ avec $E_{pointe} \leq$ -0,05 V/ECS.

Par ailleurs, bien que les résultats ne soient pas présentés ici, nous avons également constaté que les potentiels appliqués à la surface ou à la pointe Fc-PEGylée n'influent pas sur les courbes de force mesurées. On peut expliquer cela par l'écrantage des charges électrostatiques qui a lieu de par la forte concentration en ions de l'électrolyte support utilisé pour nos expériences en AFM-SECM.

En conséquence, la contribution des interactions électrostatiques aux forces que nous mesurons ici est négligeable.

5 Mise en évidence du « positive feedback » et détermination du coefficient de diffusion d'une sonde Fc-PEGylée en AFM-SECM

Les courbes d'approche en courant ont permis de démontrer qu'un courant électrochimique différent de ce qu'on peut obtenir avec une pointe AFM-SECM nue est observé avec une pointe Fc-PEGylée (Figure 44).

De plus, le balayage du potentiel de pointe ou de substrat respectivement entre chaque courbe d'approche (Figure 45) ou à *d* fixe (Figure 46), a permis de conclure que le courant mesuré durant les courbes d'approche est *d'origine faradique et provient du changement d'état rédox des têtes Fc de la sonde Fc-PEGylée*.

En outre, nous avons démontré précédemment que des chaînes *Fc-PEG ancrées sur surface d'or plane* réalisaient un mouvement de « va et vient » entre la surface d'or et la pointe AFM-SECM nue.

Compte tenu de la grande similitude entre les résultats obtenus en AFM-SECM pour une sonde nue approchant d'une surface Fc-PEGylée et une pointe Fc-PEGylée approchant d'une surface d'or nue, on peut en conclure que les chaînes Fc-PEG effectuent le même mouvement. Le courant enregistré lors de l'approche d'une pointe Fc-PEGylée sur une surface d'or plane résulte donc du mouvement de « va et vient » des têtes Fc portées par les chaînes PEG qui sont donc alternativement oxydées à la pointe et réduite à la surface d'or plane. Les électrons sont transférés à travers l'espace pointe-surface, grâce au mouvement des têtes ferrocènes faisant la navette entre les deux électrodes, comme on peut le voir schématisé en Figure 48.

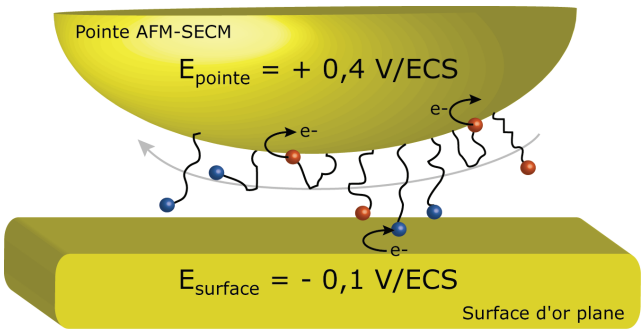


Figure 48 : Représentation schématique du mouvement de « va et vient » des chaînes Fc-PEG ancrées sur une pointe AFM-SECM. Les têtes ferrocènes sont alternativement oxydées à la pointe et réduites à la surface d'or plane. Sur le schéma, les têtes Fc sous forme réduite sont en orange et en bleu sous forme oxydée.

Ayant démontré l'origine du courant mesuré durant l'approche d'une pointe Fc-PEGylée d'une surface d'or plane, on peut également tenter d'expliquer la présence du plateau de courant observé sur les courbes d'approche (voir Figure 44). Ce plateau de courant résulte sans doute d'un ralentissement du mouvement de « va et vient » des têtes ferrocènes confinées, induit par la compression des chaînes Fc-PEG entre la pointe AFM-SECM et la surface d'or plane.

Notons que, quand on applique une valeur de E_{pointe} > 0,25 V/ECS avec $E_{surface} \leq$ -0,05 V/ECS (Figure 45), i_{pointe} ne dépend plus de la valeur exacte du potentiel appliqué à la pointe. De plus, on note également que dans la configuration inverse, c'est à dire $E_{pointe} \leq$ -0,05 V/ECS avec $E_{surface}$ > 0,25 V/ECS (Figure 46), i_{pointe} ne dépend pas non plus de la valeur exacte du potentiel appliqué à la surface.

Dans ces deux configurations, on peut dire que la cinétique de transfert électronique hétérogène à la pointe Fc-PEGylée et à la surface d'or, est infiniment rapide. L'intensité du courant de pointe n'est alors limitée que par la vitesse de l'aller-retour réalisé par la tête Fc entre la pointe et la surface. *L'analyse de la réponse du « positive feedback » donne donc accès à la dynamique de mouvement des chaînes portées par la pointe AFM-SECM*.

Ce processus original de « positive feedback » des chaînes linéaires Fc-PEG liées à une surface d'or a déjà été étudié par notre équipe et quantitativement modélisé en tenant compte de la contribution élastique de la chaîne de PEG au cours de la diffusion des têtes Fc (voir chapitre précédent).

La courbe noire en tiret de la Figure 44 correspond à la courbe d'approche en courant *théorique* établit grâce au « modèle simple de diffusion élastique » décrivant le cas d'une large sonde sphérique combinée AFM-SECM *nue* approchant d'un substrat fonctionnalisé par des chaînes Fc-PEG. On s'aperçoit que cette courbe d'approche théorique se superpose parfaitement à la courbe expérimentale (en bleu) pour des distances allant de 12 à 5 nm. Cette courbe d'approche en courant théorique est calculée en employant un paramètre ajustable, i_0, le courant caractéristique reflétant la dynamique des chaînes précédemment décrite dans l'étude d'une surface Fc-PEGylée en AFM-SECM, dont l'expression est donnée par :

$$i_0 = 2\pi FDR_{\text{pointe}}\Gamma_{\text{pointe}} / a$$

avec D, le coefficient de diffusion effectif des têtes ferrocènes.

On fait correspondre la courbe théorique avec la courbe expérimentale en ajustant le paramètre i_0. L'ajustement des courbes est le plus satisfaisant

pour i_0 = 80 pA. Connaissant Γ_{pointe}, la concentration surfacique en chaînes Fc-PEG greffées sur la pointe par l'analyse des courbes d'approche en force, Γ_{pointe} = (0,88 ± 0,15).10^{-11} mol/cm², on peut alors en déduire D qui vaut environ 10^{-8} cm²/s.

L'approche de plusieurs pointes Fc-PEGylées sur surface d'or plane à permis la détermination d'une valeur moyenne de D = (2 ± 1).10^{-8} cm²/s. On retrouve donc une valeur similaire à celle déjà obtenue lors de l'approche d'une sonde AFM-SECM nue sur une surface Fc-PEGylée.

Cette valeur de D prouve que la courbe d'approche théorique calculée pour le cas d'un substrat Fc-PEGylé, décrit également la dynamique de mouvement des chaînes Fc-PEG portées par une large pointe sphérique. Ceci résulte du fait que la séparation entre la pointe Fc-PEGylée (ou nue, suivant la géométrie considérée) et la surface d'or plane (ou surface Fc-PEGylée) nécessaire pour permettre aux chaînes d'échanger des électrons, est suffisamment faible pour que, dans les deux cas considérés, le champ « diffusionnel » des têtes Fc soit orienté de manière équivalente, c'est à dire perpendiculairement au substrat (Figure 49).

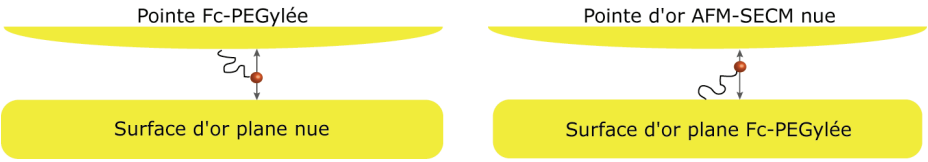


Figure 49 : Schéma représentant l'équivalence du champ « diffusionnel » entre l'approche d'une pointe Fc-PEGylée vers une surface d'or nue, et l'approche d'une pointe AFM-SECM nue vers une surface Fc-PEGylée.

La conséquence pratique de cette équivalence est que la courbe d'approche en courant théorique calculée précédemment peut-être utilisée pour obtenir directement la valeur du taux de couverture en chaînes ancrées à la pointe AFM-SECM. En effet, Γ_{pointe} peut être déterminé simplement par l'ajustement de la courbe d'approche théorique avec la courbe d'approche en courant expérimentale à condition que la valeur de D des chaînes soit connue.

La détermination du coefficient de diffusion effectif des têtes Fc ancrées sur pointe AFM-SECM est également primordiale car elle permet d'estimer la « résolution cinétique » de la nouvelle microscopie à médiateur lié à la sonde que nous développons. En effet, seules les réactions de surface caractérisées par une constante de vitesse du premier ordre inférieur à $D / R_F^2 = 8.10^4 s^{-1}$ pourront être cinétiquement étudiées en AFM-SECM par une pointe Fc-PEGylée. Au-delà de cette vitesse de réaction, le mouvement des

chaînes Fc-PEG n'est pas assez rapide et devient alors le phénomène cinétiquement déterminant.

Pour les enzymes rédox les plus communes, la vitesse de réaction couramment observée est de l'ordre de la 10^3 s^{-1},[6] et est, par conséquent suffisamment lente pour être caractérisée grâce à la microscopie AFM-SECM à médiateur lié que nous nous proposons de développer.

6 Conclusions

A ce stade, nous avons démontré que l'analyse des courbes d'approche en force et en courant enregistrées avec une pointe AFM-SECM Fc-PEGylée approchant d'une surface d'or nue permet non seulement de confirmer la présence de chaîne à l'extrémité de la sonde combinée AFM-SECM, mais permet également d'évaluer le taux de couverture en chaîne Fc-PEG et d'en étudier quantitativement la dynamique.

L'étape suivante de mon travail a consisté à optimiser la fabrication de nos pointes Fc-PEGylées afin de pouvoir utiliser ce type de sonde en routine dans l'étude de différents substrats.

Bibliographie

1 - Rand, D. A. J. ; Woods, R. J. *J. Electroanal. Chem* **1972**, *35*, 209-218.

2 - Abbou, A.; Anne, A.; Demaille, C. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 10095-10108.

3 - Abbou, J.; Anne, A.; Demaille, C. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 22664-22675.

4 - Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces, 2nd edition* Academic Press, San Diego: **1992**; pp 288-311.

5 - Dolan, A.K.; Edwards, S.F. *Proc. R. Soc. Lond. A*. **1974**, *337*, 509-516.

6 - *The enzymes*, Sigman, D.S. Ed.; Academic press inc.: San Diego, **1992**; *Vol. 12*.

Fiabilisation des sondes Fc-PEGylées

1 Introduction

2 Les sources d'irreproductibilité

2.1 Existe t-il un phénomène de relargage spontané des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM ?

2.2 Existe t-il un phénomène de transfert des chaînes de la pointe AFM-SECM vers la surface par contact ?

2.3 La sonde subit-elle des chocs « électriques » ?

2.4 La première étape du procédé de greffage effectuée en « aveugle » échoue t-elle ?

3 Greffage simplifié en une seule étape : Fonctionnalisation de la sonde par une nouvelle molécule, le Fc-PEG-disulfure

3.1 Présentation de la molécule et du procédé de greffage

3.2 Caractérisation et stabilité de la couche de Fc-PEG obtenue par greffage du Fc-PEG-SS

4 Identification des facteurs d'instabilité – Les précautions

5 Greffage du Fc-PEG-disulfure sur pointe AFM-SECM : Validation de l'emploi de cette molécule pour la production de sonde Fc-PEGylée

6 Conclusions

1 Introduction

Dans la partie précédente, nous avons prouvé qu'il est possible de greffer des chaînes Fc-PEG sur une pointe AFM-SECM, pour ensuite l'utiliser comme sonde sur une surface d'or plane.

Cependant, une certaine irreproductibilité de la fonctionnalisation de nos pointes AFM-SECM a pu être constatée. En effet, il a parfois été possible d'enregistrer plusieurs centaines de courbes d'approche en force et en courant à différents endroits sur une surface d'or, durant des expériences s'étalant sur plusieurs heures, sans pour autant voir la disparition de chaînes Fc-PEG ancrées à la sonde AFM-SECM. En revanche, au cours d'autres expériences, nous avons constaté soit un signal en force et en courant non persistant qui disparaissait au fur et à mesure de l'enregistrement des courbes d'approche, soit une absence de réponse en force et en courant dès la première approche en AFM-SECM.

Ces observations laissent à penser dans le premier cas à un *relargage*, c'est à dire à une perte progressive des chaînes au fur et à mesure des courbes d'approche ou, dans le second cas à un échec du *procédé de greffage*.

On a donc un phénomène d'irreproductibilité qu'il nous faut résoudre avant de poursuivre notre étude, car le développement de la microscopie implique que nous soyons capable de reproduire le greffage des chaînes Fc-PEG sur sonde combinée AFM-SECM de façon fiable.

Plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce phénomène d'irreproductibilité peuvent être avancées.

2 Les sources d'irreproductibilité

2.1 Existe t-il un phénomène de relargage spontané des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM ?

Lors de manipulation en AFM-SECM, nous avons pu observer que parfois, les chaînes Fc-PEG ancrées sur pointe AFM-SECM, disparaissaient au fur et à mesure des courbes d'approche sans même avoir polariser la pointe Fc-PEGylée ou la surface d'or plane. En effet, les courbes d'approche enregistrées uniquement en force finissaient, au fur et à mesure des approches en AFM-SECM, par ressembler à celle observée lors de l'approche d'une pointe d'or *nue* sur une surface d'or *nue*, c'est à dire marquées par la présence d'interactions attractive or-or (mise en évidence par un « jump to contact »).

Nous avons donc pensé, en première explication, à un relargage spontané assez rapide à l'échelle de la manipulation en AFM-SECM, des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM. Ce relargage pourrait être dû à la faiblesse de la liaison thiol-or ce qui pose alors la question de la stabilité au stockage de nos pointes Fc-PEGylées.

Cependant, il semble peu probable que ce relargage spontané ait lieu car nous avons vu précédemment dans le chapitre traitant des surfaces Fc-PEGylées que les couches de chaînes Fc-PEG présentaient une bonne stabilité au stockage sur surface d'or pelé. En effet, pour ces surfaces, nous avons pu estimer par voltammétrie cyclique que seulement 15% des chaînes Fc-PEG étaient relarguées, après 16 heures de stockage sous atmosphère inerte dans de l'eau milliQ.

En revanche, la disparition des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM ayant été observée à la suite de l'approche de surface d'or plane, nous avons alors émis une autre hypothèse discutée ci-dessous.

2.2 Existe t-il un phénomène de transfert des chaînes de la pointe AFM-SECM vers la surface par contact ?

En seconde explication, pour tenter d'apporter une réponse à la disparition progressive des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe lors de l'approche d'une surface d'or plane, nous avons suspecté un détachement des chaînes par rupture de la liaison thiol-or et reformation de cette même liaison covalente avec les atomes d'or de la surface pelée (Figure 50).

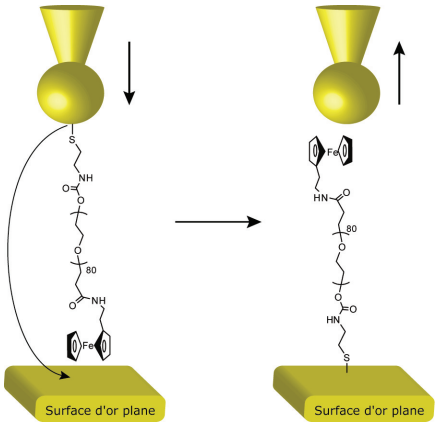


Figure 50 : Schéma représentant le transfert de chaînes Fc-PEG de la pointe AFM-SECM à la surface d'or plane lors du contact des deux surfaces en AFM-SECM.

Ce transfert de chaînes peut vraisemblablement avoir lieu au cours des temps d'attente entre les approches lorsque la pointe est immobile et en contact avec la surface d'or plane.

Pour tenter de minimiser ce transfert des chaînes Fc-PEG entre la pointe AFM-SECM et le substrat, on a alors changé la nature de la surface en privilégiant le HOPG, car ce type de surface carbonée ne permet normalement pas le greffage des thiols à sa surface.

Hors, même en utilisant ce type de substrat, les phénomènes de perte de chaînes sur la pointe ont persisté pour une partie des manipulations réalisées, laissant à penser que même si le transfert des chaînes de la sonde AFM-SECM vers le substrat peut exister, il ne peut pour autant être l'unique cause de la perte des chaînes constatée.

Incidemment, au cours des manipulations présentant des pointes Fc-PEGylées suffisamment stable, on a pu remarquer que les courbes d'approche en force et en courant sont similaires sur surface de HOPG et sur surface d'or plane.

2.3 La sonde subit-elle des chocs « électriques » ?

Après avoir fonctionnalisé la pointe AFM-SECM par le greffage de la cystéamine et le couplage du Fc-PEG-NHS, nous avons parfois observé que l'enregistrement des courbes d'approche en force et en courant révélait immédiatement l'absence de chaînes ancrées à la pointe AFM-SECM.

Ce type de sonde AFM-SECM offre une surface de greffage extrêmement restreinte comparée aux surfaces d'or planes macroscopiques qui ont été utilisées précédemment, lors d'études préliminaires.

Compte tenu de ces observations, nous avons soupçonné la présence de chocs « électriques » induits par l'électronique du bipotentiostat qui pourraient provoquer un relargage des chaînes Fc-PEG ancrées à la pointe AFM-SECM. Ces chocs « électriques » pourraient par exemple correspondre à une brusque variation du potentiel appliqué à la pointe Fc-PEGylée, ou être d'une autre origine mais se traduire par des pics de courant de pointe.

Si pour le potentiel, aucune variation n'a pu être détectée, en revanche, le courant mesuré, échantillonné à haute fréquence fait apparaître des pics résultant peut-être de « saute de tension » dans le réseau 50 Hz par lequel est alimenté l'appareillage. Ces variations de courant aggravées par « effet de pointe » peuvent donc traduire des chocs « électriques » ayant lieu avant même d'avoir engager une approche de la sonde Fc-PEGylée sur la surface d'or plane.

Il est par conséquent prévu de doter l'appareillage d'un onduleur ou d'une alimentation interne continue permettant de limiter les variations de tensions brutales du réseau électrique. En outre, nous avons également mis en place un certain nombre de précautions qui consistent notamment, à manipuler

les sondes Fc-PEGylée tout en étant constamment relié à la masse pour éviter toute décharge électrostatique lors du montage de la pointe Fc-PEGylée sur la tête du microscope à force atomique.

2.4 La première étape du procédé de greffage effectuée en « aveugle » échoue t-elle ?

Au niveau du greffage, il est difficile de savoir avant le montage en AFM si les chaînes Fc-PEG ont bien été immobilisées à la pointe AFM-SECM.

En effet, le greffage nécessite 2 étapes, dont la première, l'adsorption de la cystéamine est réalisée en « aveugle ». On pourrait envisager de détecter la cystéamine ancrée sur la sonde en AFM-SECM, mais cette molécule est électro-inactive et de taille trop réduite pour cela.

Or le greffage de la monocouche de cystéamine est une étape déterminante car elle permet ensuite l'ancrage des chaînes Fc-PEG-NHS par couplage covalent.

Etant alors conscient de ce problème et compte tenu de la complexité du greffage réalisé en deux étapes de plusieurs heures, le passage à une fonctionnalisation de nos pointes AFM-SECM en une seule étape fut envisagée.

L'objectif ici est donc de simplifier le greffage et d'éviter toutes incertitudes sur la première étape de formation du point d'ancrage. Pour cela, une nouvelle molécule fut alors synthétisée au sein de l'équipe.

3 Greffage simplifié en une seule étape : Fonctionnalisation de la sonde par une nouvelle molécule, le Fc-PEG-disulfure

Le passage à une molécule Fc-PEG-disulfure résultant d'un pré-couplage du Fc-PEG-NHS et de la cystamine, simplifie grandement la mise en oeuvre de la fonctionnalisation de pointe AFM-SECM. Après la présentation de la molécule, les différentes étapes de validation de l'usage de cette molécule sont exposées ci-dessous.

3.1 Présentation de la molécule et du procédé de greffage

La molécule de *bis* alkyl ferrocène poly(éthylène glycol) disulfure, notée Fc-PEG-SS est issue du couplage en solution de la cystamine et du Fc-PEG-NHS (Figure 51).

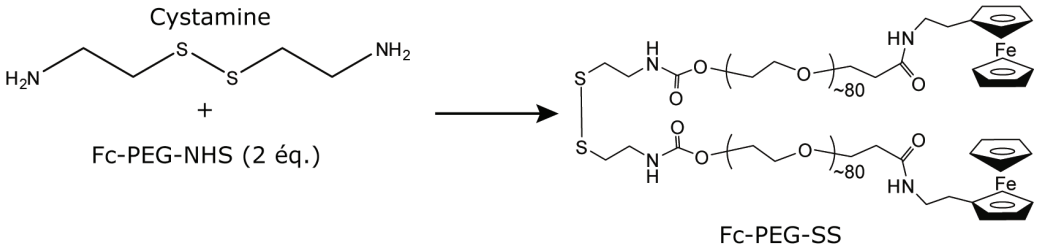


Figure 51 : Couplage entre la cystamine et le Fc-PEG-NHS afin d'obtenir le Fc-PEG-SS dont la formule semi-développée est présentée ici.

La molécule de Fc-PEG-SS présente un pont disulfure reliant deux chaînes Fc-PEG, et assurant un ancrage potentiellement plus stable avec une surface d'or qu'un simple groupement thiol.

De plus, cette molécule de Fc-PEG-SS permet un greffage simplifié en une seule étape. Pour cela, il suffit de dissoudre le composé à une concentration de 0,55 mM dans de l'eau milliQ et de mettre en contact la solution avec la surface d'or à fonctionnaliser durant 2 heures sous atmosphère inerte d'argon (ou d'azote). La désorption des chaînes faiblement liées à la sonde est ensuite réalisée par rinçage, en immergeant l'extrémité de la pointe AFM-SECM dans l'eau milliQ durant 10 minutes en fin de greffage.

3.2 Caractérisation et stabilité de la couche de Fc-PEG obtenue par greffage du Fc-PEG-SS

Afin de valider l'emploi de la nouvelle molécule Fc-PEG-SS, nous nous sommes intéressés à la stabilité et à la structure de la couche Fc-PEG portée par des surfaces d'or de nature et de géométries différentes.

3.2.1 Greffage du Fc-PEG-SS sur microélectrode d'or : stabilité au stockage de la couche de Fc-PEG

Pour cette étude, la surface d'or considérée est celle de microélectrodes réalisées au laboratoire en enrobant un fil d'or polycristallin de 500 µm de diamètre dans du polypropylène fondu. L'extrémité des microélectrodes est ensuite finement polie sur disque abrasif puis sur draps de polissage avec des poudres d'alumine de différentes granulométries, afin d'obtenir une électrode disque plan de faible rugosité.

Ces microélectrodes présentent les avantages d'être immédiatement disponibles, resurfaçables par simple polissage et surtout d'offrir une surface effective suffisamment grande pour permettre la détection de la couche de Fc-PEG par voltammétrie cyclique. En outre, comme nos sondes AFM-SECM, ces microélectrodes sont également constituées d'or polycristallin permettant de

croire que les résultats obtenus avec ces électrodes soient raisonnablement transposable à nos sondes AFM-SECM. Pour toutes ces raisons, ces microélectrodes constituent donc de bonnes électrodes de comparaison avec nos sondes AFM-SECM.

Les microélectrodes d'or sont greffées grâce au Fc-PEG-SS, selon le protocole précédemment décrit et sont ensuite caractérisées par voltammétrie cyclique à 100 V/s dans une solution électrolytique de $NaClO_4$ à 1 M (Figure 52).

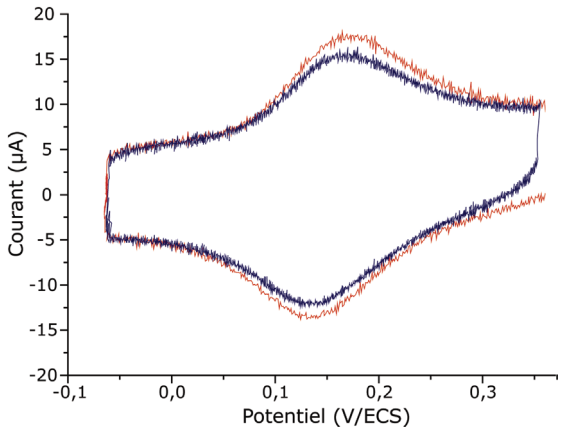


Figure 52 : Stabilité au stockage évaluée par voltammétrie cyclique d'une monocouche de Fc-PEG assemblée par adsorption de Fc-PEG-SS sur microélectrode d'or. En rouge, le voltammogramme enregistré immédiatement après le greffage. En bleu, le voltammogramme enregistré après 16 heures de stockage dans l'eau de pureté milliQ. Le balayage en potentiel de l'électrode est effectué de –0,05 à 0,35 V/ECS à 100 V/s dans une solution électrolytique de $NaClO_4$ à 1 M. Concentration surfacique en chaînes Fc-PEG-SS sur la microélectrode à t = 0 : $1{,}1.10^{-11}$ mol/cm², et à t = 16 h : $1{,}0.10^{-11}$ mol/cm².

L'intégration du pic anodique ou cathodique du voltammogramme présenté en Figure 52, courbe rouge, permet après détermination de la surface effective de la microélectrode, de calculer la concentration surfacique en chaînes Fc-PEG ancrée à la surface d'or électroactive qui est de $1{,}1.10^{-11}$ mol/cm² immédiatement après l'étape de greffage. On note que sur l'ensemble des microélectrodes d'or fonctionnalisées par le Fc-PEG-SS, les concentrations surfaciques typiquement observées sont de l'ordre de 0,9 à $1{,}3.10^{-11}$ mol/cm².

Comme on peut le voir sur la Figure 52, la moyenne entre les potentiels de pics anodique et cathodique est de 0,15 V/ECS, ce qui correspond au potentiel standard des têtes ferrocènes portées par des chaînes PEG. On s'aperçoit donc que l'ancrage de la chaîne Fc-PEG par adsorption de Fc-PEG-SS n'influence pas le potentiel standard des têtes ferrocènes qui est similaire à celui mesuré pour une couche de Fc-PEG préparée par la technique en deux étapes.

Après 16 heures de stockage immergée dans de l'eau milliQ sous atmosphère inerte, seule une perte en chaînes Fc-PEG ancrées sur la microélectrode d'environ 10 % a pu être constatée.

Ainsi nous avons démontré sur microélectrode d'or polycristalline, que cette molécule de Fc-PEG-SS permet un greffage en une étape unique pour former une couche de Fc-PEG d'excellente stabilité durant le stockage. Avec l'emploi de cette nouvelle molécule, on a donc certainement encore limité une des causes possibles de l'irreproductibilité qu'on avait pu constater à savoir un éventuelle relargage spontané des chaînes dû à une faiblesse de l'affinité thiol-or, dans des temps comparables à la durée des expériences AFM-SECM.

3.2.2 Greffage du Fc-PEG-SS sur surface d'or pelée : comparaison des techniques d'adsorption en une ou deux étapes

Afin de pouvoir comparer en AFM-SECM, les couches de Fc-PEG ancrées sur surface d'or plane formée par les techniques de greffage à une ou deux étapes, on approche une pointe AFM-SECM d'une surface Fc-PEGylée réalisée par l'adsorption du Fc-PEG-SS. Les courbes d'approche en force et en courant ainsi obtenues sont présentées en Figure 53.

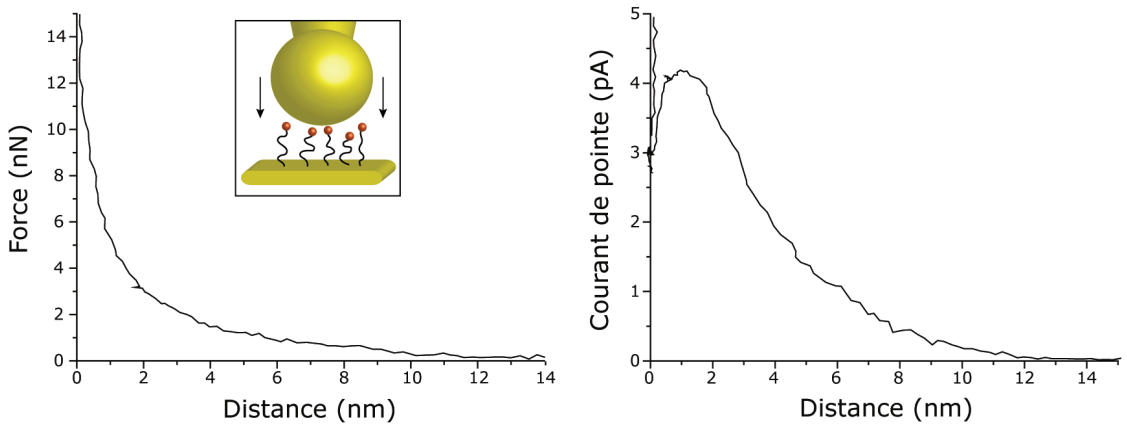


Figure 53 : Courbes d'approche en force (à gauche) et en courant (à droite) enregistrées lorsqu'une pointe AFM-SECM est approchée d'une surface d'or Fc-PEGylée obtenue par adsorption du Fc-PEG-SS. Potentiel appliqué : $E_{surface}$ = -0,1 V/ECS, E_{pointe} = 0,3 V/ECS. Milieu : aqueux contenant $NaClO_4$ 1 M.

Comme on peut le voir sur la Figure 53, les courbes d'approche en force et en courant enregistrées en approchant une pointe AFM-SECM d'une surface Fc-PEGylée fonctionnalisée en une seule étape par l'adsorption du Fc-PEG-SS est semblable à celle enregistrée avec une couche de Fc-PEG assemblée en deux étapes (voir Figure 39). On peut donc en conclure en AFM-SECM,

que la structure et la réactivité électrochimique de la couche de Fc-PEG formée par l'une ou l'autre des techniques de greffage est similaire.

4 Identification des facteurs d'instabilité – Les précautions

La manipulation des sondes Fc-PEGylées expose la couche de chaînes Fc-PEG à un certain nombre de stimuli externes spécifiques pouvant provoquer la perte des chaînes.

Afin d'identifier ces stimuli nous avons fonctionnalisé des modèles de sonde AFM-SECM par des chaînes Fc-PEG-SS, et leur avons fait subir les différentes manipulations propres à l'usage des sondes Fc-PEGylées. Ces modèles de sondes AFM-SECM sont totalement semblables aux sondes Fc-PEGylées auxquelles nous souhaitons aboutir à cela près qu'elles ne sont pas recouvertes du film de peinture isolante. Ainsi, nous pouvons fonctionnaliser par des chaînes Fc-PEG l'extrémité conique de la sonde AFM-SECM non peinte sur une hauteur suffisante pour pouvoir quantifier et suivre l'évolution de la couverture en chaîne Fc-PEG par simple voltammétrie cyclique.

Le protocole de fonctionnalisation des pointes AFM-SECM non peintes utilisant le Fc-PEG-SS reste inchangée par rapport au procédé de greffage sur microélectrode.

On précise que ces pointes AFM-SECM non peintes ne peuvent pas être utilisées en microscopie électrochimique car le courant de fuite serait trop intense pour permettre la mesure du courant faradique spécifique des chaînes Fc-PEG.

Une succession de manipulations similaires à celles exécutées avec une pointe Fc-PEGylée classique sont réalisées avec une pointe Fc-PEGylée non peinte. Entre chaque étape significative, on effectue une voltammétrie cyclique de la pointe Fc-PEGylée non peinte dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M de – 0,05 à 0,35 V/ECS à 2 V/s. L'intégration du pic anodique ou cathodique permet ensuite d'évaluer la quantité de chaînes Fc-PEG-SS perdues à chaque étape (Tableau 1).

Manipulations réalisées sur la pointe Fc-PEGylée non peinte correspondant aux conditions réelles d'utilisation	**Pourcentage de perte évaluée en chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM non peintes**
Rinçage vigoureux par projection d'eau milliQ sur la pointe	40 %
Séchage de la pointe entre les étapes de greffage et de montage en AFM	20 - 25 %
Montage en AFM, immersion dans la cellule électrochimique contenant du $NaClO_4$ à 1 M et démontage	6 - 7 %
Stockage dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M durant 10 minutes	5 - 6 %
Rinçage par immersion dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M	2 %
Stockage dans une enceinte dont l'atmosphère est saturée d'humidité durant 10 minutes	4 %

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des manipulations réalisées sur pointes AFM-SECM non peintes fonctionnalisées à l'extrémité par la molécule de Fc-PEG-SS et des pertes éventuelles consécutives.

Comme on peut le voir sur le Tableau 1, la principale cause de la perte de chaînes Fc-PEG à la surface de la pointe AFM-SECM non peintes, hormis un rinçage par projection violente d'eau milliQ (facilement contournable), est le séchage de l'extrémité de la pointe.

Il a pu être estimé qu'environ 20 à 25% des chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe disparaissent au cours du séchage, lors du transport de la pointe Fc-PEGylée de l'enceinte de greffage vers le microscope AFM-SECM. Pour tenter de réduire ces pertes de chaînes, nous avons donc pris des précautions au niveau du transport de la pointe Fc-PEGylée qui est désormais complètement effectué sous atmosphère inerte saturée d'humidité. On peut d'ailleurs remarquer dans le Tableau 1, que cette mesure améliore la stabilité des chaînes Fc-PEG ancrées à la pointe AFM-SECM non peintes, puisque seulement 4 % de perte est désormais enregistré.

Enfin, nous avons mis en place un protocole de montage de la pointe Fc-PEGylée plus rapide pour réduire au mieux le temps passé à l'air ambiant et tenter de minimiser la perte de chaînes durant cette étape.

En outre, au vue des résultats de cette étude, nous avons également entrepris une réflexion sur de nouvelles améliorations apportées à l'enceinte utilisée pour le greffage des pointes AFM-SECM afin de réduire au maximum son ouverture, réduisant du même coup l'exposition des pointes Fc-PEGylée à l'air ambiant.

Cette étude a donc permis de mettre en avant la fragilité de la couche de Fc-PEG vis à vis du séchage de la surface d'ancrage. Cette effet délétère du séchage était précédemment passé inaperçu car les surfaces dérivatisées auparavant (or pelé, microélectrode) ne restaient que très peu de temps à l'air libre et ne séchaient jamais.

5 Greffage du Fc-PEG-disulfure sur pointe AFM-SECM : Validation de l'emploi de cette molécule pour la production de sonde Fc-PEGylée

Cette dernière étape a pour objectif de valider l'emploi de la molécule Fc-PEG-SS pour produire des sondes Fc-PEGylées. Le greffage est réalisé comme précédemment par mise en contact de 40 µL de solution aqueuse de Fc-PEG-SS à 0,55 mM par formation d'une goutte dans laquelle vient plonger l'extrémité de la pointe AFM-SECM. Le temps d'immersion reste inchangé et dure 2 heures avec 10 minutes de rinçage dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M. Le transfert et le montage de la pointe Fc-PEGylée sont effectués suivant les précautions décrites au paragraphe précédent.

Ensuite, si l'on approche une pointe AFM-SECM fonctionnalisée par le Fc-PEG-SS, d'une surface d'or plane, il est alors possible d'enregistrer les courbes d'approche en force et en courant présentées en Figure 54.

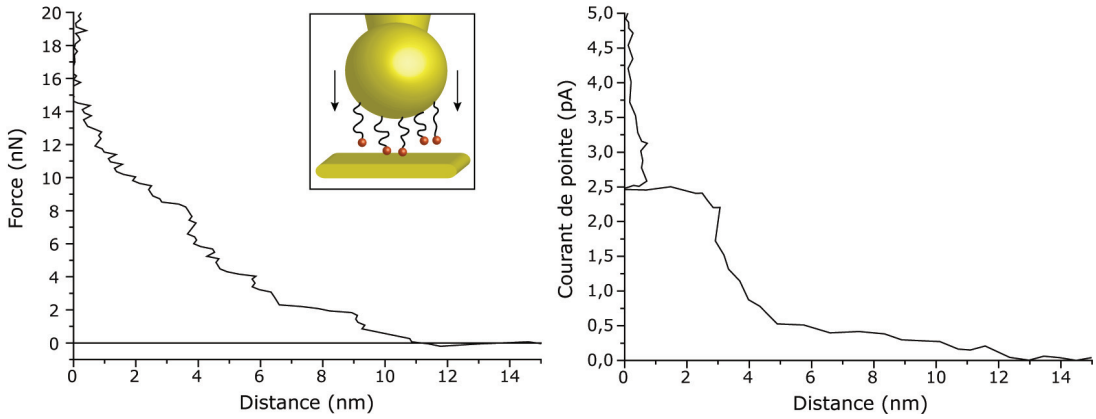


Figure 54 : Courbes d'approche en force (à gauche) et en courant (à droite) enregistrées lorsqu'une pointe Fc-PEGylée formée par adsorption de Fc-PEG-SS, est approchée d'une surface d'or plane. Potentiel appliqué : $E_{surface}$ = -0,1 V/ECS, E_{pointe} = 0,3 V/ECS. Milieu : aqueux contenant $NaClO_4$ 1 M.

Comme on peut le voir sur la Figure 54, on s'aperçoit que les courbes d'approche en force et en courant obtenues sont similaires à celles décrites précédemment dans le cas de pointe Fc-PEGylée fonctionnalisée par un ancrage thiol (Figure 43 et Figure 44).

De plus, nous avons pu noter que la couche de Fc-PEG-SS immobilisée à l'extrémité de la pointe AFM-SECM est beaucoup plus stable durant son utilisation en microscopie, que les précédentes à un seul point d'ancrage.

En outre, même si l'on vient à faire une manipulation malencontreuse qui engendre la perte des chaînes Fc-PEG ancrées sur la sonde AFM-SECM, le

regreffage du Fc-PEG-SS est tellement simple et rapide qu'il permet aisément de fonctionnaliser à nouveau la même pointe AFM-SECM dans la même journée et de réaliser une nouvelle approche sur un substrat. Ce regreffage nécessite simplement le décapage de la pointe AFM-SECM par voltammétrie cyclique de 0,30 V à 1,85 V/ECS à 2 V/s dans H_2SO_4 à 0,5 M durant environ 15 cycles, puis de replonger l'extrémité de la sonde AFM-SECM vierge dans la solution de Fc-PEG-SS à 0,55 mM durant 2 heures.

6 Conclusions

Nous avons consacré beaucoup de temps à fiabiliser chacune des étapes de la préparation des sondes Fc-PEGylée ainsi qu'à identifier les précautions à prendre pour manipuler nos pointes à médiateur lié. Après de multiples innovations, nous avons pu aboutir à la production en routine de pointes AFM-SECM Fc-PEGylées suffisamment stables et robustes pour permettre d'envisager « sans crainte » l'étude de différents substrats.

Le problème de la robustesse de la couche de Fc-PEG greffée à l'extrémité des sondes AFM-SECM va se poser de manière encore plus aiguë maintenant que nous allons aborder l'usage des sondes Fc-PEGylées pour l'imagerie d'un substrat.

En particulier, le mode contact utilisé jusqu'ici pour nos approches sur substrat, s'il est idéal pour la caractérisation des sondes Fc-PEGylées, peut toutefois être difficile à mettre en œuvre pour l'imagerie de substrat. En effet, l'imagerie implique de balayer le substrat à l'aide d'une pointe Fc-PEGylée, mais les frottements s'exerçant entre la pointe Fc-PEGylée et la surface peuvent arracher des chaînes. De plus, l'imagerie peut également créer des micros court-circuit entre la pointe Fc-PEGylée et le substrat à chaque contact entre les deux électrodes.

Afin de pouvoir développer notre nouveau mode de microscopie à médiateur lié à la sonde, nous nous sommes donc intéressés à des modes d'utilisation de l'AFM permettant de minimiser le contact sonde-substrat.

Microscopie AFM-SECM en mode tapping avec une pointe Fc-PEGylée

1 Comment utiliser une sonde Fc-PEGylée pour imager un substrat ? Vers l'utilisation du mode tapping

2 Utilisation du mode tapping en AFM-SECM

2.1 Fonctionnement et intérêt de la microscopie AFM en mode tapping. Généralités

2.2 Spécificité de l'utilisation de sondes Fc-PEGylées en mode tapping

3 Réponse en amplitude et en courant d'une sonde Fc-PEGylée amenée en mode tapping au voisinage d'un substrat d'HOPG

3.1 Courbes d'approche en amplitude et en courant enregistrées en mode tapping avec une sonde Fc-PEGylée

3.2 Enregistrement d'un courant à la pointe Fc-PEGylée à une distance constante du substrat : mesure directe d'un voltammogramme *ipointe* versus *Esubstrat*

4 Imagerie topographique et électrochimique d'un substrat de HOPG en mode tapping avec une sonde Fc-PEGylée

4.1 Topographie de la surface de HOPG sondée par une pointe Fc-PEGylée

4.2 Acquisition de l'image en courant simultanée à la topographie

4.3 Spécificités de la surface de HOPG

4.4 Estimation de la résolution latérale électrochimique de la sonde Fc-PEGylée

5 Conclusions

1 Comment utiliser une sonde Fc-PEGylée pour imager un substrat ? Vers l'utilisation du mode tapping

La microscopie AFM-SECM à médiateur rédox lié à la sonde qu'on se propose de développer implique de pouvoir balayer un substrat avec une pointe Fc-PEGylée *tout en maintenant une distance constante entre la pointe et le substrat*, éventuellement porteur d'enzymes ou d'autres molécules biologiques fragiles.

De plus, la distance doit être telle que les chaînes puissent efficacement échanger des électrons entre la pointe et le substrat, c'est à dire qu'un courant faradique soit mesuré. Sur les courbes d'approche en courant typique de chaînes Fc-PEG greffées sur pointe AFM-SECM, enregistrées en mode contact, on a pu déterminer qu'une distance inférieure à 12 nm est nécessaire pour commencer à détecter les chaînes Fc-PEG. Mais, on a également observé qu'une distance supérieure à 3 nm s'impose pour limiter les interférences dues à l'effet tunnel, ainsi que le contact prématuré de la pointe avec le substrat (voir Figure 44, courbe rouge).

Pour maintenir la distance sonde-substrat constante, et dans cet intervalle, on pourrait penser à utiliser le signal de déflection de la pointe résultant des interactions répulsives des chaînes PEG, observées pour $d < 6$ nm, comme valeur de consigne de la boucle d'asservissement. Ceci aurait pour effet de maintenir la pointe en contact avec la surface, comme on peut le faire pour imager une surface en mode contact. Toutefois, on peut voir que cela imposerait d'utiliser une force correspondant à environ 5 nN en magnitude. En considérant, une constante de raideur typique du bras flexible des pointes AFM-SECM de l'ordre de 1 à 3 nN/nm, et pour une sensibilité de mesure de la position du détecteur d'environ 5 à 10 mV/nm, cela reviendrait à imposer une valeur de la déflection de consigne de l'ordre de 10 à 50 mV. Cependant, une dérive du signal de déflection a souvent lieu en raison de l'effet bilame induit par les différences de propriétés thermiques des matériaux composant la sonde AFM-SECM. Aussi, l'expérience nous montre qu'une valeur du signal de consigne d'au moins 1 V est nécessaire pour réaliser une image du substrat. Il semble donc évident qu'il est impossible d'appliquer seulement 10 à 50 mV de signal de consigne à la boucle d'asservissement dans le but d'utiliser une pointe Fc-PEGylée pour réaliser une image du substrat.

On pourrait également envisager d'utiliser la technique de « lift mode » qui consiste à enregistrer la topographie de la surface, puis à reculer la pointe AFM et à repasser sur la surface à la distance souhaitée en suivant la topographie déjà enregistrée. Mais cette dernière technique nécessite de reculer la pointe de la distance choisi, c'est à dire d'environ 4 à 5 nm auquel on doit ajou-

ter un recul supplémentaire de 100 nm correspondant au 1 V (avec une sensibilité de mesure de la position du détecteur d'environ 10 mV/nm) appliqué pour maintenir la pointe en contact avec la surface. On voit donc que cette technique n'est pas non plus envisageable, puisque la dérive du signal en déflection et l'hystérésis du piézoélectrique, ne permettrait pas de repositionner la pointe à une distance aussi précise que 4 à 5 nm quand le piézoélectrique a déjà reculé de 100 nm, et de garder constante la distance entre la pointe et la surface tout au long de l'imagerie.

Ainsi, nous nous sommes tournés vers le mode « tapping » de l'AFM, et avons vérifié que l'emploi de ce mode avec une sonde Fc-PEGylée permet bien d'imager simultanément la topographie d'un substrat et sa réactivité électrochimique.

2 Utilisation du mode tapping en AFM-SECM

2.1 Fonctionnement et intérêt de la microscopie AFM en mode tapping. Généralités

En mode tapping, l'action mécanique d'un piézoélectrique excite la sonde AFM qui oscille alors à une fréquence définie. Le détecteur photosensible mesure ensuite, via la réflexion du laser sur le bras flexible, l'amplitude d'oscillation de la sonde AFM (Figure 55). [1]

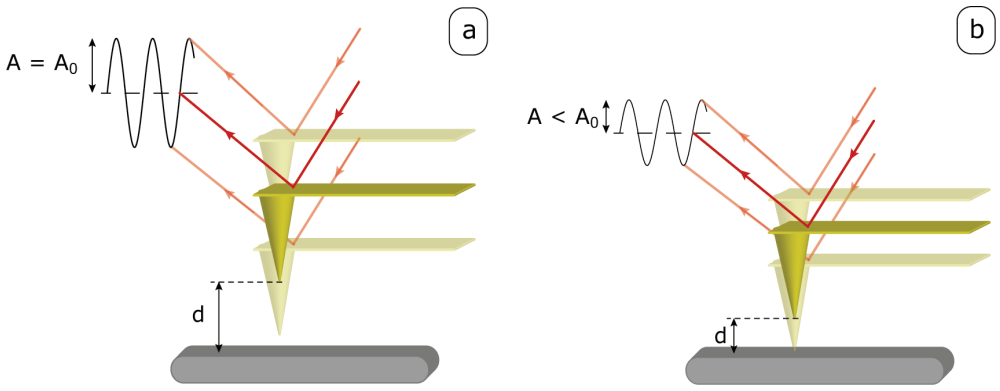


Figure 55 : Représentation schématique de la variation d'amplitude d'oscillation, A, d'une sonde AFM lors de l'approche d'un substrat. (a) La pointe AFM oscille loin de toute interaction avec la surface à l'amplitude libre A_0. (b) La pointe AFM interagit avec le substrat, ce qui a pour conséquence d'amortir l'amplitude d'oscillation de la sonde. L'amplitude de consigne permet, grâce à la boucle d'asservissement qui contrôle le piézoélectrique, de maintenir la pointe AFM à une distance moyenne d constante.

Comme on peut le voir sur la Figure 55a, lorsque la sonde AFM est placée loin de toute interaction avec le substrat, la sonde oscille librement à *l'amplitude libre d'oscillation* A_0.

En revanche, quand la pointe AFM s'approche de la surface, l'on observe un amortissement de l'amplitude d'oscillation, A, résultant des interactions sonde-substrat (Figure 55b). Il est donc possible de maintenir constante la distance moyenne entre la pointe AFM et le substrat en gardant l'amplitude d'oscillation de la pointe à un seuil, *l'amplitude de consigne*. Cette amplitude de consigne est maintenue constante grâce à la boucle d'asservissement qui contrôle l'élongation du piézoélectrique.

En imagerie, la sonde oscillante est balayée au dessus de la surface. En enregistrant la variation de longueur du tube piézoélectrique (Z_{piezo}) portant la pointe Fc-PEGylée, nécessaire pour maintenir en tout point l'amplitude de consigne, on obtient alors une image topographique de la surface.

On peut également acquérir des courbes d'approche consistant à porter l'amplitude d'oscillation de la sonde et éventuellement d'autres paramètres acquis simultanément en fonction de la distance sonde-substrat.

En mode tapping, le contact intermittent de la sonde AFM avec le substrat, minimise les interactions sonde-substrat et en particulier les forces de friction latérale lors de l'imagerie d'un substrat. Par conséquent, ce mode d'utilisation de l'AFM est souvent utilisé pour l'étude de molécules biologiques immobilisées et, également employé pour la caractérisation structurale de couches moléculaires auto-assemblées sur surface.[2]

2.2 Spécificité de l'utilisation de sondes Fc-PEGylées en mode tapping

2.2.1 Spectre d'excitation des sondes AFM-SECM

Pour déterminer une fréquence d'excitation permettant l'utilisation de nos sondes AFM-SECM en mode tapping, on fait osciller la pointe AFM-SECM, loin de la surface. La gamme de fréquence d'excitation balayée est choisi proche de la fréquence de résonance f_0 « théorique » estimée pour nos pointes, d'environ 1,5 kHz, qu'il est possible de calculer par l'équation suivante :

$$f_0 = 324e / L^2$$

où e est l'épaisseur du bras flexible de la sonde AFM-SECM et L, sa longueur.

On peut par exemple, balayer la fréquence d'excitation imposée au bras flexible de 0,02 à 10 kHz. Un spectre typique de l'amplitude d'oscillation enregistrée en fonction de la fréquence d'excitation pour une sonde AFM-SECM est présenté en Figure 56.

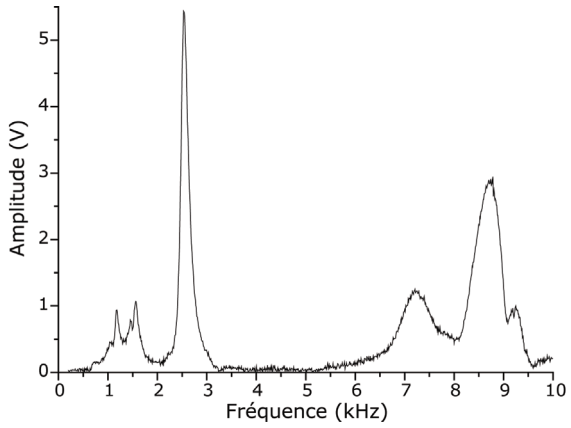


Figure 56 : Spectre d'oscillation d'une sonde AFM-SECM. L'amplitude d'oscillation de la sonde est portée en fonction de la fréquence d'excitation de 0,02 à 10 kHz, hors de toute interaction avec le substrat. Milieu expérimental : solution aqueuse de $NaClO_4$ 1 M.

Comme on peut le voir sur la Figure 56, l'excitation du bras flexible se traduit par l'apparition d'une multitude de pics de résonance dans la gamme de fréquences balayées.

La fréquence d'excitation employée pour approcher une sonde AFM-SECM d'un substrat est sélectionnée empiriquement. En pratique, nous choisissons une fréquence d'excitation correspondant soit au pic visible à environ 1 kHz, soit à celui situé vers 8-9 kHz.

Comme on peut le voir sur Figure 56, les fréquences d'excitations que nous utilisons en AFM-SECM ne sont donc pas forcément les fréquences fournissant les amplitudes d'oscillation les plus importantes. Mais au cours de multiples expériences, nous avons pu remarquer que ces fréquences permettent des conditions d'asservissement plus stables favorisant ainsi le maintien de la pointe AFM-SECM à une distance sonde-substrat constante.

Pour les fréquences considérées, l'amplitude libre d'oscillation A_0 mesurée pour nos sondes AFM-SECM est d'environ 5 à 10 nm.

2.2.2 Spécificité de l'approche d'une sonde Fc-PEGylée d'un substrat en mode tapping

En mode tapping, lors de l'approche d'une pointe Fc-PEGylée vers un substrat, nous enregistrons deux paramètres simultanément :

- L'amplitude d'oscillation du bras flexible au fur et à mesure de l'approche de la pointe Fc-PEGylée sur la surface plane,
- et, le courant mesuré à la sonde Fc-PEGylée.

Les deux composantes (amplitude et courant) sont enregistrées simultanément en fonction de Z_{piezo}, l'élongation du piézoélectrique.

De façon similaire au mode contact, pour mieux comprendre les phénomènes observés, les courbes d'approche sont retracées en fonction de la distance *d* moyennée séparant la pointe du substrat (Figure 57).

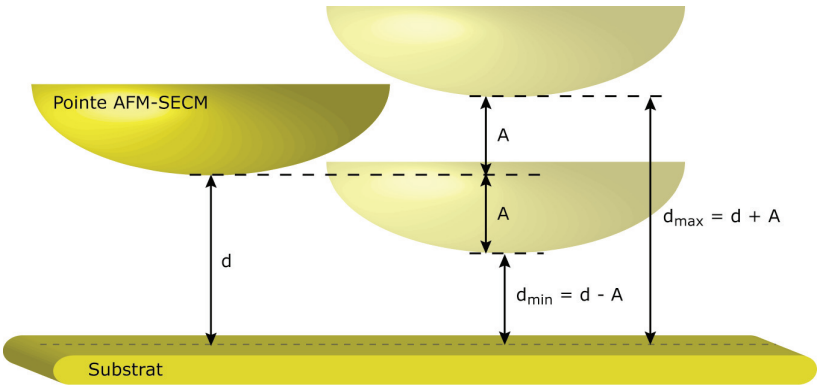


Figure 57 : Représentation schématique de l'oscillation d'une pointe AFM-SECM au dessus d'un substrat à une distance moyenne *d*. Compte tenu de l'oscillation de la pointe Fc-PEGylée à une amplitude *A*, on peut donc définir deux distances instantanées : $d_{max} = d + A$ et $d_{min} = d - A$.

Comme on peut le voir sur la Figure 57, en mode tapping, la pointe AFM-SECM oscille symétriquement d'une amplitude *A*, autour de la distance pointe-substrat, *d*, calculée à partir de l'élongation du piézoélectrique, Z_{piezo}, selon la formule déjà utilisée en mode contact :

$$d = Z_{piezo} + Z_0$$

où l'on rappelle que Z_0 est l'élongation du piezo lorsque la pointe entre en contact dur avec le substrat (identifiée, par exemple, lors du court-circuit entre la sonde et le substrat).

A la différence du mode contact, en mode tapping, cette distance *d* est *moyennée* car la pointe AFM-SECM oscille en permanence. Par conséquent, il faut garder à l'esprit que la distance instantanée pointe-substrat varie périodiquement entre la distance maximum $d_{\max} = d + A$ et la distance minimum $d_{\min} = d - A$, comme on peut le voir schématisé sur la Figure 57.

3 Réponse en amplitude et en courant d'une sonde Fc-PEGylée amenée en mode tapping au voisinage d'un substrat d'HOPG

Pour la mise au point et la caractérisation de nos sondes Fc-PEGylée en mode tapping, on a préféré utiliser une surface de HOPG fraîchement pelée à une surface d'or. En effet, ce type de surface carbonée présente une structure beaucoup plus plane, reproductible et, mieux définie qu'une surface d'or.

3.1 Courbes d'approche en amplitude et en courant enregistrées en mode tapping avec une sonde Fc-PEGylée

Durant l'approche de la sonde Fc-PEGylée vers le substrat de HOPG, on applique un potentiel à la pointe et au substrat, respectivement E_{pointe} = 0,3 V/ECS et $E_{substrat}$ = -0,1 V/ECS.

Les courbes d'approche enregistrées selon ces conditions, en mode tapping, en amplitude et en courant sont présentées en Figure 58. On précise qu'ici, seules les courbes d'approche sont représentées, les courbes en rétraction étant similaires.

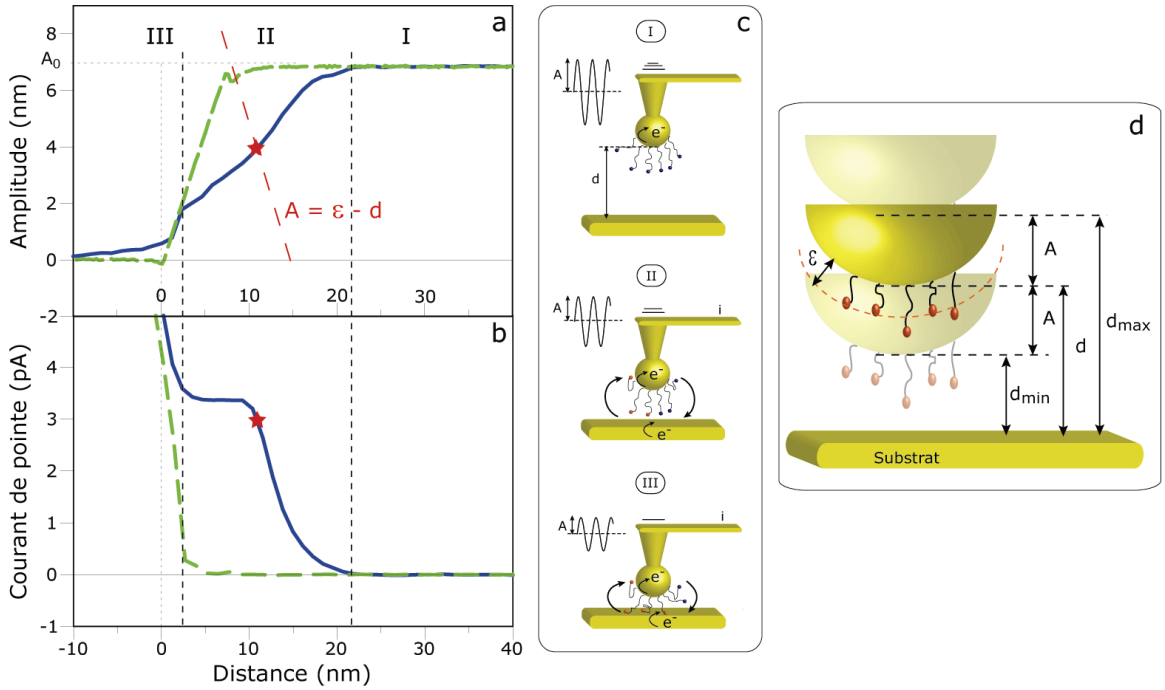


Figure 58 : Microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde. Courbes d'approche en amplitude (a) et en courant (b) enregistrées simultanément en mode tapping. Les courbes en bleu, correspondent à l'approche d'une sonde Fc-PEGylée sur substrat de HOPG. Les courbes en vert, correspondent à l'approche d'une sonde AFM-SECM nue sur substrat de HOPG. A_0 est l'amplitude libre d'oscillation obtenue lorsque la pointe Fc-PEGylée oscille loin de toutes interactions avec le substrat. L'étoile rouge indique l'amplitude utilisée pour imager le substrat, et le courant mesuré lors de l'acquisition de l'image. (c) Représentation schématique des 3 zones distinctes délimitant chacune des phases d'approche d'une sonde Fc-PEGylée sur un substrat de HOPG. (d) Représentation schématique de l'oscillation de la pointe Fc-PEGylée au-dessus d'un substrat, avec ε, l'épaisseur effective de la couche de chaîne Fc-PEG ancrée à la sonde AFM-SECM. Fréquence de résonance utilisée : 8,656 kHz. Potentiels appliqués : $E_{substrat}$ = -0,1 V/ECS, E_{pointe} = 0,3 V/ECS. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M.

Sur la Figure 58a, courbe bleue, on peut voir que lorsque d diminue, durant l'approche d'une pointe Fc-PEGylée vers une surface de HOPG en mode tapping, A diminue tout d'abord progressivement dès $d \sim 22$ nm, suivant une variation en forme de « S », puis plus brusquement aux environs de 3 nm. Parallèlement sur la Figure 58b, courbe bleue, le courant mesuré augmente progressivement dès $d \sim 22$ nm jusqu'à un plateau de courant d'une valeur de 3,4 pA pour $d \sim$ 3-10 nm. Pour $d < 3$ nm, le courant augmente ensuite brusquement.

De façon assez similaire aux courbes d'approche en contact, les courbes d'approche enregistrées en mode tapping, en amplitude et en courant peuvent être délimitées en 3 zones distinctes.

En zone I, pour $d >> 22$ nm, la distance séparant la pointe Fc-PEGylée est suffisamment importante pour qu'aucune interaction ne puisse avoir lieu avec le substrat. Par conséquent, aucun courant n'est détecté à la pointe et l'amplitude d'oscillation du bras flexible est alors indépendante de la distance, et correspond à l'amplitude libre $A_0 \sim 7$ nm.

En zone II, pour d comprise entre 22 et 3 nm, la pointe Fc-PEGylée interagit avec le substrat. Dès $d \sim 22$ nm, les chaînes Fc-PEG entrent en contact intermittent avec le substrat et l'amplitude d'oscillation de la sonde commence à décroître.

Dans la zone II, l'amplitude est telle que $A < d$, la pointe d'or AFM-SECM elle même n'entre donc jamais en contact avec le substrat. La diminution de l'amplitude d'oscillation de la pointe est donc uniquement liée au contact intermittent des chaînes Fc-PEG avec le substrat, et a lieu dès que la distance minimale pointe Fc-PEGylée-substrat d_{min}, est telle que $d_{\min} = 22 - A_0$, soit $d_{min} \sim 15$ nm.

Cette distance minimale pour laquelle l'amplitude d'oscillation de la pointe Fc-PEGylée commence à diminuer, correspond à ε, l'épaisseur effective de la couche de Fc-PEG ancrée à la sonde AFM-SECM (Figure 57), c'est à dire $\varepsilon = d_{min} = 15$ nm. On remarque que cette valeur de ε est plus grande que la valeur de R_F pour des chaînes de Fc-PEG.

Une explication simple peut être fournie à cette observation. Comme nous l'avons vu précédemment, les monomères de longues chaînes linéaires ancrées se distribuent aléatoirement dans l'espace depuis le point d'ancrage et vers la solution en suivant un profil continu qui s'étend au delà de R_F (voir Figure 38). Il est donc normal que certaines chaînes entrent en contact avec le substrat pour $d_{min} > R_F$.

Si l'on s'intéresse à présent aux courbes d'approche enregistrées en courant et présentées en Figure 58b, on s'aperçoit qu'un courant est détecté dès $d \sim 22$ nm, ce qui correspond à la distance pour laquelle l'amplitude d'oscillation de la sonde Fc-PEGylée commence à diminuer. Pour $d \sim 22$ nm, soit $d_{min} \sim 15$ nm (l'amplitude vaut encore à peu près A_0 à cette distance limite), les têtes Fc sont alternativement en contact et hors contact avec le substrat, justifiant ainsi qu'on commence à détecter un courant.

Considérant que la distance d et l'amplitude A sont déterminées ici avec une précision de ± 1 nm, la détection des têtes ferrocènes à environ 15 nm semble être en accord avec la distance d'environ 12 nm, à laquelle on a observé un courant électrochimique en mode contact sur les courbes d'approche en courant.

Dans la gamme de distance entre 3 et 22 nm, considérant la Figure 57 et la discussion ci-dessus, deux situations limites peuvent être envisagées au regard des chaînes Fc-PEG :

- Pour $d_{max} > \varepsilon$, les chaînes Fc-PEG sont alternativement en contact et hors contact avec le substrat.
- Pour $d_{max} < \varepsilon$, les chaînes Fc-PEG sont alors en contact permanent avec le substrat malgré les oscillations de la pointe Fc-PEGylée.

Ainsi la transition entre ces deux situations limites est exprimée par $d_{\max} = d + A = \varepsilon = 15\ nm$. On voit graphiquement sur la Figure 58a, que cette condition est remplie à l'intersection de la droite $A = \varepsilon - d$ (courbe rouge en pointillé) et de la courbe d'approche en amplitude (courbe bleue) pour d = 11 nm.

Si l'on reporte cette distance de d = 11 nm sur la courbe bleue de la Figure 58b, on s'aperçoit que l'intensité du courant vaut alors $i \sim 3$ pA, ce qui correspond quasiment au maximum de courant mesuré de 3,4 pA.

Ce plateau de courant à d compris entre 10 et 3 nm provient d'un confinement trop important des chaînes Fc-PEG entre la pointe AFM-SECM et le substrat ce qui ralentit la dynamique des chaînes.

En zone III, d comprise entre 3 et 0 nm, en comprimant d'avantage la couche de chaîne Fc-PEG ancrée sur la pointe AFM-SECM, l'amplitude A varie linéairement avec le diminution de la distance sonde-substrat et la pente de la courbe est alors de $dA/dd = 1$, pour d tendant vers zéro. Cette variation linéaire de A en fonction de d, typique en mode tapping, indique que c'est la surface d'or de la pointe AFM-SECM qui entre en contact avec le substrat de HOPG. En outre, on observe également ce type de variation dans le cas d'une pointe AFM-SECM nue approchant d'un substrat, comme on peut le voir en Figure 58a, courbe verte. Ce comportement confirme donc que pour $d < 3$ nm, ce ne sont plus les chaînes Fc-PEG de la pointe qui touchent le substrat, mais l'extrémité d'or de la pointe AFM-SECM.

De même, dans cette gamme de distance, on observe une brusque augmentation du courant comparable à celle enregistrée lors de l'approche d'une sonde AFM-SECM nue sur une substrat de HOPG, Figure 58b, courbe verte. De façon similaire au mode contact, ce courant est attribué au courant tunnel tout d'abord, puis au contact physique entre la pointe Fc-PEGylée et le substrat, et qui se caractérise par une amplitude d'oscillation de la pointe Fc-PEGylée quasiment nulle.

L'analyse des courbes enregistrées en amplitude et en courant en mode tapping ne contribue pas seulement à démontrer la présence des chaînes Fc-

PEG à l'extrémité de la pointe AFM-SECM. Les courbes d'approche en courant prouvent également qu'il est possible d'enregistrer un courant d'origine électrochimique à une pointe Fc-PEGylée oscillante dans un espace sonde-substrat équivalent à la taille des chaînes Fc-PEG.

Sur la Figure 58b, on peut remarquer que la forme de la courbe d'approche en courant ressemble très fortement à celle précédemment enregistrée sur surface d'or plane en mode contact. Cette observation est une première indication que le courant mesuré provient bien du cyclage rédox des têtes ferrocènes entre la pointe Fc-PEGylée et le substrat.

Afin d'identifier sans ambiguïté la nature du courant électrochimique enregistré en mode tapping lors de l'approche d'une sonde Fc-PEGylée vers un substrat de HOPG, on peut comme précédemment en mode contact, effectuer un balayage du potentiel appliqué au substrat et mesurer le courant de pointe.

3.2 Enregistrement d'un courant à la pointe Fc-PEGylée à une distance constante du substrat : mesure directe d'un voltammogramme i_{pointe} versus $E_{substrat}$

En mode tapping, la boucle d'asservissement agit sur le tube piézoélectrique pour maintenir l'amplitude d'oscillation de la sonde constante. Par conséquent, si on impose une amplitude A telle que $A < A_0$, la boucle d'asservissement va permettre de maintenir la sonde à une distance moyenne d de la surface donnée par la courbe d'approche représentée sur la Figure 58a.

Comme on peut le voir sur la Figure 58a, si on fixe une amplitude de consigne $A \sim 4$ nm, on place alors la sonde Fc-PEGylée à une distance pointe-substrat $d \sim 11$ nm (symbolisée par une étoile rouge), pouvant être maintenue constante indéfiniment. En outre, l'application de cette amplitude de consigne, nous assure que les chaînes Fc-PEG touchent en permanence le substrat puisque $d_{max} = d + A \leq \varepsilon$.

Ayant placé la pointe Fc-PEGylée dans la zone d'interaction des chaînes Fc-PEG avec le substrat, la dépendance en potentiel du courant de pointe, peut alors être acquise en balayant le potentiel du substrat $E_{substrat}$, ou de pointe, E_{pointe}. Pour minimiser le courant capacitif à la pointe Fc-PEGylée, on préfère balayer $E_{substrat}$ et mesurer i_{pointe} en laissant le potentiel de la pointe Fc-PEGylée fixe.

L'enregistrement d'une courbe i_{pointe} versus $E_{substrat}$ présentée en Figure 59, est obtenu en appliquant un potentiel fixe à la pointe Fc-PEGylée de 0,4 V/ECS et en balayant $E_{substrat}$ de –0,05 V à +0,3 V/ECS à une vitesse de balayage de 20 mV/s.

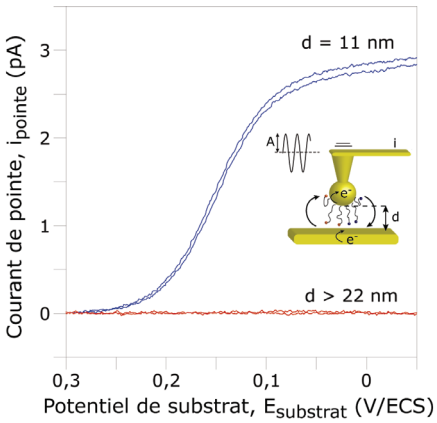


Figure 59 : Courbe i_{pointe} versus $E_{substrat}$ obtenue en appliquant un potentiel fixe à la pointe Fc-PEGylée de 0,4 V/ECS et en balayant le potentiel appliqué au substrat de –0,05 V à +0,3 V/ECS à 20 mV/s. En bleu, le voltammogramme enregistré à d = 11 nm avec une amplitude de consigne A = 4 nm. En rouge, le voltammogramme enregistré à d > 22 nm. En insert, une représentation schématique d'une pointe Fc-PEGylée maintenue à une distance moyenne d au dessus du substrat en mode tapping. Fréquence de résonance utilisée : 8,656 kHz. Potentiels appliqués : $E_{substrat}$ = -0,1 V/ECS, E_{pointe} = 0,3 V/ECS. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M.

Comme on peut le voir sur la Figure 59 (courbe bleue), le voltammogramme ainsi obtenu présente la forme sigmoïde typique d'un processus faradique. On note également que le potentiel de demi-vague est de 0,15 V/ECS, ce qui correspond au potentiel standard des têtes ferrocènes portées par une chaîne de PEG, confirmant ainsi la spécificité du courant électrochimique enregistré lors de l'approche d'une pointe Fc-PEGylée sur un substrat.

En revanche, si l'on change l'amplitude de consigne pour une valeur très proche de l'amplitude libre A_0, par exemple 98 % de A_0, la pointe va alors osciller à $A \sim 0{,}98 \times A_0 \sim 6{,}9$ nm. Si on reporte cette amplitude de consigne sur la Figure 58a, on peut voir que la sonde se trouve positionnée à $d \geq 22$ nm. Pour d > 22 nm, on constate en Figure 59 que le voltammogramme enregistré est « plat », c'est à dire qu'on ne détecte pas les chaînes Fc-PEG ancrées sur la pointe AFM-SECM. En effet, à cette distance, il est impossible pour les têtes Fc d'atteindre le substrat car cela impliquerait une élongation trop importante de la chaîne PEG (voir Figure 38). Par conséquent, aucun courant de « positive feedback » n'est alors détecté.

Ces résultats démontrent donc que le courant de « positive feedback » dû à la diffusion élastique des têtes Fc portée par des chaînes PEG ancrées sur une pointe AFM-SECM peut être enregistré pendant que la pointe Fc-PEGylée oscille proche du substrat (à d < 22 nm).

L'enregistrement d'un courant électrochimique avec une sonde AFM-SECM en mode tapping, a déjà été démontré pour un médiateur libre en solution.[3,4] Mais, dans ce cas, les amplitudes d'oscillations utilisées étaient de quelques nanomètres, et donc très faibles comparées à la couche de diffusion du médiateur libre en solution.

En comparaison avec notre système de médiateur lié à la pointe, ce qui est remarquable, c'est qu'on impose ici une amplitude d'oscillation à notre pointe Fc-PEGylée, proche du R_F des chaînes Fc-PEG, tout en permettant quand même l'enregistrement d'un courant faradique spécifique.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives pour le développement d'une microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde. Nous venons en effet de prouver que cette nouvelle microscopie SECM est pleinement compatible avec le mode tapping qui est parfaitement adapté pour imager des surfaces biologiques fragiles.

Toutefois, imager une surface implique plus que d'être capable d'enregistrer de simples courbes d'approche en un point particulier du substrat. Il est de surcroît nécessaire que l'amplitude et la réponse électrochimique de notre sonde Fc-PEGylée utilisée en mode tapping soit stable, *en tout point de la surface à imager*.

4 Imagerie topographique et électrochimique d'un substrat de HOPG en mode tapping avec une sonde Fc-PEGylée

Tout d'abord, on souhaite vérifier qu'on est capable de balayer une surface plane avec une sonde Fc-PEGylée, à une distance sonde-substrat constante tout en enregistrant un courant de « positive feedback » dû aux chaînes Fc-PEG.

Pour cela, on choisit une amplitude de consigne permettant de positionner la pointe Fc-PEGylée à une distance sonde-substrat pour mesurer un courant de « positive feedback » suffisamment important. Pour imager la surface de HOPG sur une superficie de 1 µm², on applique donc une amplitude de consigne de A = 4 nm, ce qui correspond à $d \sim 11$ nm (Figure 58a, courbe bleue). En outre, on applique durant l'imagerie de la surface de HOPG, un potentiel constant à la pointe Fc-PEGylée et au substrat, respectivement de E_{pointe} = 0,3 V/ECS et $E_{substrat}$ = -0,1 V/ECS (Figure 60). Toutefois, le potentiel de substrat peut également être balayé par intermittence comme détaillé plus loin.

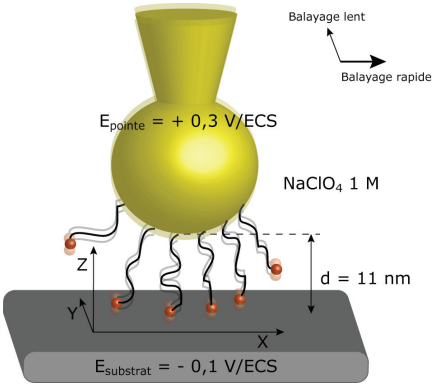


Figure 60 : Microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde. Représentation schématique de l'imagerie d'un substrat de HOPG par une sonde AFM-SECM Fc-PEGylée, en mode tapping, à une distance moyenne constante $d \sim 11$ nm. La pointe Fc-PEGylée parcourt ensuite le substrat selon les axes X (rapide) et Y (lent). Afin d'enregistrer une image en courant du substrat, on applique un potentiel à chaque électrode. Potentiels appliqués : E_{pointe} = 0,3 V/ECS, $E_{substrat}$ = -0,1 V/ECS. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M.

Au cours de l'imagerie de la surface HOPG, la topographie et le courant à la pointe Fc-PEGylée sont enregistrés simultanément en fonction de la position de la sonde sur la surface, selon les axes X et Y, comme on peut le voir sur la Figure 60.

4.1 Topographie de la surface de HOPG sondée par une pointe Fc-PEGylée

L'enregistrement de la topographie d'une surface de HOPG, obtenue grâce aux variations de l'élongation du piézoélectrique permettant de maintenir l'amplitude d'oscillation de la pointe Fc-PEGylée constante, est présentée en Figure 61.

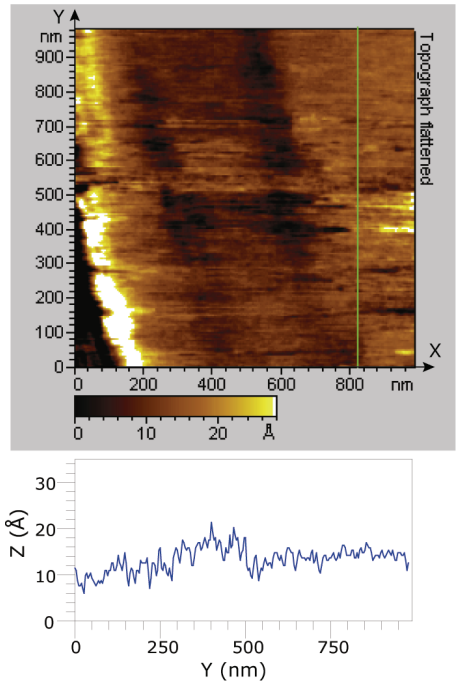


Figure 61 : Microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde. Image en topographie d'une surface de HOPG par une sonde AFM-SECM Fc-PEGylée en mode tapping. En dessous de l'image, une coupe de l'image en topographie *Z* en fonction de *Y*, selon la ligne verte présente sur la droite de l'image. Fréquence de résonance : 8,656 kHz. Amplitude de consigne : 4 nm. Distance sonde-substrat : 11 nm. Surface imagée : 1000 x 1000 nm. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M.

La Figure 61 montre l'image en topographie de la surface HOPG, ainsi qu'une coupe de l'image selon la ligne verte visible sur la droite de l'image et représentée sous forme de graphe en dessous de l'image.

L'image en topographie révèle des zones extrêmement planes séparées par des marches. La rugosité apparente pics à pics mesurée est globalement inférieure à 1 nm, ce qui est compatible avec la topographie connue pour une surface de HOPG. Ce type de surface se caractérise par une succession de plans graphitiques séparés par des marches de 0,34 nm de hauteur, ou des empilements de plans graphitiques, ou bien encore de lignes de défauts.

Sur la Figure 61, on distingue des lignes sombres au centre de l'image d'environ 0,82 nm de hauteur, attribuables au bord de l'empilement de deux ou trois plans graphitiques. De plus, on observe la présence de lignes claires en bas à gauche de l'image d'environ 2,5 nm de haut attribuée à une série de lignes de défauts.

On remarque que l'image en topographie présentée ici est un peu bruitée, ce qui nous indique que les conditions d'imagerie ne sont pas optimales. Un exemple d'image de meilleure qualité, est présentée plus loin en Figure 64. Ces différentes images montrent qu'avec nos sondes Fc-PEGylée, il est possible d'atteindre en mode tapping, une résolution verticale (en *Z*) d'environ 1 nm.

De même, l'observation de l'image topographique présentée en Figure 61, révèle qu'on est capable de résoudre dans le plan du substrat des détails

d'une taille de l'ordre de 20 nm. Par exemple, on peut clairement identifier une ligne de défaut présentant une largeur de l'ordre de 30 nm (dans le coin gauche) ou bien encore un objet dans le coin inférieur droit d'une taille d'environ 20 nm visible en plus clair sur l'image.

Ces résultats sont très encourageants pour le développement de la microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde en vue de la caractérisation d'une molécule d'enzyme unique. En effet, la résolution à laquelle nous sommes arrivés avec un système loin d'être optimisé est dores et déjà proche de la taille d'une molécule d'enzyme (~ 10 nm).

Mais bien sur, sans la mesure concomitante d'un courant faradique, imager en topographie une surface avec une sonde Fc-PEGylée n'aurait que peu d'intérêt.

4.2 Acquisition de l'image en courant simultanée à la topographie

Durant l'imagerie in-situ de la surface de HOPG par la sonde Fc-PEGylée, le potentiel de substrat et le courant de sonde sont également enregistrés et présentés respectivement en Figure 62a et Figure 62b.

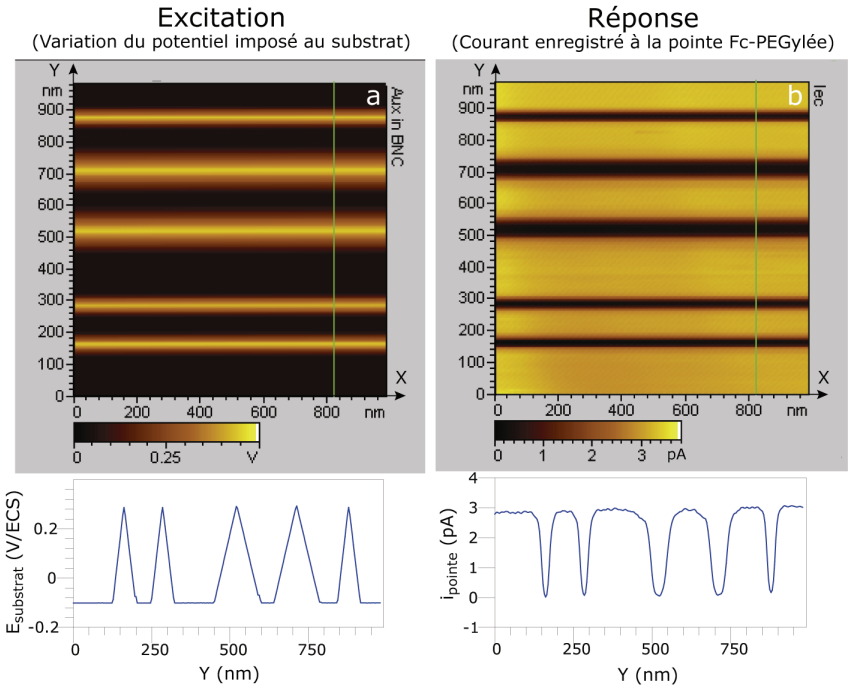


Figure 62 : Microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde. Images du potentiel imposé au substrat (a), et du courant de pointe (b) enregistrées simultanément durant le balayage d'une surface de HOPG par une sonde Fc-PEGylée, en mode tapping. Sous chacune des images se trouve une coupe réalisée selon la ligne verte présente sur la droite des images. Durant l'imagerie, cinq balayages successifs du potentiel appliqué au substrat sont réalisés de –0,1 V à 0,3 V/ECS, deux à 10 mV/s (bandes étroites visible sur les images), deux à 5 mV/s (bandes larges) et un à 10 mV/s. Le potentiel appliqué à la pointe est maintenue constant à 0,3 V/ECS. Fréquence de résonance : 8,656 kHz. Amplitude de consigne : 4 nm. Distance sonde-substrat : 11 nm. Surface imagée : 1000 x 1000 nm. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M.

Le positionnement de la pointe Fc-PEGylée à une distance de 11 nm de la surface HOPG permet d'après la courbe d'approche en courant (Figure 58b, courbe bleue) d'enregistrer un courant d'environ 3 pA. L'image enregistrée en courant en parcourant la surface de HOPG avec un potentiel de pointe constant de 0,3 V/ECS et un potentiel de substrat de –0,1 V/ECS, a effectivement permis la mesure d'un courant stable d'environ 3 pA, comme on peut le voir sur la Figure 62b, selon *Y*, entre 0 et 100 nm et quelque soit *X*. Dans cette zone, on mesure des pics de courant parasites inférieurs à 0,1 pA.

Pour confirmer l'origine du courant mesuré, durant l'acquisition de l'image, on balaye ponctuellement le potentiel appliqué au substrat tout en conservant le potentiel de la sonde Fc-PEGylée à 0,3 V/ECS. Cinq balayages de –0,1 V à 0,3 V/ECS, sont ainsi réalisés et apparaissent sous la forme de bandes claires sur la Figure 62a. Deux balayages sont effectués à 10 mV/s (bandes étroites), deux à 5 mV/s (bandes larges) et un dernier à 10 mV/s.

On constate sur l'image en courant, qu'en réponse à ces balayages de $E_{substrat}$, le courant de pointe varie continûment de 0 pA pour $E_{substrat} > 0{,}3$ V/ECS, à 3 pA pour $E_{substrat} < -0{,}1$ V/ECS.

Afin de mieux visualiser ces variations du courant de pointe, on effectue une coupe de l'image en courant mesuré à la pointe Fc-PEGylée. Cette coupe suit la ligne verte présente sur la Figure 62b à droite de l'image et permet de tracer le graphe de i_{pointe} en fonction de *Y* présenté en dessous de l'image en courant. Ayant également enregistré le potentiel du substrat durant l'imagerie du substrat de HOPG, il est donc possible de tracer le graphe $E_{substrat}$ en fonction de *Y* suivant la même coupe de l'image (Figure 62a en bas).

Enfin, en combinant les coupes des images en courant et en potentiel de substrat on peut obtenir la dépendance de i_{pointe} en fonction de $E_{substrat}$ *pour tout point de la coupe*. Le voltammogramme de i_{pointe} en fonction de $E_{substrat}$ ainsi reconstitué est présenté en Figure 63.

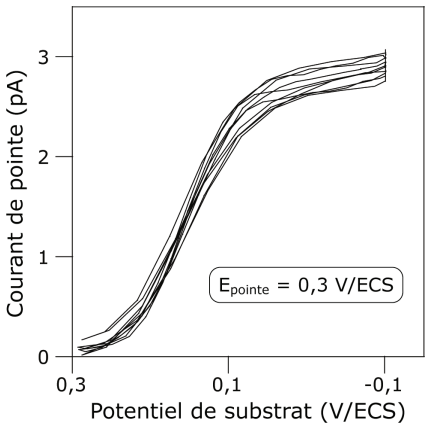


Figure 63 : Superposition des variations de i_{pointe} induites par les balayages en potentiel appliqué au substrat durant l'imagerie de la surface de HOPG par la pointe Fc-PEGylée. Ce voltammogramme est reconstruit grâce aux données issues des coupes des images en courant et en potentiel selon la ligne verte sur la droite des images présentées en Figure 62 a et b. Potentiels appliqués : E_{pointe} = 0,3 V/ECS, $E_{substrat}$ = –0,1 V à 0,3 V/ECS à 5 et 10 mV/s. Fréquence de résonance : 8,656 kHz. Amplitude de consigne : 4 nm. Distance sonde-substrat : 11 nm. Surface imagée : 1000 x 1000 nm. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M.

Comme on peut le voir sur la Figure 63, la superposition des variations de i_{pointe} induites par les balayages en potentiel appliqué au substrat durant l'imagerie de la surface, forme un voltammogramme unique.

Lorsque $E_{substrat}$ = -0,1 V/ECS, le courant mesuré à la pointe Fc-PEGylée est stable à une valeur d'environ 3 pA. En outre, lorsque $E_{substrat} = E_{pointe}$ = 0,3 V/ECS, aucun courant de pointe n'est alors mesuré. Ce voltammogramme reconstruit présente donc plus clairement ce qu'on a pu observer sur la coupe de l'image en courant (Figure 62b) où les balayages en potentiel sont traduits par des « fossés électrochimiques ».

On voit sur la Figure 63, que le voltammogramme du courant de pointe en fonction du potentiel de substrat est de forme sigmoïde, centrée à 0,15 V/ECS, prouvant ainsi que le courant mesuré est d'origine *faradique* et *caractéristique des têtes ferrocènes portées par des chaînes de PEG*.

De plus, il est important de constater ici que la vitesse de balayage du potentiel de substrat n'influence pas la réponse électrochimique. Cette observation prouve donc que ce n'est pas un courant issu du couplage capacitif entre la pointe AFM-SECM et le substrat qui est mesuré, mais bien un courant stationnaire de « *positive feedback* » des têtes ferrocènes portées par les chaînes PEG. On peut donc en conclure que les têtes ferrocènes portées par des chaînes PEG véhiculent bien les électrons de la surface vers la sonde.

Ces résultats confirment qu'une sonde Fc-PEGylée peut réellement être utilisée pour sonder localement aussi bien la topographie, mais aussi la réactivité électrochimique d'un substrat à une échelle nanométrique.

4.3 Spécificités de la surface de HOPG

Sur les précédentes images d'une surface HOPG acquise avec une sonde Fc-PEGylée, présentée en Figure 61 et Figure 62, on distingue très nettement en topographie les différentes marches entre deux terrasses, mais en revanche, elles sont indiscernables en courant.

Or, dans la littérature il est décrit et reconnu, que le transfert électronique hétérogène est plus rapide au niveau des marches que sur les plans graphitiques de HOPG. Ainsi, durant l'imagerie de la surface HOPG, on aurait pu s'attendre à ce qu'une variation du courant de pointe soit détectée lors du passage des marches aux terrasses, ce qui n'a pas été le cas.

Toutefois, il est à noter que les images en courant ont été enregistrées avec un potentiel appliqué à la surface de HOPG suffisamment important ($E_{substrat}$ = -0,1 V/ECS) pour que le courant mesuré soit uniquement dépendant de la dynamique de mouvement des chaînes Fc-PEG. Par conséquent, le courant mesuré à la sonde Fc-PEGylée est alors indépendant de la vitesse de transfert des électrons entre les têtes ferrocènes et le substrat.

Pour tenter de sonder la différence de cinétique de transfert électronique hétérogène entre les marches et les plans graphitiques de la surface de HOPG, on réalise donc une image en mode tapping avec un potentiel de substrat plus faible, de $E_{substrat}$ = 0,1 V/ECS. A ce potentiel, le transfert électronique hétérogène avec la surface HOPG peut théoriquement participer au contrôle cinétique du courant faradique. Le courant mesuré peut alors être plus faible sur un plan graphitique que sur une marche, durant l'image du substrat de HOPG.

L'enregistrement dans ces conditions d'une image de la surface de HOPG en topographie et en courant, avec une nouvelle sonde Fc-PEGylée sur une zone de 2280 nm de coté, est présentée en Figure 64.

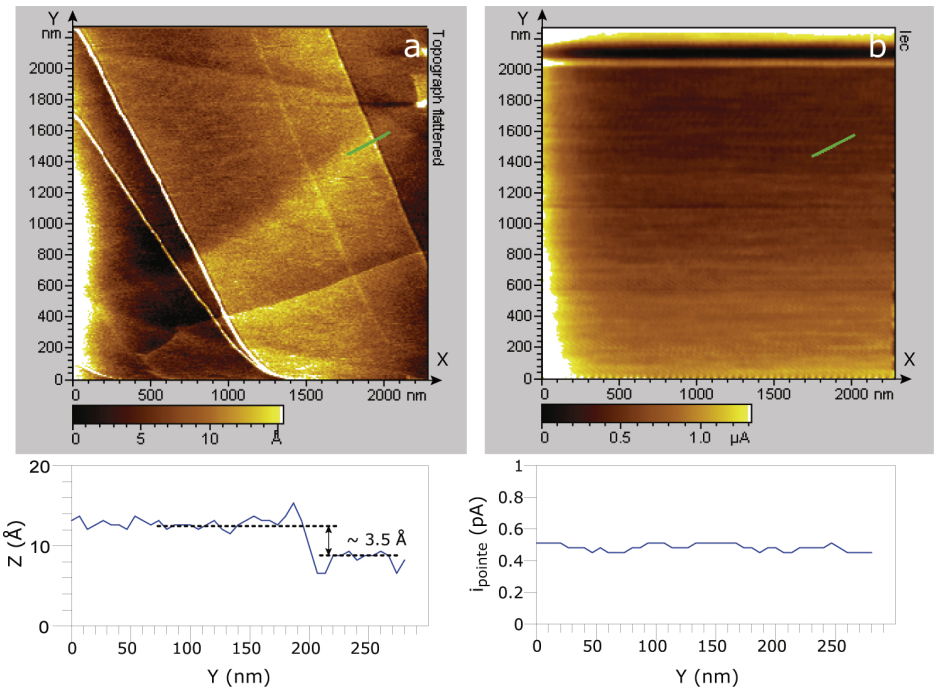


Figure 64 : Microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la sonde. Images en topographie (a) et en courant (b) enregistrées simultanément durant l'imagerie d'une surface de HOPG par une sonde Fc-PEGylée, en mode tapping. Sous chacune des images se trouve une coupe réalisée selon la ligne verte présente sur le coté droit des images. Durant l'imagerie, un balayage du potentiel appliqué au substrat est réalisé de –0,1 V à 0,3 V/ECS à 10 mV/s, visible en haut de l'image en courant sous la forme d'une bande sombre, afin de vérifier l'origine faradique du courant mesuré. Potentiels appliqués : E_{pointe} = 0,3 V/ECS, $E_{substrat}$ = 0,1 V/ECS (hors balayage). Fréquence de résonance : 1,279 kHz. Amplitude de consigne : 2 nm. Distance sonde-substrat : 6 nm. Surface imagée : 2279,2 x 2279,2 nm. Electrolyte support : $NaClO_4$ 1 M.

Tout d'abord, on note que les caractéristiques topographiques de la surface de HOPG présentée en Figure 64a, sont clairement résolues grâce à l'optimisation de différents paramètres, notamment, l'amplitude de consigne choisie beaucoup plus faible, diminuant ainsi la distance moyenne pointe Fc-PEGylée-substrat à $d \sim 6$ nm. De plus, la fréquence d'excitation utilisée est différente, ce qui a peut être contribué à l'obtention d'une meilleure résolution.

Comme on peut le voir sur la Figure 64a, suivant la coupe de l'image perpendiculairement à une marche, symbolisée par un trait vert, on peut mesurer une différence de hauteur d'environ 0,35 nm ce qui correspond à l'épaisseur d'un plan graphitique (~ 0,34 nm). Parallèlement, le courant de pointe reste stable à une valeur d'environ 0,55 pA sans aucune variation lors du passage sur la marche.

A la fin de l'acquisition de l'image en courant, on a réalisé le balayage du potentiel de substrat de –0,1 V à 0,3 V/ECS à 10 mV/s, ce qui est reflété par une bande épaisse sombre en haut de l'image, afin de vérifier la nature du courant électrochimique mesuré, de la même façon que précédemment en Figure 62. Le résultat de ce balayage $E_{substrat}$ décrivant en courant, un « fossé électro-

chimique » classique, confirme que le courant est bien d'origine faradique et provient des têtes ferrocènes ancrées sur la pointe Fc-PEGylée.

Au vue des ces résultats, on peut donc en conclure que la réactivité électrochimique de la surface de HOPG sondée par une pointe Fc-PEGylée *semble* homogène. Toutefois, la surface de HOPG n'est en réalité pas homogène, comme nous l'avons discuté ci-dessus, mais on peut supposer que la résolution cinétique limitée de l'AFM-SECM à médiateur lié à la pointe, ne permet pas la différenciation des vitesses de transferts électroniques hétérogènes sur ce type de substrat. Cette limitation de la résolution cinétique est simplement due au fait que le mouvement des têtes Fc n'est pas assez rapide par rapport à la vitesse de transfert hétérogène de la surface de HOPG. Ceci implique que la constante de transfert hétérogène k_s de la surface de HOPG sur les plans graphitiques ou au niveau des marches soit alors telle que $k_s/R_F > D/R_F^2 = 8.10^4$ s^{-1}. Ainsi, ceci nécessite que k_s soit supérieur à 4.10^{-2} cm/s, ce qui est une valeur compatible avec celles rapportées dans la littérature pour une surface de HOPG sondée par d'autres systèmes rédox.[5]

Alternativement, on peut également penser que la différentiation des transferts électroniques hétérogènes sur surface de HOPG avec une sonde Fc-PEGylée est impossible à cause d'une limitation de la résolution électrochimique latérale. La sonde Fc-PEGylée présente peut-être une résolution électrochimique latérale trop faible pour sonder la réactivité de marches très étroites, et permettre la distinction entre des plans graphitiques et des marches. Essayons donc d'estimer cette résolution électrochimique latérale.

4.4 Estimation de la résolution latérale électrochimique de la sonde Fc-PEGylée

4.4.1 Combien de chaînes Fc-PEG sondent réellement le substrat ?

Dans le développement de la microscopie AFM-SECM à médiateur lié à la pointe, nous avons prouvé que ce sont bien les chaînes Fc-PEG qui sondent le substrat et non la pointe AFM-SECM elle-même. Ainsi, il paraît intéressant d'étudier le nombre de chaînes Fc-PEG qui sondent réellement le substrat. Compte tenu que la pointe AFM-SECM possède une forme sphérique, toutes les chaînes ancrées à l'extrémité de la pointe n'interagissent pas avec le substrat.

Pour déterminer le nombre maximum de chaînes pouvant sonder le substrat, nous allons fonder notre raisonnement sur de simple considérations géométriques et électrochimiques.

Pour cela, l'approche d'une sonde Fc-PEGylée sur un substrat est schématisé en Figure 65.

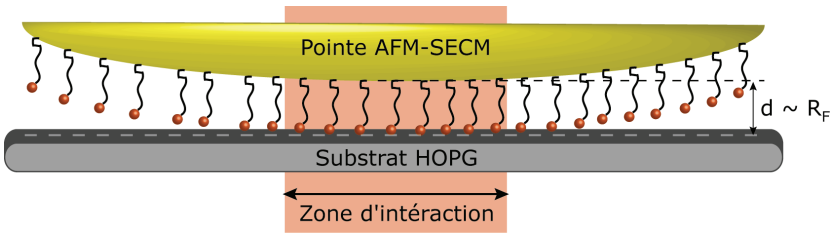


Figure 65 : Représentation schématique d'une sonde Fc-PEGylée approchant d'une surface de HOPG. La forme sphérique de la sonde AFM-SECM ne permet pas à toutes les chaînes Fc-PEG d'entrer en contact avec le substrat. Pour $d \sim R_F$, la zone d'interaction des chaînes sur le substrat est symbolisée par une zone rouge.

Si on considère que seules les chaînes « voyant » le substrat à une distance R_F génèrent effectivement un courant, le courant moyen normalement mesuré par diffusion d'une chaîne individuelle de Fc-PEG entre la pointe et le substrat devrait être donné par $i_{pointe} \sim eD/R_F^2$, soit environ 13 fA par chaîne Fc-PEG.

Or pour la valeur de d considérée d'environ R_F, on mesure un courant faradique de l'ordre de 1 à 3 pA, on peut donc en déduire qu'entre *80 et 235 chaînes Fc-PEG* sont impliquées dans la génération d'un courant de « positive feedback », c'est à dire qu'elles sondent réellement le substrat.

On note une fois de plus que la détection électrochimique d'un nombre aussi faible de chaînes résulte du cyclage rédox des têtes Fc qui constitue un mode d'amplification tellement sensible qu'il a permis pour d'autres systèmes la détection de molécule unique.[6]

4.4.2 Résolution latérale électrochimique d'une sonde Fc-PEGylée

Considérant que seul un nombre restreint de chaînes, $n_{chaînes}$, positionnées à l'extrémité de la pointe AFM-SECM interagissent réellement avec le substrat à une distance $d \sim R_F$, on peut alors déterminer la résolution électrochimique latérale d'une sonde Fc-PEGylée.

Pour cela, on évalue tout d'abord la surface S, occupée par les $n_{chaînes}$ au bout de la sonde par l'équation suivante :

$$S = n_{chaines} / (N\Gamma_{chaines})$$

avec, $\Gamma_{chaînes} \sim 9.10^{-12}$ mol/cm², la concentration surfacique en chaînes Fc-PEG immobilisées sur la pointe AFM-SECM déterminée précédemment (voir paragraphe 3.1, page 77), $R_{pointe} \sim 500$ nm, le rayon de la pointe AFM-SECM et $n_{chaînes}$ compris entre 80 et 235 chaînes. On détermine alors que la surface S à considérer comme sondant réellement le substrat est comprise entre $1{,}5.10^{-11}$ et $4{,}3.10^{-11}$ m².

La résolution électrochimique latérale est ensuite obtenue en déterminant r_b, le rayon de base de la calotte sphérique de la sonde AFM-SECM de surface S, présenté en Figure 66.

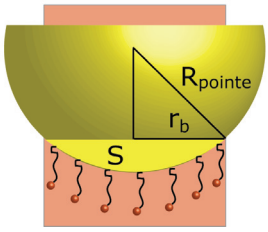


Figure 66 : Représentation schématique d'une pointe Fc-PEGylée. La zone d'interaction des chaînes Fc-PEG avec le substrat est délimitée par une zone rouge. La surface S, le rayon de base de la calotte sphérique r_b, et le rayon de pointe R_{pointe} sont précisés sur le schéma.

On peut déduire de la Figure 66, que le rayon de base r_b peut être relié géométriquement à la surface S par la formule suivante :

$$r_b = R_{\text{pointe}}\sqrt{S/\pi R_{\text{pointe}}^2}$$

valable uniquement pour $r_b << R_{pointe}$, ce qui est le cas ici, pour nos sondes Fc-PEGylées.

Ainsi, on peut en conclure en première approximation que la résolution latérale électrochimique de l'image en courant de « positive feedback » obtenue lors de l'imagerie d'un substrat de HOPG (Figure 62b et Figure 64b), est exprimée par une calotte de rayon de base compris *entre 21 et 37 nm*.

5 Conclusions

Au cours de cette étude nous avons pu mettre en évidence que l'utilisation de sondes AFM-SECM Fc-PEGylées en mode tapping est non seulement réalisable, mais permet surtout l'imagerie d'un substrat. Nous avons plus précisément montré qu'il était possible d'acquérir simultanément, une image topographique du substrat, avec une résolution nanométrique, et une image électrochimique reflétant la réactivité locale de la surface, telle que sondée par les tête Fc des chaînes Fc-PEG greffées sur la pointe. Nous avons donc réussi à mettre au point une microscopie électrochimique à médiateur lié à la sonde qui est totalement innovante et telle qu'imaginée lors de la proposition de ce sujet de thèse.

Bibliographie

1 - *Applied Scanning Probe Methods*, Bhushan, B.; Fuchs, H., Hosaka, S. Eds.; Springer-Verlag: Berlin, **2004**.

2 - (a) Navarre, S.; Choplin, F. ; Bousbaa, J.; Bennetau, B; Nony, L.; Aimé, J.-P. *Langmuir* **2001**,*17*, 4844-4850. (b) Martin, P.; Marsaudon, S.; Thomas, L.; Desbat, B.; Aimé, J.-P.; Bennetau, B. *Langmuir* **2005**, *21*, 6934-6943.

3 - Kueng, A.; Kranz, C.; Mizaikoff, B.; Lugstein, A.; Bertagnolli, E. *Appl. Phys. Lett*. **2003**, *82*, 1592-1594.

4 - Hirata, Y.; Yabuki, S.; Mizutani, F. *Bioelectrochem.* **2004**, *63*, 217

5 - Kneten, K.R.; McCreery, R.L. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2518-2524.

6 - (a) Fan, F.-R.F. ; Bard, A.J. *Science*, **1995**, *267*, 871-874. (b) Fan, F.-R.F. ; Bard, A.J. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 572-578. (c) Fan, F.-R.F. ; Juhyoun Kwak, J.; Bard, A.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9669–9675. (d) Sun, P.; Mirkin, M. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8241–8250.

Conclusion générale et perspectives

A l'issu de ce travail de thèse, nous avons, de façon totalement innovante, abouti à la mise au point d'une nouvelle microscopie AFM-SECM à haute résolution, que nous proposons de désigner par l'acronyme MT/AFM-SECM pour « Mediator Tethered–AFM/SECM », et pour laquelle le médiateur rédox ferrocène est lié à la sonde par le biais de chaînes flexibles PEG. Nous avons démontré que les têtes ferrocènes ainsi attachées à l'extrémité de la pointe AFM-SECM sont capables de sonder localement la réactivité locale d'un substrat. Nous avons de plus démontré que les pointes AFM-SECM Fc-PEGylées peuvent être utilisées en imagerie en mode tapping, permettant l'acquisition simultanée d'un courant de feedback électrochimique et de la topographie du substrat, et ce avec une résolution latérale et verticale de l'ordre du nanomètre. Ce nouveau type de microscopie AFM-SECM, devrait donc permettre de localiser des molécules d'enzyme individuelles sur une surface. Mais surtout, parce qu'elle est libre des contraintes diffusionnelles de la SECM « classique », cette microscopie MT/AFM-SECM devrait, *en principe*, permettre de caractériser le fonctionnement catalytique d'enzymes rédox, à l'échelle de la molécule unique. Il va de soit que de nombreuses étapes restent encore à parcourir avant d'atteindre ce but. En premier lieu il serait souhaitable de mieux comprendre les phénomènes physiques à l'origine du comportement des sondes Fc-PEGylées en mode tapping, en modélisant le comportement dynamique du système pointe oscillante/chaînes Fc-PEG en interaction avec une surface. Cela permettrait d'optimiser les conditions d'imagerie en mode tapping avec une sonde Fc-PEGylée, jusqu'ici déterminées empiriquement. Ensuite il apparaît indispensable de déterminer *expérimentalement* la résolution électrochimique latérale de la microscopie MT/AFM-SECM. Pour ce faire on pourra imager des surfaces composites c'est à dire présentant des zones isolantes et conductrices nanométriques, de dimension et de forme connues. Il sera alors temps de considérer un premier substrat « biologique» constitué d'une monocouche d'une enzyme rédox « modèle », la glucose oxydase, immobilisée sur une surface isolante plane. Il faudra tout d'abord vérifier que les têtes Fc portées par la sonde peuvent servir de cofacteur aux molécules d'enzymes confinées dans l'espace pointe-surface. Cette étude sera initialement menée à

l'échelle de quelques centaines de molécules d'enzymes. En diminuant la taille de la sonde, et la concentration surfacique en enzyme, on cherchera alors à quantifier le fonctionnement cinétique d'un nombre aussi restreint que possible de molécules d'enzymes, jusqu'à idéalement atteindre la limite de la molécule d'enzyme individuelle.

Trois publications sont issues de ce travail de thèse :

1 "Exploring the Motional Dynamics of End-Grafted DNA Oligonucleotides by in Situ Electrochemical Atomic Force Microscopy." Wang, K. ; Goyer, C. ; Anne, A. ; Demaille C. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 6051-6058.

2 "Localized electrografting of vinylic monomers on conducting substrate using an integrated electrochemical AFM probe." Ghorbal,A.; Grisotto,F.; Charlier,J.; Palacin, C. Goyer, C. and Demaille, C. *Chem. Commun.* **2008**, *soumis*

3 "Electrochemical atomic force microscopy (AFM-SECM) using tip-attached redox-labeled polymer chains as local molecular nanosensors. Prospects for imaging single enzyme molecule activity." Anne, A.; Demaille, C.; Goyer, C. *en préparation*

Partie Expérimentale

1 Fabrication des sondes AFM-SECM

1.1 Polissage des anneaux d'inox

1.2 Formation du bras flexible par écrasement du fil d'or

1.3 Electrocorrosion de la partie repliée du fil d'or écrasée

1.4 Formation de l'extrémité sphérique de la sonde AFM-SECM

1.5 Nettoyage de la surface de la pointe d'or AFM-SECM avant peinture

1.6 Isolation par dépôt de peinture électrophorétique

1.7 Vérification de l'isolation électrique complète des pointes d'or

1.8 Exposition sélective de l'extrémité de la pointe

1.9 Collage de la sonde AFM-SECM sur « chip » de verre

1.10 Montage de la sonde AFM-SECM sur prisme

2 Fabrication des surfaces d'or planes

3 Greffage sur pointe AFM-SECM de chaînes Fc-PEG

3.1 Nettoyage de l'extrémité de la sonde AFM-SECM

3.2 Enceinte de greffage de chaînes Fc-PEG sur pointe AFM-SECM

4 Fabrication du tampon phosphate pH = 7, I = 0,1 M

5 Provenance des produits chimiques

1 Fabrication des sondes AFM-SECM

Il s'agit du protocole initialement mise au point par Jeremy ABBOU et mis à jour pour ce travail de thèse.

1.1 Polissage des anneaux d'inox

Les anneaux d'inox servant à l'écrasement des fils d'or ont une dimension de 2,5 cm de diamètre et un orifice central de 1 cm de diamètre. Ils sont tout d'abord polis grossièrement sur disque abrasif n°800 pour faire disparaître les rainures dues aux brins d'or précédemment écrasés, puis sur disque n°1200. Les disques sont constamment humidifiés grâce à un goutte-à-goutte d'eau du robinet.

Ensuite, les anneaux sont polis jusqu'à obtenir un rendu « miroir » en utilisant différents draps de polissage (ESCIL) sur lequel sont déposés des poudres d'alumine de 0,5 µm puis de 0,05 µm mises en suspension dans l'eau milliQ.

Entre chaque polissage, les anneaux sont rincés à l'eau milliQ et plongés dans un bain à ultrasons (BRANSON 200) afin d'ôter toutes traces d'alumine susceptible ensuite de contaminer le fil d'or formant la pointe AFM-SECM.

1.2 Formation du bras flexible par écrasement du fil d'or

La sonde AFM-SECM est fabriquée à partir de fil d'or dur (Goodfellow) pur à 99,99% de 60 µm.

On découpe tout d'abord des fils d'or d'une longueur d'environ 1 à 1,5 cm que l'on dispose ensuite sur l'un des anneaux d'inox suivant leur rayon (Figure 67).

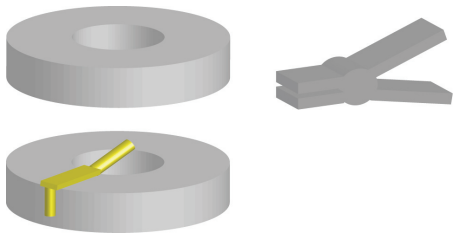


Figure 67 : Ecrasement d'un fil d'or entre deux anneaux d'inox. Après avoir été écrasé, le fil d'or est saisi avec une micro-pince crocodile.

On prend le soin de positionner les fils d'or dans la zone où est exercé la pression de l'étau et de les laisser dépasser du bord extérieur des anneaux d'inox environ 2 à 3 mm de fils.

Une fois les fils d'or en place, il faut ensuite rabattre délicatement le 2^{e} anneau sur le 1er, et bloquer l'ensemble pour empêcher les fils de bouger. Les deux anneaux sont positionnés sur le bord des mâchoires de l'étau, et comprimés par celui-ci.

Dans l'étau, la partie du fil dépassant du coté extérieur des anneaux (~ 2-3 mm) est repliée à 90° contre la tranche de l'anneau. Les mâchoires de l'étau sont ensuite desserrées et l'anneau supérieur est écarté. Le fil d'or écrasé est alors saisi par son extrémité orientée vers l'intérieur des anneaux, avec une micro-pince crocodile.

1.3 Electrocorrosion de la partie repliée du fil d'or écrasée

L'objectif de cette étape est de former l'extrémité effilée de la sonde AFM-SECM. Pour cela, on utilise un montage à deux électrodes constitué du fil d'or maintenu dans la micro-pince crocodile et d'une contre-électrode en aluminium.

La solution d'électrocorrosion est préparée avec :

- 40 mL d'eau milliQ,
- 10 mL de $CaCl_2$ (solution saturée dans l'eau milliQ) et
- 5 mL d'éthanol absolu.

La plaque d'aluminium utilisée comme contre-électrode doit être poncée et rincée à l'eau distillée avant utilisation, et est reliée à la borne négative du générateur de tension continu. La micro-pince crocodile tenant le fil d'or est reliée à la borne positive du générateur (Figure 68).

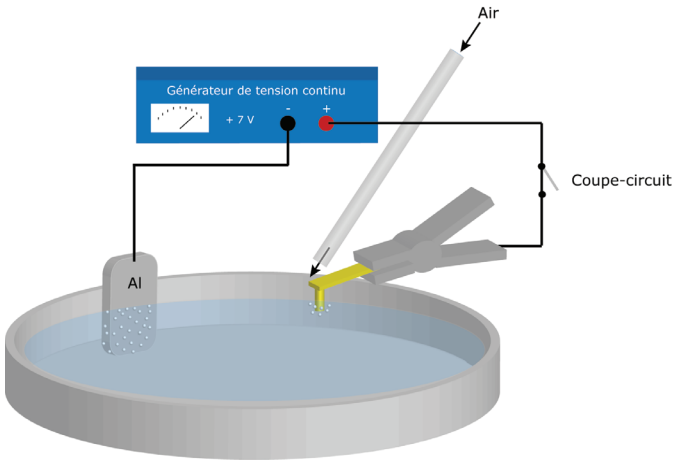


Figure 68 : Représentation schématique du montage permettant l'électrocorrosion de la partie repliée d'un fil d'or.

En outre, pour permettre l'arrêt du passage de courant et ainsi stopper l'électrocorrosion en fin de manipulation, on place un « coupe-circuit » dans le montage entre la micro-pince crocodile maintenant le fil à électrocorroder et le générateur.

La différence de potentiel imposée entre la contre-électrode (-) et le fil d'or (+) *avant l'immersion* est de +7 V.

On abaisse le fil d'or jusqu'à la solution d'électrocorrosion de telle façon que seule l'extrémité de la pointe (environ 1 à 2 mm) plonge dans la solution. Dès l'immersion, on voit apparaître un dégagement gazeux qui, une fois terminé, indique que l'électrocorrosion est achevée. Afin de protéger le bras flexible de la pointe AFM-SECM de ce dégagement gazeux corrosif pour l'or, un flux d'air est appliqué à la surface de la solution.

Enfin, le fil d'or électrocorrodé est rincé par un jet d'eau milliQ et les pointes sont ensuite contrôlées au microscope optique. La longueur de l'extrémité conique des pointes électrocorrodées est d'environ 300 µm.

1.4 Formation de l'extrémité sphérique de la sonde AFM-SECM

La génération d'un arc électrique entre la pointe d'or électrocorrodée et un fil de tungstène entraîne la fusion de l'extrémité du fil d'or et permet la formation d'une sphère.

Pour ce faire, la pointe électrocorrodée est maintenue au-dessus du fil de tungstène effilé à une distance comprise entre 0,5 et 1 mm mesurée en utilisant d'un oculaire montée sur support.

L'arc électrique généré est contrôlé par un appareillage capable de produire une impulsion haute tension de courte durée. Le schéma du circuit électrique de cet appareillage est présenté en Figure 69.

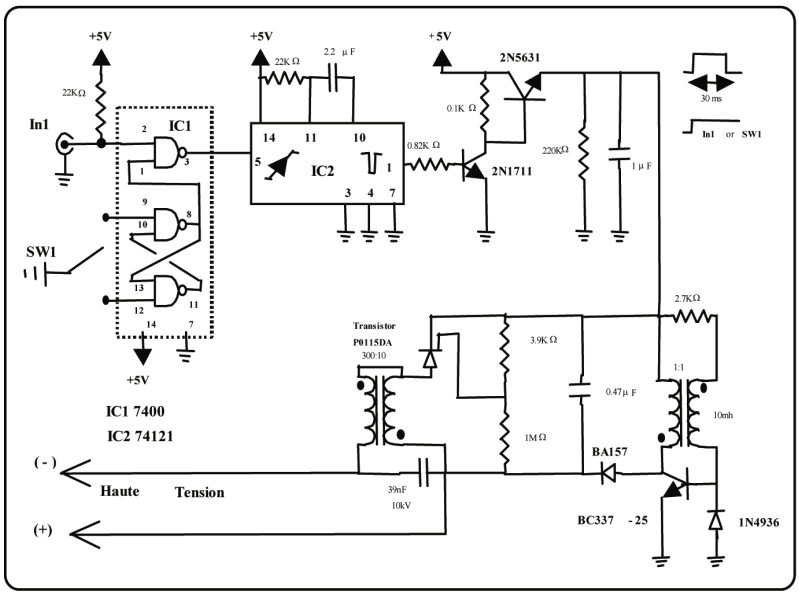


Figure 69 : Schéma du circuit électrique contrôlant la production d'arc électrique nécessaire à la formation de l'extrémité sphérique des sondes AFM-SECM.

Une technique fiable et reproductible pour former les sphères à l'extrémité de la pointe effilée consiste à appliquer des pulses à l'air ambiant sans connecter la pointe d'or au circuit électrique, c'est à dire à résistance infinie. Le contrôle de la décharge électrique est effectué en ajustant la distance, séparant la pointe d'or du fil de tungstène effilé. Ainsi lorsque cette distance est grande la tension nécessaire pour déclencher l'arc électrique est importante, ce qui engendre une quantité d'énergie supérieure dans la pointe d'or, la sphère formée est alors plus grosse. La distance d'écartement couramment employée est de 0,8 mm avec une succession d'environ cinq pulses « en rafale ».

La taille et la géométrie de la bille à l'extrémité de la pointe d'or AFM-SECM est ensuite évaluée par un microscope optique et est typiquement d'environ 500 nm de diamètre.

1.5 Nettoyage de la surface de la pointe d'or AFM-SECM avant peinture

Le nettoyage de la pointe AFM-SECM avant l'étape d'isolation, est réalisé dans une solution de H_2SO_4 à 0,5 M, par voltammétrie cyclique de 0,30 V à 1,85 V/ECS à 200 mV/s. Le voltammogramme typique du nettoyage de la surface de la pointe d'or est présenté en Figure 70.

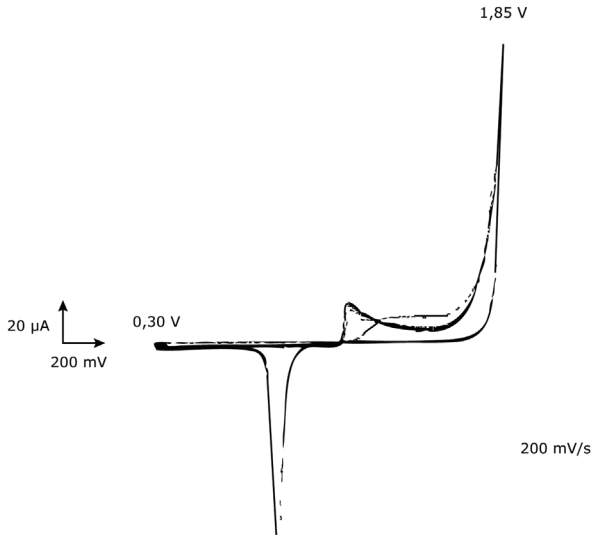


Figure 70 : Voltammogramme typique du nettoyage d'une pointe d'or avant isolation. La voltammétrie cyclique est effectuée en balayant le potentiel de la pointe d'or complètement immergée dans H_2SO_4 à 0,5 M de 0,30 V à 1,85 V/ECS à 200 mV/s.

Le montage électrochimique se compose d'une cellule contenant une solution de H_2SO_4 à 0,5 M et de trois électrodes :

- Une électrode de référence au calomel saturé entourée d'un verre fritté contenant une solution identique à celle employée pour le nettoyage (ce verre fritté assure la protection de la cellule électrochimique vis à vis des ions Cl^- susceptibles de s'échapper de la référence),
- une contre-électrode constitué d'un fil de platine, et
- la pointe d'or est l'électrode de travail.

Un potentiostat, réalisé au laboratoire, permet d'imposer à l'électrode de travail un potentiel connu par rapport à l'électrode de référence, et variant linéairement avec le temps. Après avoir balayé le potentiel de la pointe AFM-SECM durant 15 ou 20 cycles, la pointe est rincée à l'eau milliQ et est alors prête pour être isolée.

1.6 Isolation par dépôt de peinture électrophorétique

L'isolation s'effectue en utilisant une peinture électrophorétique, la « cathodip » fournie par BASF.

La solution de peinture est préparée dans un pilulier comme suit :

- 15 mL de peinture Cathodip,
- 15 mL d'eau de qualité milliQ, et
- 3 µL d'acide acétique purex.

Le pilulier est ensuite plongée dans une cellule thermostatée à 25°C.

Le montage électrochimique est constitué de deux électrodes ce qui nécessite de coupler la référence et la contre-électrode du potentiostat sur une unique électrode de platine enroulée en forme de ressort, d'un diamètre équivalent à l'intérieur de la paroi du pilulier. L'électrode de travail est constituée de la pointe d'or préformée maintenue immergée dans la solution par la pince micro-pince crocodile.

La déposition de la peinture électrophorétique est réalisée en balayant le potentiel de l'électrode de travail de 0 à –5 V à 50 mV/s. Un voltammogramme typique est présenté en Figure 71.

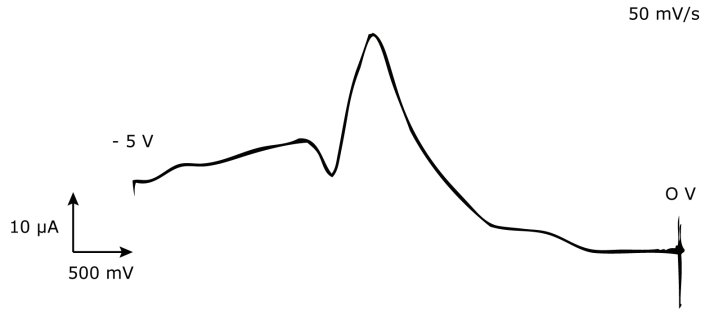


Figure 71 : Voltammogramme obtenu lors de l'isolation d'une pointe d'or AFM-SECM. La déposition de peinture électrophorétique est effectuée en balayant le potentiel de la pointe d'or de 0 à –5 V à 50 mV/s dans une solution contenant 15 mL de peinture Cathodip, 15 mL d'eau milliQ, et 3 µL d'acide acétique purex. La solution est maintenue à température constante de 25 °C par une cellule thermostatée.

Une fois le balayage en potentiel terminé, la pointe d'or est déconnectée du potentiostat, et rincée sous flux non-tendu d'eau milliQ. Afin de permettre la réticulation de la couche de peinture, la sonde est placée dans un four à 183 °C durant 1 heure.

1.7 Vérification de l'isolation électrique complète des pointes d'or

La qualité de l'isolation de la pointe AFM-SECM est évaluée par voltammétrie cyclique dans une solution de ferrocènediméthanol à 1 mM dans KH_2PO_4 à 0,1 M. La vérification de l'isolation de la sonde s'effectue pour trois profondeurs d'immersion de la sonde : l'extrémité de la pointe, immersion jusqu'au niveau du coude avec le bras flexible et enfin la sonde complètement immergée.

L'appareillage utilisé est identique à celui employé pour le nettoyage de la pointe avant isolation (1.5). En revanche, le montage électrochimique protégé des parasites environnementaux par une cage de faraday est constitué de deux électrodes avec d'un coté un fil de platine regroupant la référence et la contre-électrode, et de l'autre la pointe AFM-SECM (l'électrode de travail).

Le potentiel de l'électrode de travail est balayé de –150 à 350 mV à 50 mV/s et le balayage est répété pour chaque profondeur d'immersion (Figure 72).

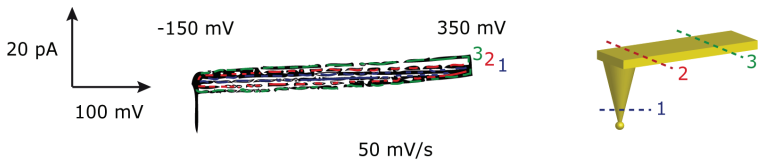


Figure 72 : Voltammogramme dans une solution de ferrocènediméthanol d'une pointe d'or complètement isolée. La vérification de l'isolation de la pointe d'or s'effectue dans une solution de ferrocènediméthanol à 1 mM dans KH_2PO_4 à 0,1 M, de –150 à 350 mV à 50 mV/s selon trois profondeurs d'immersion, 1, 2 et 3.

Comme on peut le voir sur la Figure 72, le voltammogramme enregistré dans le ferrocènediméthanol, d'une pointe parfaitement isolée est « plat », seul un courant capacitif est mesuré et son intensité augmente avec la profondeur d'immersion.

1.8 Exposition sélective de l'extrémité de la pointe

Le montage permettant de découvrir uniquement l'extrémité sphérique de la sonde AFM-SECM est similaire à celui utilisé pour les préformer sauf que cette fois ci la sonde n'est pas exposée directement à l'arc électrique puisqu'il se produit entre deux fils d'or sacrificiels séparés de 2 à 4 mm. L'exposition sélective de la pointe d'or est effectuée en la connectant dans le circuit haute tension au pôle négatif. La sonde AFM-SECM subit alors la brusque variation haute tension générée dans le circuit ce qui a pour effet de souffler électrostatiquement la peinture recouvrant l'extrémité sphérique de la sonde.

Typiquement, les paramètres utilisés pour exposer une sonde AFM-SECM sont une distance d'écartement entre les fils d'or sacrificiels de 2 mm avec 2 ou 3 séries de 5 pulses appliqués successivement (« en rafale »).

On vérifie l'effet des pulses sur l'extrémité sphérique de la pointe d'or AFM-SECM par voltammétrie cyclique dans une solution de ferrocènediméthanol à 1 mM dans KH_2PO_4 0,1 M, de –150 à 350 mV (montage à deux électrodes) à 50 mV/s selon trois profondeurs d'immersion différentes de la sonde.

Le voltammogramme typique d'une pointe AFM-SECM découverte uniquement à l'extrémité est présenté en Figure 73.

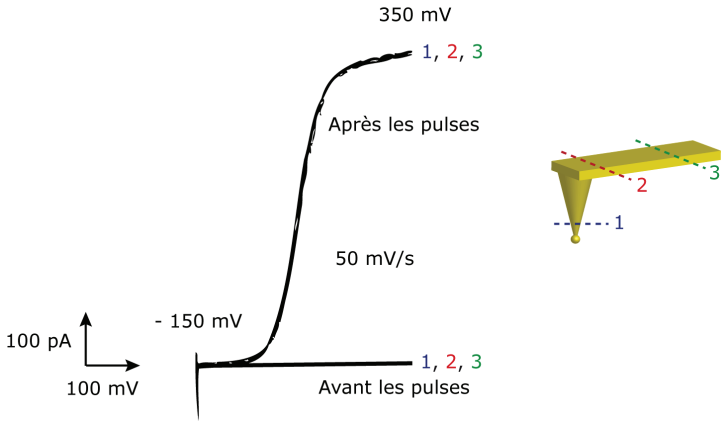


Figure 73 : Voltammogramme dans une solution de ferrocènediméthanol d'une pointe d'or AFM-SECM dont l'extrémité est découverte par 15 pulses à 2 mm. Le balayage en potentiel est effectué de –150 à 350 mV à 50 mV/s dans une solution de ferrocènediméthanol à 10^{-3} M dans KH_2PO_4 10^{-1} M. La voltammétrie cyclique est effectuée aux trois différentes profondeurs d'immersion comme représenté en insert. Les voltammogrammes enregistrés après les pulses aux profondeurs d'immersion 1, 2 et 3 sont identiques.

Comme on peut le voir sur la Figure 73, l'intensité du courant mesuré à la sonde AFM-SECM est indépendante de l'immersion ce qui confirme l'exposition sélective de l'extrémité sphérique de la pointe d'or.

1.9 Collage de la sonde AFM-SECM sur « chip » de verre

L'objectif de cette étape est le collage de la pointe d'or sur un support de verre permettant ensuite la manipulation de la sonde AFM-SECM.

Pour cela, on dépose une goutte de colle cyanoacrylate LOCTITE 4191 sur un « chip » en verre de dimension 3,5 / 1,4 / 0,55 mm qui est étalée à l'aide d'un cône de pipetman en plastique. Le bras flexible de la pointe d'or est ensuite déposé délicatement sur la goutte, en le laissant dépasser du chip d'une longueur comprise entre 1 et 2 mm. Avec un cône de pipetman propre, on fait couler le bras flexible dans la colle en appuyant très légèrement sur toute sa longueur jusqu'à ce qu'il repose sur le verre.

On laisse sécher l'ensemble 24 heures sous flux d'azote, afin d'éviter le dépôt de vapeur de cyanoacrylate sur la pointe AFM-SECM, ce qui nécessiterait ensuite de redécouvrir l'extrémité de la sonde.

Enfin, une seconde couche de colle est appliquée de la même manière. Après avoir étalé la colle sur le chip, on laisse à nouveau la pointe AFM-SECM sécher 24 heures sous flux d'azote.

Afin de vérifier que les vapeurs de cyanoacrylate n'ont pas contaminé l'extrémité de la pointe AFM-SECM, on effectue à nouveau une voltammétrie cyclique dans une solution de ferrocènediméthanol.

1.10 Montage de la sonde AFM-SECM sur prisme

La sonde AFM-SECM est déposée sur le prisme et maintenue en place grâce à un « clip » prévue à cet effet.

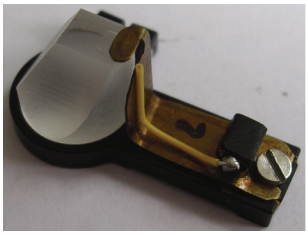


Figure 74 : Photo d'un prisme d'AFM-SECM. En brun, le « clip » permettant le maintien de la sonde AFM-SECM. En jaune, le fil conducteur faisant la jonction entre la sonde AFM-SECM et la connectique permettant de relier le bipotentiostat à la sonde.

L'arrière de la sonde AFM-SECM est mise en contact avec le fil conducteur (en jaune sur la Figure 74) situé sur le clip et le contact électrique est établi entre les deux en utilisant du vernis à l'argent (Goodfellow) déposé à l'aide d'un pinceau fin.

On isole ensuite tout l'arrière du chip et la zone de contact avec le fil en déposant de la graisse à vide fluorée (Fomblin).

L'isolation électrique est testée électrochimiquement en utilisant un montage à deux électrodes constitué d'un fil de platine et de la sonde AFM-SECM montée sur le prisme. L'ensemble est immergé dans une solution de $NaClO_4$ à 1 M et un potentiel de 300 mV est appliqué à la pointe AFM-SECM. La mesure d'un courant de fuite d'une intensité inférieur à 5 pA et qui ne fluctue pas avec le temps caractérise une sonde AFM-SECM de qualité et dont le montage sur prisme a été effectué correctement.

2 Fabrication des surfaces d'or planes

La méthode de fabrication des surfaces d'or planes consiste à déposer de l'or natif par vaporisation sous vide sur une surface de mica fraîchement pelée (Scientec) de 3 cm de côté. La chambre à vide utilisée pour cette opération est une BOC Edwards auto 306 dans lequel l'échantillon de mica est disposé à 20 cm au-dessus d'une pépite d'or pur à 99,999 % (GoodFellow). Les paramètres utilisés sont une pression dans la chambre à vide de $2{,}0.10^{-6}$ mbar et une vitesse de déposition de 0,1 nm/s contrôlée par une balance à quartz. La couche d'or ainsi déposée sur la surface de mica est d'une épaisseur d'environ 200 nm. Dans ces conditions, l'or ainsi déposé épouse parfaitement la surface de mica, rendant atomiquement plane la face contre le support. De plus, pour des épais-

seurs de 200 nm, on est assuré de ne pas avoir une surface d'or présentant des trous.

Pour pouvoir utiliser cette surface, il faut ensuite coller une plaque de verre de 1,8 cm de coté sur la surface d'or exposée à l'air grâce à 10 µL d'une colle époxy bi-composant, l'Epotek 377 pour lequel la réticulation au four à 150°C dure environ 1 heure.

La surface d'or collée sur verre est ensuite immergée dans le tetrahydrofurane (THF) pendant 2 minutes et séparée du mica à l'aide d'un cutter. La surface d'or plane fraîchement pelée est ensuite rincée abondamment à l'éthanol et à l'eau milliQ.

L'un des avantages de l'utilisation de cette méthode de préparation est de pouvoir conserver la surface propre jusqu'au décollement du mica et de permettre une utilisation plusieurs mois après leur collage.

3 Greffage sur pointe AFM-SECM de chaînes Fc-PEG

3.1 Nettoyage de l'extrémité de la sonde AFM-SECM

L'extrémité sphérique de la pointe AFM-SECM est nettoyée avant le greffage des chaînes Fc-PEG, par voltammétrie cyclique dans une solution de H_2SO_4 à 0,5 M. L'électrode de référence au calomel saturé est entourée d'un verre fritté contenant également une solution de H_2SO_4 à 0,5 M. Ainsi, la solution est protégée des ions Cl^- susceptibles de s'échapper de la référence. La contre-électrode est en platine et la sonde AFM-SECM constitue l'électrode de travail. Lors de la manipulation, nous prenons un soin particulier à n'immerger que l'extrémité de la pointe dans la solution acide, et en particulier, à ne pas immerger son bras flexible. Cette précaution vise à limiter autant que possible le contact entre le film de peinture isolante et la solution de décapage.

Le potentiel de l'électrode de travail est balayé de 0,30 V à 1,87 V/ECS à 2 V/s durant 10 à 15 cycles. La pointe AFM-SECM montée sur prisme est ensuite rincée à l'eau milliQ. Afin d'assurer qu'aucune impureté (particule de poussière…) ne reste accrochée à l'extrémité sphérique de la sonde AFM-SECM, on peut également appliquer 3 ou 4 pulses électrostatiques grâce au montage précédemment utilisé pour exposer sélectivement les sondes (voir 1.8).

3.2 Enceinte de greffage de chaînes Fc-PEG sur pointe AFM-SECM

L'ensemble des greffages sur pointes AFM-SECM est réalisé dans une enceinte de greffage permettant de limiter le contact des sondes avec l'air. Cette enceinte de greffage est présentée en Figure 75.

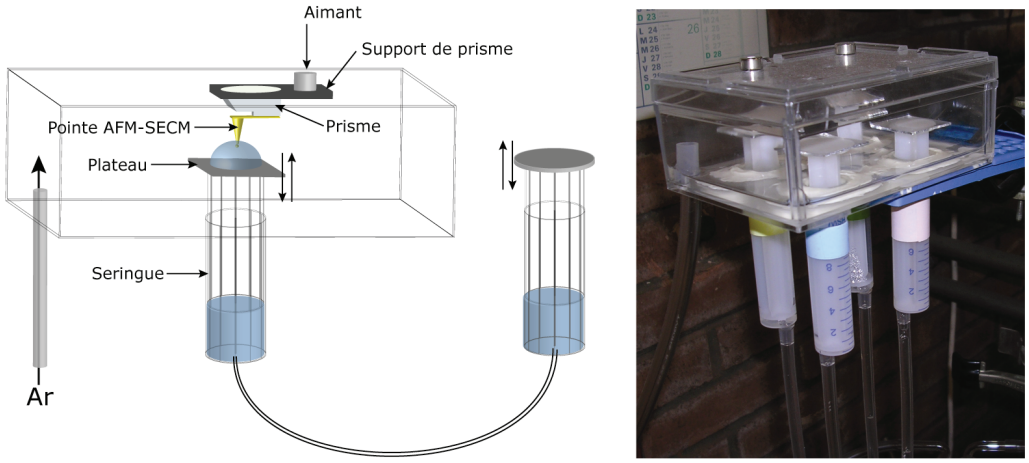


Figure 75 : Enceinte de greffage des sondes AFM-SECM. A gauche, on peut voir une représentation schématique de l'enceinte à système hydraulique et à droite, une photo de celle-ci.

Comme on peut le voir sur la Figure 75, l'enceinte comporte une arrivée d'argon afin de maintenir l'intérieur sous atmosphère inerte. En outre, un procédé hydraulique, utilisant des seringues « couplées », permet de monter ou descendre le plateau portant la solution de greffage ou de désorption jusqu'à la pointe AFM-SECM, sans avoir à ouvrir l'enceinte. Plusieurs plateaux étant disponibles, il est possible de déplacer sous atmosphère inerte la pointe d'une solution à l'autre à l'aide de l'aimant situé sur le dessus et servant à maintenir le prisme portant la sonde AFM-SECM.

4 Fabrication du tampon phosphate pH = 7, I = 0,1 M

Dans une fiole de 250 mL, on pèse 1,66 g de KH_2PO_4. On ajuste avec de l'eau milliQ. Puis on ajoute 6,7 mL de NaOH à 1 M.

5 Provenance des produits chimiques

Les produits suivants sont utilisés sans purification supplémentaire :

- 2-Aminoethanethiol (cystéamine, > 98%, Fluka)
- $NaClO_4$ monohydraté (Merck)
- THF (Merck)
- acide acétique (Prolabo)

- acétone (Prolabo)
- hydroxyde de sodium (Prolabo)
- dihydrogénecarbonate de potassium (Prolabo)
- acide sulfurique (Prolabo)
- éthanol (Prolabo).

Le dérivé de polyéthylène glycol (PEG) ester NHS à tête ferrocène, Fc-PEG-NHS, constitué d'environ 80 monomères, est un produit fabriqué au laboratoire à partir de la chaîne commerciale monoacide OH-PEG_{3400}-CO_2H obtenu auprès de Nektar Therapeutics, Huntsville, AL.